



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68071** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
A61B 17/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 11143	(72) Винахідник(и): Ревура Андрій Петрович (UA), Фецич Тарас Григорович (UA), Варивода Євген Степанович (UA), Волошинська Уляна Мирославівна (UA), Ярема Роман Романович (UA), Витвицький Ігор Карлович (UA), Прецель Орест Орестович (UA), Фецич Маркіян Тарасович (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.09.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.03.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.03.2012, Бюл.№ 5	(73) Власник(и): ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, вул. Пекарська 69, м. Львів, 79010, Україна (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ КАРЦИНОМАТОЗУ ОЧЕРЕВИНИ У ПАЦІЄНТІВ З КОЛОРЕКТАЛЬНИМ РАКОМ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики карциноматозу очеревини у пацієнтів з колоректальним раком включає забір дослідного матеріалу та виявлення вільних злоякісних клітин. Наявність вільних ракових клітин у досліджуваному матеріалі встановлюють на основі визначення рівня експресії гену CEA за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

UA 68071 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема онкології, і може бути використана для діагностики карциноматозу очеревини на ранній стадії у пацієнтів з колоректальним раком (КРР) на основі виявлення вільних ракових клітин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу.

Карциноматоз очеревини розвивається в 4-19 % пацієнтів, які були радикально оперовані з приводу КРР, та є причиною рецидиву в 44 % випадків [1]. Необхідною передумовою перитонеальної дисемінації при КРР є відокремлення злоякісних клітин від первинної пухлини і розповсюдження їх по поверхні вісцерального та парієтального листків очеревини. Ракові клітини мають високу здатність імплантуватися в очеревину з наступним ростом у вигляді метастатичних вогнищ. Наявність вільних ракових клітин у черевній порожнині пацієнтів з КРР свідчить про ранній карциноматоз очеревини, має прогностичне значення і може розглядатися як один з критеріїв при плануванні ад'ювантної терапії. Тому рання діагностика карциноматозу очеревини у хворих з КРР сьогодні має важливе наукове і практичне значення.

Найбільш близький до заявлюваного способу і вибраний за прототип є спосіб діагностики карциноматозу очеревини за допомогою цитологічного дослідження асцитної рідини або перитонеальних змивів. Він передбачає виявлення вільних ракових клітин за їх структурно-морфологічними особливостями під час світлової мікроскопії забарвлених препаратів-мазків.

Спосіб дозволяє діагностувати карциноматоз очеревини на доклінічній стадії у пацієнтів з КРР, коли перитонеальна дисемінація наявна лише у вигляді мікрометастазів, а ураження очеревини неможливо встановити візуально [2].

Незважаючи на широке застосування прототипу, суттєвим недоліком є його низька чутливість. Вона зумовлена труднощами в диференціюванні вільних ракових клітин від лейкоцитів та мезотелію очеревини. Цитологічне дослідження також не дозволяє виявляти поодинокі злоякісні клітини в досліджуваному матеріалі.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб діагностики карциноматозу очеревини у пацієнтів з КРР, який би володів високою чутливістю і можливістю виявляти поодинокі злоякісні клітини в досліджуваному матеріалі на доклінічній стадії.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі діагностики карциноматозу очеревини у пацієнтів з КРР, що включає забір дослідного матеріалу та виявлення вільних злоякісних клітин і, згідно з корисною моделлю, наявність вільних ракових клітин у досліджуваному матеріалі встановлюють на основі визначення рівня експресії гену CEA за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Поставлена задача вирішується також тим, що для визначення рівня експресії гену CEA проводять полімеразну ланцюгову реакцію з використанням специфічних праймерів, інтеркалюючого барвника SYBR Green I із детекцією результатів в режимі реального часу.

Виявлення вільних ракових клітин у запропонованому способі ґрунтується на молекулярно-генетичному принципі, в основі якого лежить лабораторне відтворення природних біохімічних реакцій. Завдяки специфічним праймерам лише цільові гени вступають у полімеразну ланцюгову реакцію. Її продукти взаємодіють із барвником SYBR Green I та викликають явище флуоресценції. Детекція накопичення флуоресцентного сигналу проходить в режимі реального часу. Це дозволяє виконати аналіз результатів реакції за допомогою програмного забезпечення й уникнути хибної суб'єктивної інтерпретації.

Запропонована корисна модель ілюструється кресленням, де відображені графіки накопичення флуоресцентного сигналу в ПЛР (логарифмічна вісь ординат).

Спосіб здійснюють у кілька етапів: забір дослідного матеріалу; екстракція РНК; проведення реакції зворотної транскрипції; проведення власне полімеразної ланцюгової реакції; аналіз результатів.

Забір дослідного матеріалу здійснюють в операційній кімнаті під час хірургічного видалення пухлини товстої чи прямої кишки. Відразу після лапаротомії із черевної порожнини аспірують шприцом асцитну рідину. При її відсутності вводять ізотонічний розчин NaCl в простір Дугласа, ретельно перемішують з наступною аспірацією. Дослідний матеріал переносять в одноразову стерильну пробірку типу Falcon об'ємом 10 мл та транспортують в контейнері з льодом в лабораторію, де виконують наступний етап.

Для екстракції РНК із клітин використовують набір реактивів та колонок GeneJET™ RNA Purification Kit (фірма "Fermentas", Литва). Протокол виділення РНК, згідно з рекомендаціями виробника:

- пробірки з дослідним матеріалом (суспензія клітин) центрифугують протягом 5 хв. при 250 × g;
- супернатант видалюють, а осад клітин розчиняють в 600 мкл лізуючого буферу, до якого попередньо додають 12 мкл 2М розчину дитіотреїтолу, розмішують на вортексі;

- додають 360 мкл 96-100 % етанолу і розмішують;
- переносять 700 мкл лізату в очисну колонку, центрифугують протягом 1 хв. при 12000 × g і видаляють лізат зі збірної пробірки;

5 повторюють попередній крок, поки весь лізат пройде через очисну колонку, змінюють збірну пробірку;

- додають 700 мкл промивного буферу № 1 в очисну колонку, центрифугують протягом 1 хв. при 12000 × g і видаляють буфер зі збірної пробірки;

- додають 600 мкл промивного буферу № 2 в очисну колонку, центрифугують протягом 1 хв. при 12000 × g і видаляють буфер зі збірної пробірки;

10 - додають 250 мкл промивного буферу № 2 в очисну колонку, центрифугують протягом 2 хв. при 12000 × g і видаляють буфер та збірну пробірку, а колонку поміщають в нову пробірку об'ємом 1,5 мл;

- додають 100 мкл води в очисну колонку, центрифугують протягом 1 хв. при 12000 × g, і розчин РНК, що зібрався в пробірці, використовують в наступному етапі.

15 Концентрацію отриманої РНК вимірюють методом спектрофотометрії на спектрофотометрі NanoDrop® ND-1000 (фірма "Thermo Scientific", США).

Синтез ДНК на основі виділеної РНК проводять за допомогою реакції зворотної транскрипції, для якої використовують набір реактивів RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (фірма "Fermentas", Литва). Протокол зворотної транскрипції, згідно з рекомендаціями виробника:

- в пробірку типу Eppendorf (1,5 мл) додають 5 нг зразка РНК, 1 мкл гексамерних праймерів та воду до загального об'єму суміші 12 мкл і перемішують;

- додають такі реактиви: 4 мкл 5X реакційного буферу, 1 мкл RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл dNTP Mix та 1 мкл ферменту RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase;

25 - реакційну суміш добре перемішують, центрифугують та інкубують в термостаті 5 хв. при 25 °C, 60 хв. при 42 °C і 5 хв. при 70 °C.

Зразок ДНК готовий до постановки ПЛР. ДНК можна зберігати впродовж 7 днів при 2-8 °C, впродовж 1 року - при -20 °C.

30 Концентрацію отриманої ДНК вимірюють методом спектрофотометрії на спектрофотометрі NanoDrop® ND-1000 (фірма "Thermo Scientific", США).

Для дослідження експресії гену CEA проводять реакцію ампліфікації з використанням специфічних праймерів та інтеркалюючого барвника SYBR Green I з детекцією результатів в режимі реального часу. Як внутрішній позитивний контроль визначають референсний ген GAPDH зі стабільною експресією. Для ПЛР використовують прямі та зворотні праймери, специфічні для генів CEA та GAPDH. Автори застосовують праймери, склад яких особисто розробили за допомогою програми PrimerQuest (eu.idtdna.com) таким чином, щоб забезпечити селективне зв'язування праймера та високу ефективність роботи ПЛР-системи в цілому.

40 У запропонованій корисній моделі обраний спосіб оцінки накопичення продуктів ПЛР інтеркалюючим барвником SYBR Green I з детекцією результатів в режимі реального часу. Інтеркалюючий барвник SYBR Green I - це сполука, яка набуває здатності флуоресцювати після влаштування в дволанцюгову молекулу ДНК.

Для ПЛР застосовують набір реактивів Maxima® SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (фірма "Fermentas", Литва) та праймери, синтезовані фірмою "Metabion" (Німеччина). Для кожного зразка ДНК проводять паралельно дві реакції ампліфікації в окремих мікропробірках: в одній - із прямим і зворотнім праймерами для гену CEA, в іншій - для гену GAPDH. Відповідно до цього реакційна суміш об'ємом 25 мкл містить:

а) 12,5 мкл Maxima® SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X), 0,3 мкМ прямого праймеру (CEA), 0,3 мкМ зворотного праймеру (CEA), 10 нг зразка ДНК;

50 б) 12,5 мкл Maxima® SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X), 0,3 мкМ прямого праймеру (GAPDH), 0,3 мкМ зворотного праймеру (GAPDH), 10 нг зразка ДНК.

Для перевірки достовірності результатів і виявлення контамінації реагентів на різних етапах виконують ряд контрольних реакцій:

- негативний контроль без зразка РНК (замість РНК вносять відповідний об'єм води в реакційну суміш для зворотної транскрипції із наступною ПЛР);

55 - негативний контроль без зразка ДНК (замість ДНК вносять відповідний об'єм води в реакційну суміш для ПЛР);

- зовнішній позитивний контроль (замість дослідної РНК вносять контрольну GAPDH РНК в реакційну суміш для зворотної транскрипції із наступною ПЛР).

ПЛР проводять в ампліфікаторі iCycler iQ5 "Bio-Rad" (США) згідно з температурним протоколом (Табл. 1). В режимі реального часу апарат здійснює детекцію флуоресцентного сигналу по каналу SYBR під час кроку елонгації кожного з 40 циклів реакції.

Таблиця 1

Температурний протокол ПЛР

Крок	Температура, °C	Час	Кількість циклів
Активация ферменту	95	10 хв	1
Денатурація ДНК	95	15 сек	40
Відпалювання праймерів	60	30 сек	
Елонгація	72	30 сек	

5

На основі одержаних результатів алгоритм програмного забезпечення ампліфікатора вираховує значення порогового циклу (Ct). Цей показник характеризує такий цикл ПЛР, при якому рівень флуоресцентного сигналу експоненційно збільшується.

10 Для визначення рівня експресії гену CEA вільних злоякісних клітин аналізують графіки ампліфікації дослідних зразків, позитивних і негативних контролів, враховуючи значення порогового циклу:

- дослідний зразок вважають позитивним, якщо відбувається ампліфікація гену CEA зі значенням $Ct \leq 35$, а у відповідному внутрішньому позитивному контролі - ампліфікація гену GAPDH зі значенням Ct , що дорівнює або менше 35;

15 - дослідний зразок вважають негативним, якщо немає ампліфікації гену CEA, але відбувається ампліфікація гену GAPDH зі значенням Ct , що дорівнює або менше 35, у відповідному внутрішньому позитивному контролі;

- у негативному контролі без зразка РНК та негативному контролі без зразка ДНК не повинна відбуватись ампліфікація;

20 - у зовнішньому позитивному контролі повинна відбуватись ампліфікація.

Результати аналізу не враховуються:

- при відсутності ампліфікації гену GAPDH у внутрішньому позитивному контролі або при його ампліфікації зі значенням Ct більше 35;

- при ампліфікації гену CEA зі значенням Ct більше 35 в дослідному зразку;

25 - якщо відбувається ампліфікація у негативному контролі без зразка РНК або негативному контролі без зразка ДНК;

- при відсутності ампліфікації у зовнішньому позитивному контролі. У цих випадках проводять повторне виділення РНК із дослідного матеріалу, зворотну транскрипцію та ПЛР.

Клінічний приклад.

30 Пацієнтка М., 62 р., була прийнята в стаціонар з діагнозом рак висхідного відділу товстої кишки. 14.04.2011 р. хворій проведено правобічну геміколектомію. Під час операції візуально карциноматоз очередини не виявили. Згідно з описом запропонованої корисної моделі, на початку оперативного втручання виконали змив ізотонічним розчином NaCl. Дослідний матеріал відправили в ПЛР-лабораторію, де провели наступні етапи: екстракцію РНК, реакцію зворотної транскрипції, ПЛР й аналіз результатів.

35 Графіки накопичення флуоресцентного сигналу, які отримали під час ПЛР, відображені на рисунку, а відповідні їм значення Ct - в таблиці 2.

40 В даному дослідному зразку відбулася ампліфікація гену CEA та гену GAPDH у внутрішньому і зовнішньому позитивних контролях. На рисунку про це свідчать графіки CEA, GAPDH та K+, відповідно. У негативних контролях без зразка РНК та без зразка ДНК ампліфікація не відбулася, оскільки графіки DNA- і RNA- не відображають зростаючого накопичення флуоресцентного сигналу і для них неможливо визначити значення Ct (Табл. 2).

Таблиця 2

Значення Ct , отримані в дослідній і контрольних реакціях ПЛР

Назва реакції	Графік	Ct
Дослідна реакція	CEA	27,32
Внутрішній позитивний контроль	GAPDH	25,36
Зовнішній позитивний контроль	K+	4,04
Негативний контроль без зразка ДНК	DNA-	-
Негативний контроль без зразка РНК	RNA-	-

Примітка: «-» - значення St для даного графіка не існує.

Таким чином, ПЛР була проведена коректно і в дослідному матеріалі виявили вільні ракові клітини. Отже, в пацієнтки М. діагностовано карциноматоз очеревини на доклінічній стадії.

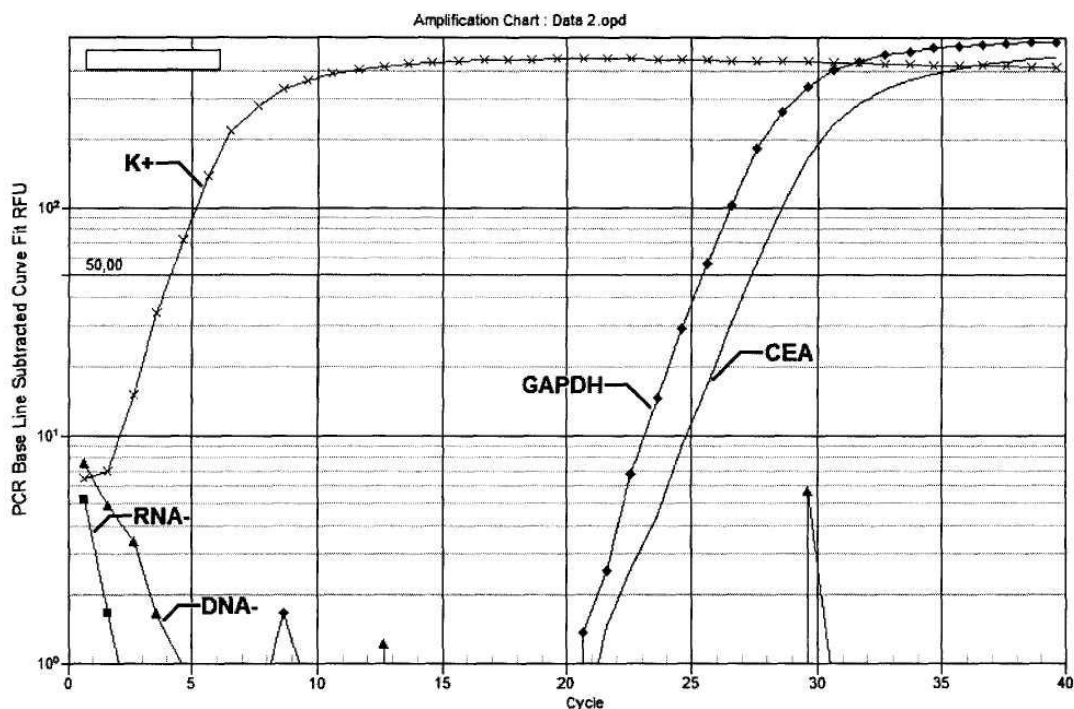
Результатом використання запропонованого способу буде раннє виявлення перитонеальної дисемінації в пацієнтів з КРР, можливість розпочати своєчасне лікування та, як наслідок, суттєве збільшення медіани виживання для цієї категорії хворих.

Джерела інформації:

1. Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin. Incidence and Current Treatment Strategies / M. J. Koppe, O. C. Boerman, J. G. Wim [et al.] // Annals of Surgery.-2006. - Vol. 243, № 2. - P. 212-222.
2. Ehya H. Effusion cytology / H. Ehya // Clinics in laboratory medicine.-1991.- Vol. 11, № 2.-P. 443-467.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб діагностики карциноматозу очеревини у пацієнтів з колоректальним раком, що включає забір дослідного матеріалу та виявлення вільних злоякісних клітин, який **відрізняється** тим, що наявність вільних ракових клітин у досліджуваному матеріалі встановлюють на основі визначення рівня експресії гену CEA за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для визначення рівня експресії гену CEA проводять полімеразну ланцюгову реакцію з використанням специфічних праймерів, інтеркалюючого барвника SYBR Green I із детекцією результатів в режимі реального часу.



Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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