



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **145128** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2020 03206</p> <p>(22) Дата подання заявки: 27.05.2020</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 26.11.2020</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 25.11.2020, Бюл.№ 22</p>	<p>(72) Винахідник(и): Гарбузова Вікторія Юріївна (UA), Волкогон Андрій Дмитрович (UA), Атаман Олександр Васильович (UA), Колногуз Альона Владиславівна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ (СУМДУ), вул. Римського-Корсакова, буд. 2, м. Суми, 40007 (UA)</p>
---	---

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ НИРКОВО-КЛІТИННОГО РАКУ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування розвитку нирково-клітинного раку включає екстракцію геномної ДНК з лейкоцитів венозної крові з подальшим генотипуванням. Генотипування проводять за поліморфним сайтом rs3200401 гена MALAT1, і при наявності мінорного Т-алеля (генотипи СТ і ТТ) прогнозують зменшений ризик розвитку нирково-клітинного раку, а при наявності генотипу СС прогнозують підвищений ризик настання нирково-клітинного раку.

UA 145128 U

Корисна модель належить до галузі теоретичної та клінічної медицини, а саме до патофізіології, онкології, урології, нефрології та медичної генетики, і може бути застосована з метою удосконалення прогнозування, профілактики та персоналізованого лікування нирково-клітинного раку (НКТ).

5 За даними GLOBOCAN (Global cancer statistics) рак нирки посідає 16-те місце у переліку найпоширеніших форм злоякісних пухлин в усьому світі, спричинюючи щорічно близько 400 000 нових випадків захворювання та 175 000 смертей [Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.]. Поряд із цим в
10 Україні рак нирки посідає 7-е місце в загальній структурі онкопатологій, а показник захворюваності і смертності від цього раку перевищує загальносвітовий більше ніж у 2 рази [Федоренко З.П., Гулак Л.О., Рижов А.Ю., Горох Є.Л., Сумкіна О.В., Куценко Л.Б. Особливості розвитку захворюваності на рак сечостатевого органу в Україні після аварії на ЧАЕС. *Онкоурологія* / 2013. - № 1(9)]. Серед усіх форм ниркового раку приблизно 90-95 % випадків
15 становить нирково-клітинний рак (НКТ) [Hsieh JJ1, Purdue MP2, Signoretti S3, Swanton C4, Albiges L5, Schmidinger M et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Mar 9;3:17009. doi: 10.1038/nrdp.2017.9.]. Тому питання своєчасної діагностики, коректної профілактики та індивідуалізованого лікування саме НКТ мають велике медичне і соціальне значення.

Результати багатьох експериментальних та клінічних досліджень останніх років показали,
20 що важливу роль у розвитку НКТ відіграють довгі некодуючі РНК (днРНК), зумовлюючи регуляцію молекулярних шляхів поділу та трансформації клітин ниркового епітелію [Liu X1, Hao Y2, Yu W1, Yang X2, Luo X1, Zhao J et al. Long Non-Coding RNA Emergence During Renal Cell Carcinoma Tumorigenesis. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(2):735-746. doi: 10.1159/000490026.]. Серед багатьох днРНК, причетних до патогенезу злоякісних пухлин нирок, особливу увагу
25 сьогодні привертає MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) також відома як NEAT2 (noncoding nuclear-enriched abundant transcript 2), що є висококонсервативною у ссавців і активно експресується у багатьох клітинах і тканинах організму, включаючи нирки [Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution / Ulitsky I. et al. // *Cell.* 2011. Vol. 147(7). P. 1537–1550.].

На сьогодні встановлено, що рівень експресії днРНК MALAT1 є значно підвищеним в
30 тканинах НКТ у порівнянні з відповідними нормальними тканинами [Zhang HM, Yang FQ, Chen SJ, Che J, Zheng JH. Upregulation of long non-coding RNA MALAT1 correlates with tumor progression and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2015;36(4):2947-2955. doi: 10.1007/s13277-014-2925-6.]. Крім цього доведено, що високий показник експресії MALAT1 у хворих із НКТ пов'язаний із більшою кількістю ускладнень та меншим показником виживаності
35 [Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, Deng G, Nakajima K, Tabatabai ZL et al. Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Aggressive Renal Cell Carcinoma through Ezh2 and Interacts with miR-205. *Cancer Res.* 2015;75(7):1322-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2931.]. А експерименти *in vitro* показали, що пригнічення MALAT1 не тільки зменшує проліферацію та стимулює апоптозу
40 клітин пухлин нирки, але також інгібує їх міграцію та інвазію [Ye Y, Zhang F, Chen Q, Huang Z, Li M. LncRNA MALAT1 modified progression of clear cell kidney carcinoma (KIRC) by regulation of miR-194-5p/ACVR2B signaling. *Mol Carcinog.* 2019;58(2):279-292. doi: 10.1002/mc.22926.].

На сьогодні пошук високоінформативних та водночас зручних способів прогнозування та
45 діагностики пухлинних захворювань, зокрема і раку нирок, є одним із найбільш важливих питань сучасної медико-біологічної науки. До таких методів належить і вивчення поліморфізму поодиноких нуклеотидів генів, причетних до реалізації патогенетичних ланок виникнення та прогресії злоякісних новоутворень. Враховуючи важливу роль днРНК MALAT1 у виникненні НКТ, на сьогодні зроблені спроби використовувати її як молекулярний маркер наявності цього
50 захворювання, натомість, дослідження ролі генетичного поліморфізму MALAT1 у виникненні раку нирок поки що відсутні. Таким чином, беручи до уваги переваги та недоліки вже існуючих способів діагностики злоякісних пухлин нирок, питання удосконалення та спрощення методів прогнозування, виявлення та персоналізованої профілактики НКТ є актуальною, проте до кінця не вирішеною проблемою.

В якості аналогу корисної моделі визначено спосіб прогнозування розвитку НКТ залежно від
55 певних генетичних алелів [Garrigós C1, Espinosa M1, Salinas A1, Osman I2, Medina R2, Taron M. Single nucleotide polymorphisms as prognostic and predictive biomarkers in renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017 Nov 20;8(63):106551-106564. doi: 10.18632/oncotarget.22533.], який дозволяє оцінити ризик виникнення НКТ та виживаності хворих за яким визначають конкретні генотипи за п'ятьма поліморфними сайтами генів факторів росту: VEGFR2, VEGFR3, PDGFRA.

Недоліком вказаного способу є застосування великої кількості (п'яти) маркерів з недостатньою прогностичною силою, що робить його менш точним, проте більш тривалим і економічно обтяжучим.

5 В основу корисної моделі поставлена задача розробка нового, фінансово доцільного та більш ефективного способу, прогнозування розвитку НКР в популяції шляхом використання молекулярного маркера з високою прогностичною силою, скорочення часу проведення процедури.

10 Поставлена задача вирішується тим, що спосіб прогнозування розвитку нирково-клітинного раку включає екстракцію геномної ДНК з лейкоцитів венозної крові з подальшим генотипуванням. Генотипування проводять за поліморфним сайтом rs3200401 гена MALAT1, і при наявності мінорного Т-алеля (генотипи СТ і ТТ) прогнозують зменшений ризик розвитку нирково-клітинного раку, а при наявності генотипу СС прогнозують підвищений ризик настання нирково-клітинного раку.

15 Використання молекулярного маркера MALAT1 з високою прогностичною силою забезпечує завчасне виявлення осіб групи ризику НКР, що дозволяє оптимізувати профілактичні заходи, більш персоналізовано визначити тактику лікування хворих, а також з високою вірогідністю зробити прогноз стосовно виживаності та розвитку метастазування. Відсутність потреби виконувати повторний аналіз в динаміці забезпечує меншу тривалість проведення процедури та робить його менш економічно обтяжучим.

20 Спосіб реалізується таким чином:

Спочатку у пацієнта проводять забір біоматеріалу, потім виконують екстрагування геномної ДНК послуговуючись комерційними наборами GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) з подальшим молекулярно-генетичним визначенням поліморфного локусу гена днРНК MALAT1.

25 Визначення rs3200401-поліморфізму гена MALAT1 виконують за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (Real-Time PCR) із використанням компонентів TaqMan®SNP Assay C_3246069_10. Режим для проведення ампліфікації наступний: первинна денатурація 20 с при 95 °С, денатурація 30 с при 95 °С та відпал з елонгацією - 30 с при 60 °С (всього 50 циклів). Ампліфікація та аналіз отриманих результатів
30 проводиться із використанням детекторного модуля 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) та програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software.

Приклад конкретного виконання способу.

1. Пацієнту Р., 18 років, проводять скринінг спадкової схильності до пухлинних захворювань. Для цього забирають цільну венозну кров та визначають генотип за rs3200401-локусом. Кров
35 набирають у стерильних умовах у моновет (об'єм - 2,7 мл) з додаванням етилендіамінтетраацетату (11,7 мМ) ("Sarstedt", Німеччина), заморожують та зберігають при температурі -20 °С. Виділення ДНК з лейкоцитів венозної крові проводять послуговуючись комерційними наборами GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Поліморфізм rs3200401 гена MALAT1 визначають методом полімеразної
40 ланцюгової реакції в реальному часі із використанням компонентів TaqMan®SNP Assay C_3246069_10. Одержаний результат - гомозиготний генотип СС за локусом rs3200401 гена MALAT1. Враховуючи, що вказаний алельний варіант є об'єктивним фактором підвищеного ризику настання НКР, пацієнта відносять до групи ризику раку нирки. На підставі цього йому надаються рекомендації обмежити вживання алкоголю, не займатись тютюнопалінням,
45 контролювати власний індекс маси тіла, не допускаючи його підйому вище 30 кг/м². Крім того, у разі появи в майбутніх періодах життя цього пацієнта симптомів, що можуть вказувати на ниркову патологію (гематурія, стійке підвищення артеріального тиску, біль у попереку) рекомендується якнайшвидше проведення біохімічного аналізу крові, УЗД та КТ нирок з метою підтвердження або спростування наявності ниркової пухлини.

50 Іншим варіантом використання запропонованої моделі є застосування rs3200401-локусу гена MALAT1 як маркера прогнозу та передбачення.

2. Пацієнтка М., 53 років, обстежена клінічно, лабораторно та інструментально. Основні клінічні прояви: значне схуднення, стійка гематурія, тривалий ниючий біль у попереку зліва протягом 2-х місяців. За даними УЗД, КТ та імуногістохімічного аналізу тканин біоптату нирки
55 встановлена II клінічна стадія нирково-клітинного раку відповідно до TNM-класифікації. Після цього проводять забір венозної крові з наступним визначенням генотипу за rs3200401-локусом вище описаним способом. Отриманий результат - генотип СС за rs3200401-сайтом гена MALAT1. Враховуючи, що такий генотип є фактором підвищеного ризику виникнення та прогресії НКР, пацієнтці рекомендується проведення не органозберігаючої операції (резекції), а нефректомії. Крім того, після оперативного лікування пацієнтку відносять до групи високого
60

ризик рецидиву та прогресії НКР, наслідком чого є рекомендація проведення диспансерного спостереження з повним виконанням усього переліку досліджень, включаючи мультиспіральну КТ органів черевної порожнини, заочеревинного простору та грудної клітки

5 Використовуючи запропонований спосіб було проведено обстеження 101 хворого з нирково-клітинним раком та 100 осіб відповідного віку без онкологічних захворювань в анамнезі, що склали контрольну групу.

10 Статистичного аналіз даних здійснювали із використанням програми SPSS (версія 17.0). Для порівняння розподілу генотипів у групах порівняння та аналізу зв'язку між rs3200401-локусом і НКР застосовували χ^2 -критерій Пірсона. Для визначення ризику настання раку нирки розраховували відношення шансів (OR) та 95 % довірчий інтервал (CI) в рамках різних моделей успадкування. Значення $P < 0,05$ вважали за статистично значущі.

15 Результати генотипування осіб груп порівняння за rs3200401-сайтом гена MALAT1 були наступними. Серед пацієнтів із НКР кількість СС-гомозигот становила 71 (70,3 %), СТ-гетерозигот - 29 (28,7 %), а ТТ-гомозигот - 1 (1 %). У групі контролю відповідний розподіл був таким: СС-гомозиготи - 59 (59 %), СТ-гетерозиготи - 32 (32 %), ТТ-гомозиготи - 9 (9 %). Порівняльний аналіз показав, що відмінність у розподілі генотипів між двома групами є статистично достовірною ($P=0,022$), а, отже, поліморфний локус rs3200401 гена MALAT1 асоційований із розвитком НКР.

20 Для встановлення ризику розвитку раку нирки залежно від наявності у хворого конкретного генотипу за rs3200401-поліморфізмом був застосований метод логістичної регресії (табл). Найкращою моделлю успадкування виявилася рецесивна, відповідно до якої носії мінорного алеля (генотипи СТ і Т/Т) мають значно нижчий ризик настання НКР ($P=0,031$, $OR=0,101$), якщо порівнювати із гомозиготами СС.

25 Аналіз ризику розвитку нирково-клітинного раку залежно від генотипу за поліморфізмом rs3200401 гена MALAT1

Модель	P	OR (95 % CI)
Домінантна	0,095	0,608 (0,339-1,090)
Рецесивна	0,031	0,101(0,013-0,814)
Наддомінантна	0,612	0,856 (0,469-1,563)

Примітка. 95 % CI-95 % довірчий інтервал; OR - відношення шансів; P - показник статистичної достовірності

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

30 Спосіб прогнозування розвитку нирково-клітинного раку, що включає екстракцію геномної ДНК з лейкоцитів венозної крові з подальшим генотипуванням, який **відрізняється** тим, що генотипування проводять за поліморфним сайтом rs3200401 гена MALAT1, і при наявності мінорного Т-алеля (генотипи СТ і ТТ) прогнозують зменшений ризик розвитку нирково-клітинного раку, а при наявності генотипу СС прогнозують підвищений ризик настання нирково-клітинного раку.

35