



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104525** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 13060	(72) Винахідник(и): Запорожан Валерій Миколайович (UA), Марічереда Валерія Геннадіївна (UA), Мещерякова Наталя Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.11.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.02.2014	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.07.2013, Бюл.№ 13	(73) Власник(и): ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пров. Валіховський, 2, м. Одеса, 65082 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.02.2014, Бюл.№ 3	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 66443 U; 10.01.2012 Pasha Z, Haider HKh, Ashraf M. Efficient non-viral reprogramming of myoblasts to stemness with a single small molecule to generate cardiac progenitor cells. PLoS One. 2011;6(8):e23667. Komatsu Y, Waku T, Iwasaki N, Ono W, Yamaguchi C, Yanagisawa J. Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis. BMC Med Genomics. 2012 Jan 27;5:5. Sanders YY, Ambalavanan N, Halloran B, Zhang X, Liu H, Crossman DK, Bray M, Zhang K, Thannickal VJ, Hagood JS. Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Sep 15;186(6):525-35. UA 12644 U; 30.01.2006 UA 74433 U; 25.10.2012 UA 8116 U; 15.07.2005 Bechtel W. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney / W. Bechtel, S. McGoohan, E.M. Zeisberg, G.A. et al. // Nature Medicine. - 2010. - Vol. 16, N 5. - P. 544-550. US 2007/0184476 A1; 09.08.2007

(54) СПОСІБ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ, НИРОК, СЕРЦЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГІПЕРТИРЕОЗІ ТА ГІПОТИРЕОЗІ

(57) Реферат:

Винахід належить до медицини, а саме до ендокринології, і може бути застосований для ранньої діагностики розвитку фіброзу тканин при гіпертиреозі та гіпотиреозі. У способі за винаходом у щурів моделюють стан гіпертиреозу та гіпотиреозу, забирають периферичну кров, центрифугують при 1000 об./хв протягом 5 хв, видаляють надосадкову рідину, промивають згусток крові фосфатним буфером, повторюють центрифугування при 1000 об./хв протягом 5 хв, ресуспензують клітинний осад з розчином преекстракційного буферу та з інгібіторами протеаз, інкубують на льоду протягом 10 хв, ретельно змішують вміст пробірок, знову центрифугують при 12000 об./хв протягом 1 хв, видаляють цитоплазматичний надосад, додають

UA 104525 C2

до осаду розчин дитіотреїтолу, інгібітор протеаз та екстракційний буферу, отриманий розчин інкубують на льоду протягом 15 хв та змішують його кожні 5 хв, центрифугують при 14000 об./хв при 4 °C протягом 10 хв, виділяють супернатант та переміщують його у нові пробірки, вимірюють концентрацію протеїнів у отриманому ядерному екстракті при довжині хвилі 560 нм, порівнюючи дані з контролем, за який використовують бичачий сироватковий альбумін з різною концентрацією (0 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,4 мг/мл, 2 мг/мл), далі визначають ферментативну активність ДНК-метилтрансферази (DNMT), для чого у лунки поміщають зразки, які додаються у об'ємі згідно з концентрацією протеїну, у лунки з позитивним контролем додають розчин позитивного контролю з буфером, у лунки з негативним контролем - інгібітор DNMT прокаїнамід у різних концентраціях, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, а в одну лунку як контроль додають тільки буфер, після чого розмішують вміст лунок, накривають парафільмом та інкубують 90 хв при 37 °C, видалляють вміст лунок та промивають тричі миючим буфером, додають 50 мкл антитіл до кожної лунки для захоплення ферменту DNMT та інкубують 60 хв при кімнатній температурі зі струшуванням, видалляють вміст лунок та промивають їх 3-4 рази миючим буфером, знову додають 50 мкл антитіл до кожної лунки для виявлення ферменту та інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв, видалляють вміст лунок і промивають їх 4-5 разів миючим буфером, додають 100 мкл проявляючого розчину до кожної лунки, інкубують у темряві до блакитного кольору протягом 5 хв, додають 50 мкл стоп-реагенту до кожної лунки та вимірюють оптичну щільність при довжині хвилі 450 нм, потім підраховують активність DNMT у зразках і при значеннях її вище норми та зміненої концентрації тиреоїдних гормонів констатують наявність фіброзного ремоделювання тканин, а при значеннях активності DNMT нижче або за нормою та концентрації гормонів щитоподібної залози нижче та вище норми діагностують відсутність фіброзних змін або доброякісний характер перебігу гіпер- або гіпотиреозу.

Винахід належить до медицини, а саме до ендокринології, і може бути застосований для ранньої діагностики розвитку фіброзу тканин при гіпертиреозі та гіпотиреозі.

У структурі ендокринопатій захворювання щитоподібної залози займають одне з провідних місць. Поширеність цієї патології за даними різних авторів знаходиться в межах від 1,3 до 10,3 %. Медико-соціальне значення тиреоїдної патології визначається не тільки великою поширеністю і тенденцією до зростання захворюваності, але також і тим, що гіпофункція і гіперфункція щитовидної залози веде до різних органних порушень, зокрема до фіброзної перебудови тканин.

У даний час розроблені високоінформативні методи дослідження щитоподібної залози та можливих ускладнень, викликаних порушенням тиреоїдним станом, які можуть бути застосовані в умовах поліклініки та в стаціонарі. Для ранньої діагностики дисфункції щитоподібної залози та ускладнень цієї патології застосовують комплексне обстеження з використанням методів, які дозволяють охарактеризувати патологічний процес на тканинному та на клітинному рівнях, а також на рівнях функціональних та обмінних порушень. Незважаючи на це, більшість виявлених хворих вже мають виражені ускладнення органів і систем.

Фіброгенез є незворотним патологічним процесом заміщення ушкодження, який не припиняється, навіть після усунення початкової причини. В основі прогресуючого фіброзу органів і тканин, в тому числі печінки, легень, нирок, серця, кровоносних судин лежить надмірне накопичення позаклітинного матриксу, в основному колагену, що призводить до дезорганізації нормальної структури тканини і, отже, функціональної втрати.

Відомий метод діагностики фіброзу за допомогою виявлення двох і більше маркерів фіброзу у зразках методом двовимірного електрофорезу, аналізом зображень і MALDI-TOF мас-спектрометрією [1]. Підкреслена важлива роль наявності комбінації деяких маркерів при фіброзі печінки. Показана можливість використання різних методів детекції маркерів фіброзу у сечі, але не врахована можливість використання інших біологічних рідин та більш доступних методів визначення фіброзу.

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб діагностики фіброзу печінки у щурів шляхом визначення експресії ряду генів, які кодують білки-маркери фіброзу у крові [2]. Цей спосіб діагностики є неінвазивним, доступним для використання, дозволяє слідкувати за станом та розвитком фіброзу у печінці.

Однак, вказаний спосіб має такі недоліки: потрібно визначити декілька маркерів у зразку для достовірності постановки діагнозу - фіброз печінки, при цьому зазначені маркери характерні для фіброзу тільки у печінці.

В основу винаходу поставлена задача вдосконалення ранньої діагностики розвитку фіброзу органів при гіпер- та гіпотиреозі шляхом визначення активності ДНК-метилтрансферази у крові імуноферментним методом, що дозволить підвищити вірогідність ранньої діагностики фіброзних перетворень тканин при дисфункції щитоподібної залози.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно з винаходом, у щурів моделюють стан гіпертиреозу та гіпотиреозу, забирають периферичну кров, центрифугують при 1000 об./хв протягом 5 хв, видаляють надосадкову рідину, промивають згусток крові фосфатним буфером, повторюють центрифугування при 1000 об./хв протягом 5 хв, ресуспензують клітинний осад з розчином преекстракційного буферу та з інгібіторами протеаз, інкубують на льоду протягом 10 хв, ретельно змішують вміст пробірок, знову центрифугують при 12000 об./хв протягом 1 хв, видаляють цитоплазматичний надосад, додають до осаду розчин дитіотреїтолу, інгібітор протеаз та екстракційний буфер, отриманий розчин інкубують на льоду протягом 15 хв та змішують його кожні 5 хв, центрифугують при 14000 об./хв при 4 °C протягом 10 хв, виділяють супернатант та переміщують його у нові пробірки, вимірюють концентрацію протеїнів у отриманому ядерному екстракті при довжині хвилі 560 нм, порівнюючи дані з контролем, за який використовують бичачий сироватковий альбумін з різною концентрацією (0 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,4 мг/мл, 2 мг/мл), далі визначають ферментативну активність ДНК-метилтрансферази (DNMT), для чого у лунки поміщають зразки, які додаються у об'ємі згідно з концентрацією протеїну, у лунки з позитивним контролем додають розчин позитивного контролю з буфером, у лунки з негативним контролем - інгібітор DNMT прокаїнамід гідрохлорид у різних концентраціях, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, а в одну лунку як контроль додають тільки буфер, після чого розмішують вміст лунок, накривають парафільмом та інкубують 90 хв при 37 °C, видаляють вміст лунок та промивають тричі мийним буфером, додають 50 мкл антитіл до кожної лунки для захоплення ферменту DNMT та інкубують 60 хв при кімнатній температурі зі струшуванням, видаляють вміст лунок та промивають їх 3-4 рази мийним буфером, знову додають 50 мкл антитіл до кожної лунки для виявлення ферменту та інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв, видаляють вміст лунок і промивають їх 4-5 разів мийним буфером, додають 100

мкл проявляючого розчину до кожної лунки, інкубують у темряві до блакитного кольору протягом 5 хв, додають 50 мкл стоп-реагенту до кожної лунки та вимірюють оптичну щільність при довжині хвилі 450 нм, потім підраховують активність DNMT у зразках і при значеннях її вище норми та зміненої концентрації тиреоїдних гормонів констатують наявність фіброзного ремоделювання тканин, а при значеннях активності DNMT нижче або за нормою та концентрації гормонів щитоподібної залози нижче та вище норми діагностують відсутність фіброзних змін або доброякісний характер перебігу гіпер- або гіпотиреозу.

Регуляторні ефекти тиреоїдних гормонів (ТГ) впливають на рівень обміну протеїнів позаклітинного матриксу, оскільки колаген І типу є ТГ-чутливим білком [3], а у фібробластах містяться рецептори тиреоїдстимулюючого гормону [4]. Порушення процесів біосинтезу ТГ та їх метаболізму в тканинах може посилювати ризик виникнення захворювань внаслідок ушкодження хроматину або активування епігенетичних механізмів контролю активності ДНК [4]. Метилювання ДНК є найкраще дослідженим епігенетичним фактором, який відіграє ключову роль у продукції стабільних змін експресії генів, бере участь в адаптації клітин до зміни умов. Метилювання ДНК складається з ковалентного додавання метальної групи до цитозину у 5-й позиції. Ця реакція каталізується ферментом DNMT. Зміни в метилюванні ДНК можуть призвести до сайленсингу активних генів або активації неактивних генів. В основі підтримання фіброгенезу лежать епігенетичні модифікації [5]. Виявлено зв'язок між підвищенням активності DNMT та фіброзом у нирці [5]. Також відомо про вплив ТГ на розвиток фіброзу у серці [3]. Механізми цих змін мають генетичний характер - викликають пошкодження хроматину, і епігенетичний характер - активують епігенетичні механізми контролю активності ДНК [3, 5], де показано, що при моделюванні фіброзу печінки ген, пов'язаний з фіброзом, секретує фосфопротеїн 1 (Spr1), який викликає запалення. Цей ген був гіпометильований, а його експресія - підвищеною. При прогресуванні фіброзу печінки виявлено гіперметилювання ДНК та підвищення активності DNMT.

Таким чином, показано зв'язок між рівнем ТГ та розвитком фіброзу, між концентрацією ТГ та епігенетичними модифікаціями, між прогресуванням фіброзу печінки, нирок, серця та підвищеною активністю DNMT.

Спосіб здійснюється наступним чином.

У тварин проводять забір периферичної крові, виділяють ядерний екстракт зі зразків, додають антитіла, визначають оптичну щільність, розраховують активності DNMT методом імуноферментного аналізу.

Приклад реалізації способу:

Біологічний матеріал для дослідження отримували у лабораторних щурів, яким моделювали стан гіпертиреозу та гіпотиреозу. Для групи контролю були обрані здорові лабораторні тварини, яких утримували у стандартних умовах віварію. При експериментально створених гіпертиреозі та гіпотиреозі відбувалося відповідне підвищення та зниження концентрації тиреоїдних гормонів на фоні майже незмінного рівня ТТГ, що свідчить про ефективність застосованої моделі. При гіпертиреозі та гіпотиреозі були виявлені виражені фіброзні зміни у досліджуваних органах, виражені більшою мірою у серці при гіпотиреозі, та у печінці й нирках - при гіпертиреозі. Результати ферментативної активності DNMT наведені у таблицях 1, 2.

Таблиця 1

Активність ДНК-метилтрансферази у самців з експериментальним гіпертиреозом і гіпотиреозом (ОЩ/г/мг)

Гіпертиреоїдні самці, n=13	Гіпотиреоїдні самці, n=14	Контроль, n=10
128,22±23,60 *, **	72,57±8,90 *	14,97±1,14

Примітка: * - вірогідна різниця між експериментальною групою та контролем ($p < 0,001$); ** - вірогідна різниця між обома експериментальними групами ($p < 0,001$).

Таблиця 2

Активність ДНК-метилтрансферази у самиць з експериментальним гіпертиреозом і гіпотиреозом (ОЩ/г/мг)

Гіпертиреоїдні самиці, n=20	Гіпотиреоїдні самиці, n=20	Контроль, n=12
128,54±17,10 *, **	75,48±7,20 *	15,47±1,10

Примітка: * - вірогідна різниця між експериментальною групою та контролем (p<0,001); ** - вірогідна різниця між обома експериментальними групами (p<0,001).

Аналізуючи отримані результати, можна дійти висновку, що ферментативна активність DNMT підвищується як при гіпертиреоїдному стані, так і при гіпотиреозі. При гіпертиреозі активність DNMT у самиць підвищувалась у 8,5 рази (p<0,001) порівняно з контрольною групою та у 4,8 разу (p<0,001) при гіпотиреозі. У свою чергу, зміна активності метилювання у самиць була такою: у 8,3 разу вища (p<0,001) при гіпертиреозі та у 4,8 разу (p<0,001) при гіпотиреозі порівняно з контролем. Активність ферменту при гіпертиреозі у самиць та у самок перевищувала показники при гіпотиреозі у 1,7 разу. У самиць з гіпотиреозом визначився позитивний зв'язок середньої сили між концентрацією Т3 і активністю DNMT (r=0,54; p<0,05), тобто була виявлена вірогідна залежність між концентрацією ТГ (Т3) й активністю DNMT.

Таким чином, виходячи з результатів, приведених у табл. 1, 2, можна зробити висновок, що у тварин з дисфункцією щитоподібної залози підвищення активності DNMT тісно корелює з прогресуванням фіброзу.

У порівнянні з прототипом, заявлений спосіб дає можливість підвищити вірогідність ранньої діагностики фіброзних перетворень печінки, нирок, серця за рахунок використання активності DNMT як маркеру, що дозволить знизити частоту органної недостатності та інвалідації, які обумовлені пізнім виявленням фіброзу.

Джерела інформації:

1. Пат. 2009 0117591 (A1) US, МПК (2002): A61K 48/00 Fibrosis markers / Fernando Corrales Izquierdo, Laura Sesma Aguirre, Joaquin Fernandez Irigoyen, Jesus Prieto Valtuena, Matias Avila Zaragoza // № 11/988, 092, опубл. 07.05.2009.

2. Пат. 2011 0184476 (A1) US, МПК (2002): A61K 48/00 Biomarkers for liver fibrotic injury / Hui-Chu Hsieh, Tzu-Ling Tseng, Li-Jen Su, Chi-ying Huang, Shih-Lan Hsu // № 11/656, 389, опубл. 5.07.2011.

3. Chen Y.F. Regulation of gene expression with thyroid hormone in rats with myocardial infarction / Y.F. Chen, J.V. Pottala, N.Y. Weltman [et al.] // PLoS One. - 2012. - Vol. 7, N 8. - e40161.

4. Pantos C. New insights into the role of thyroid hormone in cardiac remodeling: time to reconsider? / C. Pantos, I. Mourouzis, D.V. Cokkinos // Heart Fail Rev. - 2011. - Vol. 16, N 1. - P. 79-96.

5. Bechtel W. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney / W. Bechtel, S. McGoohan, E.M. Zeisberg, G.A. et al. // Nature Medicine. - 2010. - Vol. 16, N 5. - P. 544-550.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб ранньої діагностики фіброзу печінки, нирок, серця при експериментальному гіпертиреозі та гіпотиреозі, шляхом визначення маркерів фіброзу в крові лабораторних тварин, який **відрізняється** тим, що у щурів моделюють стан гіпертиреозу та гіпотиреозу, забирають периферичну кров, центрифугують при 1000 об./хв протягом 5 хв, видаляють надосадкову рідину, промивають згусток крові фосфатним буфером, повторюють центрифугування при 1000 об./хв протягом 5 хв, ресуспензують клітинний осад з розчином преекстракційного буферу та з інгібіторами протеаз, інкубують на льоду протягом 10 хв, ретельно змішують вміст пробірок, знову центрифугують при 12000 об./хв протягом 1 хв, видаляють цитоплазматичний надосад, додають до осаду розчин дитіотреїтолу, інгібітор протеаз та екстракційний буферу, отриманий розчин інкубують на льоду протягом 15 хв та змішують його кожні 5 хв, центрифугують при 14000 об./хв при 4 °С протягом 10 хв, виділяють супернатант та переміщують його у нові пробірки, вимірюють концентрацію протеїнів у отриманому ядерному екстракті при довжині хвилі 560 нм, порівнюючи дані з контролем, за який використовують бичачий сироватковий альбумін з різною концентрацією (0 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,4 мг/мл, 2 мг/мл),

- далі визначають ферментативну активність ДНК-метилтрансферази (DNMT), для чого у лунки поміщають зразки, які додаються у об'ємі згідно з концентрацією протеїну, у лунки з позитивним контролем додають розчин позитивного контролю з буфером, у лунки з негативним контролем - інгібітор DNMT прокаїнамід у різних концентраціях, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, а в одну лунку як контроль додають тільки буфер, після чого розмішують вміст лунок, накривають парафільмом та інкубують 90 хв при 37 °С, видаляють вміст лунок та промивають тричі мийним буфером, додають 50 мкл антитіл до кожної лунки для захоплення ферменту DNMT та інкубують 60 хв при кімнатній температурі зі струшуванням, видаляють вміст лунок та промивають їх 3-4 рази мийним буфером, знову додають 50 мкл антитіл до кожної лунки для виявлення ферменту та інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв, видаляють вміст лунок і промивають їх 4-5 разів мийним буфером, додають 100 мкл проявляючого розчину до кожної лунки, інкубують у темряві до блакитного кольору протягом 5 хв, додають 50 мкл стоп-реагенту до кожної лунки та вимірюють оптичну щільність при довжині хвилі 450 нм, потім підраховують активність DNMT у зразках і при значеннях її вище норми та зміненої концентрації тиреоїдних гормонів констатують наявність фіброзного ремоделювання тканин, а при значеннях активності DNMT нижче або за нормою та концентрації гормонів щитоподібної залози нижче та вище норми діагностують відсутність фіброзних змін або доброякісний характер перебігу гіпер- або гіпотиреозу.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601