

# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2599099

### СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПО УРОВНЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ CASP3, CASP8 И CASP9 ПОСЛЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИШЕМИИ ПОЧКИ

Патентообладатель(ли): *федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015134518

Приоритет изобретения **17 августа 2015 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **09 сентября 2016 г.**

Срок действия патента истекает **17 августа 2035 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

 **Г.П. Ивлиев**





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015134518/15, 17.08.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.08.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.08.2015

(45) Опубликовано: 10.10.2016 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2012129721 A1, 24.05.2012  
BONVENTRE J.V. et al. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2003 Aug; 14(8): 2199-2210 [Найдено 24.06.2016] [он-лайн]. Найдено из Интернет: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874476> НИКОЛАЕВ А.Ю. и др. Острая почечная недостаточность. РМЖ. 02.10.1998; 19: 1-5 (см. прод.)

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63,  
РНИОИ, научно-аналитический отдел,  
Ишониной О.Г.

(72) Автор(ы):

Кит Олег Иванович (RU),  
Водолажский Дмитрий Игоревич (RU),  
Франциянц Елена Михайловна (RU),  
Кутилин Денис Сергеевич (RU),  
Димитриади Сергей Николаевич (RU),  
Тимошкина Наталья Николаевна (RU),  
Гудуева Елена Николаевна (RU),  
Швырев Дмитрий Александрович (RU),  
Двадненко Константин Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

## (54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПО УРОВНЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ CASP3, CASP8 И CASP9 ПОСЛЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИШЕМИИ ПОЧКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к молекулярной биологии и онкологии, и предназначено для прогнозирования развития острой почечной недостаточности (ОПН) после кратковременной ишемии почки. Из тканевых проб почки до ишемии выделяют тотальную РНК, получают кДНК, осуществляют амплификацию в режиме реального времени и рассчитывают относительную экспрессию генетических локусов CASP3, CASP8, CASP9 и АСТВ. При уровне относительной экспрессии генов  $RE_{CASP3}=(3,17\pm 0,9)*10^{-2}$ ;  $RE_{CASP8}=(5,87\pm 0,8)$

$*10^{-2}$  и  $RE_{CASP9}=(4,34\pm 1,6)*10^{-2}$  в ткани почек прогнозируют развитие ОПН в послеоперационный период. При уровне  $RE_{CASP3}=(6,08\pm 1,2)*10^{-2}$ ;  $RE_{CASP8}=(15,87\pm 3,6)*10^{-2}$  и  $RE_{CASP9}=(29,26\pm 9,5)*10^{-2}$  прогнозируют благоприятный послеоперационный период. Изобретение позволяет осуществить ранний прогноз осложнений развития ОПН у больных, перенесших лапароскопическую резекцию почки в условиях тепловой ишемии. 2 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

[Найдено 24.06.2016] [он-лайн]. Найдено из Интернет: URL: [http://www.rmj.ru/articles/urologiya/OSTRAYa\\_POChEChNAYa\\_NEDOSTATOCChNOSTY\\_1/](http://www.rmj.ru/articles/urologiya/OSTRAYa_POChEChNAYa_NEDOSTATOCChNOSTY_1/).



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/50* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2015134518/15, 17.08.2015

(24) Effective date for property rights:  
17.08.2015

Priority:

(22) Date of filing: 17.08.2015

(45) Date of publication: 10.10.2016 Bull. № 28

Mail address:

344037, g. Rostov-na-Donu, 14-ja linija, 63, RNIOL,  
nauchno-analiticheskij otdel, Ishoninoj O.G.

(72) Inventor(s):

Kit Oleg Ivanovich (RU),  
Vodolazhskij Dmitrij Igorevich (RU),  
Frantsiyants Elena Mikhajlovna (RU),  
Kutilin Denis Sergeevich (RU),  
Dimitriadi Sergej Nikolaevich (RU),  
Timoshkina Natalya Nikolaevna (RU),  
Gudueva Elena Nikolaevna (RU),  
SHvyrev Dmitrij Aleksandrovich (RU),  
Dvadnenko Konstantin Vladimirovich (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
uchrezhdenie "Rostovskij nauchno-  
issledovatel'skij onkologicheskij institut"  
Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj  
Federatsii (RU)

(54) **METHOD FOR PREDICTION OF DEVELOPING ACUTE RENAL FAILURE BY LEVEL OF EXPRESSION OF GENES CASP3, CASP8 AND CASP9 AFTER SHORT-TERM KIDNEY ISCHEMIA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, particularly to molecular biology and oncology, and is aimed at prediction of developing acute renal failure (ARF) after short-term kidney ischemia. From kidney tissue samples before the ischemia total RNA is extracted, cDNA is obtained, amplification is carried out in real time and calculation of relative expression of genetic loci CASP3, CASP8, CASP9 and ACTB. At the level of relative gene expression  $RE_{CASP3} = (3.17 \pm 0.9) \cdot 10^{-2}$ ;  $RE_{CASP8} = (5.87 \pm 0.8) \cdot 10^{-2}$  and

$RE_{CASP9} = (4.34 \pm 1.6) \cdot 10^{-2}$  in renal tissue developing of ARF in postoperative period is predicted. At the level of  $RE_{CASP3} = (6.08 \pm 1.2) \cdot 10^{-2}$ ;  $RE_{CASP8} = (15.87 \pm 3.6) \cdot 10^{-2}$  and  $RE_{CASP9} = (29.26 \pm 9.5) \cdot 10^{-2}$  a favourable postoperative period is predicted.

EFFECT: invention enables early prediction of ARF development complications in patients suffered laparoscopic resection of kidneys in the conditions of thermal ischemia.

1 cl, 2 tbl, 2 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к молекулярной биологии, онкологии, и касается способа прогнозирования вероятности развития острой почечной недостаточности у больных раком почки по уровню экспрессии генов CASP3, CASP8 и CASP9, подвергнутых операции лапароскопической резекции почки в условиях  
5 тепловой ишемии продолжительностью 15-20 мин.

Проблема острой почечной недостаточности (ОПН) - распространенного и чрезвычайно опасного состояния - является одной из самых актуальных при органосохраняющем хирургическом лечении больных раком почки с использованием тепловой ишемии. Тенденция к более широкому применению органосохраняющих  
10 операций при раке почки привела, в частности, к выполнению резекций опухолей сложных локализаций, требующих использования более продолжительной тепловой ишемии. По данным ряда авторов, даже при использовании стандартной продолжительности тепловой ишемии (до 20 минут) в раннем послеоперационном периоде возникают осложнения в виде развития ОПН в 20-30% случаев. Анализ научной  
15 литературы показал, что до настоящего времени не описаны методы, позволяющие прогнозировать вероятность развития ОПН у пациентов после проведения резекции почки в условиях тепловой ишемии продолжительностью 15-20 минут.

Стандартные методы (не молекулярно-биологические методы) позволяют адекватно оценить уже сформировавшуюся ОПН по клиническим признакам (олигоанурия,  
20 интоксикация) и биохимическим параметрам (повышению азота мочевины, креатинина, остаточного азота, увеличению уровня калия, снижению кальция и натрия (см. Смирнов А.В., Каюков И.Г., Дегтярева О.А., Добронравов В.А., Румянцев А.Ш., Раффари Т.Н., Зверьков Р.В. Проблемы диагностики и стратификации тяжести острого повреждения почек // Нефрология, 2009. - Том 13. - №3. - С. 9-18).

Измерение объема мочи - мало специфичная характеристика функционального  
25 состояния почек, так как объем выделяемой мочи зависит от целого ряда факторов (см. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs // The Second International Consensus Conference of the Acute  
30 Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care 2004; 8(4): R204-212).

В настоящее время определение уровня креатинина в моче и сыворотке крови является наиболее распространенным тестом функционального состояния почек, отражающим  
35 скорость клубочковой фильтрации (СКФ). Эти параметры не имеют альтернатив для оценки почечной функции в острой ситуации (см. Coca SG, Parikh CR. Urinary biomarkers for acute kidney injury: perspectives on translation. Clin J Am Soc Nephrol 2008; 3(2):481-490).

При проведении лапароскопической резекции почки в условиях тепловой ишемии в течение 15-20 минут определение риска развития ОПН и оценка степени тяжести повреждения могут дать возможность проведения своевременной консервативной  
40 нефропротективной терапии или, при необходимости, ранней заместительной почечной терапии.

Основой патогенеза ОПН после резекции почки в условиях тепловой ишемии является ишемия почек. Ишемия приводит к повреждению тканей в результате реализации  
45 процесса, известного, как ишемический каскад. Повреждение является результатом увеличения концентрации продуктов обмена веществ, дестабилизации клеточных и митохондриальных мембран, и в конечном итоге утечки протеолитических ферментов в клетку и окружающие ткани. Восстановление кровоснабжения ишемизированных тканей может привести к дополнительному повреждению, известному как реперфузионное повреждение, которое может быть более разрушительным, чем

вследствие исходной ишемии. Реперфузия возвращает кислород обратно в ткани, в результате чего производится больше свободных радикалов и активных форм кислорода, которые повреждают клетки (см. Sims N.R., Muyderman H. (2010). "Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke". *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (1): 80-91).

5 Разрушение митохондрий приводит к выбросу факторов апоптоза в клетку, инициируется каспаз-зависимый апоптозный каскад, в результате которого клетки могут "совершать самоубийство" (см. Sims N.R., Muyderman H. (2010). "Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke". *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (1): 80-91).

Поэтому в качестве прогностических маркеров вероятности развития ОПН адекватно  
10 использование показателя экспрессии генов эффекторных (CASP3) и инициаторных каспаз (CASP8 и CASP9).

Каспаза-3 активируется при апоптозе клетки как по внешнему, так и по внутреннему (митохондриальному) пути (см. Salvesen GS (January 2002). "Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows". *Cell Death Differ.* 9 (1): 3-5). Прокаспаза-3 практически не  
15 имеет активности, пока не расщепляется инициаторной каспазой после получения апоптического сигнала. Активация по внешнему (рецепторному) пути запускается каспазой-8. При активации по митохондриальному пути в цитоплазму высвобождаются следующие вещества: цитохром С и прокаспаза-9. Цитохром С в цитоплазме клетки участвует в формировании апоптосомы вместе с белком Araf-1. Предварительно Araf-1  
20 претерпевает конформационные изменения в результате реакции, протекающей с затратой энергии АТФ. В итоге происходит олигомеризация субъединиц трансформированного белка Araf-1 с участием цитохрома С и прокаспазы-9. Так образуется апоптосома, активирующая каспазу-9. Зрелая каспаза-9 связывает и активирует прокаспазу-3 с образованием эффекторной каспазы-3 (см. Katunuma N,  
25 Matsui A, Le QT, Utsumi K, Salvesen G, Ohashi A (2001). "Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysosomes and its biological significances in apoptosis". *Adv. Enzyme Regul.* 41 (1): 237-50).

Из патентных источников известен «Способ диагностики и/или прогнозирования острого повреждения почек» (см. заявка RU 2012106742/15, приоритет от 03.09.2010 г.,  
30 дата публикации заявки: 10.10.2013, бюл. №28), в котором для диагностирования и/или прогнозирования острого повреждения почек определяют уровень экспрессии по меньшей мере одной микроРНК, выбранной из miR-127, miR-126, miR-210 и miR-101, и сравнивают упомянутый уровень экспрессии со значением контроля, где изменение упомянутого уровня свидетельствует об остром повреждении почек.

35 В изобретении «Способ прогнозирования развития острой почечной недостаточности при геморрагической лихорадке с почечным синдромом» (см. Авторское свидетельство SU 1704082 A1, G01N 33/50, опубликовано 07.01.1992) авторы в плазме крови определяют содержание олигобиополимерсвязанных сиаловых кислот и при значении этого показателя 206 мг/л и более прогнозируют вероятность развития острой почечной  
40 недостаточности. Следует отметить, что сиаловые кислоты не являются специфичными соединениями для диагностики нарушения функции почек, а лишь сигнализируют о наличии в организме воспалительного процесса.

Оба эти способа не применялись для диагностики ОПН у больных раком почки.

Изобретение «Способ прогнозирования развития острой почечной недостаточности  
45 по уровню экспрессии генов CASP3, CASP8 и CASP9 после кратковременной ишемии почки» является новым, так как данная панель генов ранее не использовалась для прогнозирования развития ОПН после лапароскопической резекции почки в условиях тепловой ишемии больных почечно-клеточным раком.

Техническим результатом заявляемого изобретения является создание нового, точного способа для определения вероятности развития ОПН после лапароскопической резекции почки в условиях тепловой ишемии продолжительностью 15-20 мин.

5 Сущность заявляемого способа заключается в вычислении уровня относительной экспрессии генов (RE) CASP3, CASP8 и CASP9 в тканях почки по результатам данных количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) с разработанными нами высокоспецифичными праймерами. Уровень экспрессии данных генов отличается у пациентов с ОПН и пациентов, у которых ОПН не развивается, а также положительно коррелирует с уровнем креатинина. У пациентов с уровнем относительной экспрессии  
 10 генов  $RE_{CASP3}=(3,17\pm 0,9)*10^{-2}$ ;  $RE_{CASP8}=(5,87\pm 0,8)*10^{-2}$  и  $RE_{CASP9}=(4,34\pm 1,6)*10^{-2}$  в ткани почек в послеоперационный период развивалась ОПН, уровень креатинина превышал предоперационный как минимум на 50%. Данные экспрессионные интервалы для гена каспазы 3 ( $2,3*10^{-2}\leq RE_{CASP3}\leq 4,0*10^{-2}$ ), для гена каспазы 8 ( $5,0*10^{-2}\leq RE_{CASP8}\leq 6,7*10^{-2}$ )  
 15 и для гена каспазы 9 ( $2,7*10^{-2}\leq RE_{CASP9}\leq 8,0*10^{-2}$ ) имеют прогностическое значение, попадание в эти интервалы значений относительной экспрессии соответствующих генов, будет свидетельствовать о 95% вероятности развития ОПН у пациентов после лапароскопической резекции почки в условиях тепловой ишемии продолжительностью  
 20 15-20 мин.

У пациентов с уровнем относительной экспрессии генов  $RE_{CASP3}=(6,08\pm 1,2)*10^{-2}$ ;  $RE_{CASP8}=(15,87\pm 3,6)*10^{-2}$  и  $RE_{CASP9}=(29,26\pm 9,5)*10^{-2}$  в ткани почек в послеоперационный период ОПН не развивалась, а уровень креатинина не превышал предоперационный  
 25 более чем на 50%. Данные экспрессионные интервалы для гена каспазы 3 ( $4,8*10^{-2}\leq RE_{CASP3}\leq 7,3*10^{-2}$ ), для гена каспазы 8 ( $12,3*10^{-2}\leq RE_{CASP8}\leq 19,4*10^{-2}$ ) и для гена каспазы 9 ( $19,8*10^{-2}\leq RE_{CASP9}\leq 38,8*10^{-2}$ ) имеют прогностическое значение, попадание в эти интервалы значений относительной экспрессии соответствующих генов,  
 30 будет свидетельствовать о 95% вероятности отсутствия ОПН у пациентов после лапароскопической резекции почки в условиях тепловой ишемии продолжительностью 15-20 мин.

Заявленный анализ основан на определении относительной экспрессии перечисленных выше генов, предварительно нормализованных относительно референтного локуса АСТВ, и сравнении полученных значений относительной экспрессии генов в биоптатах  
 35 тканей почки, взятых до ишемии с установленными нами экспрессионными интервалами.

Способ иллюстрируется таблицами 1 и 2.

В таблице 1 представлены последовательности прямого и обратного праймеров для ПЦР-РВ.

40

45

Таблица 1

Способ прогнозирования развития острой почечной недостаточности по уровню экспрессии генов *CASP3*, *CASP8* и *CASP9*.

Наименование праймеров	№ NCBI GenBank	Хромосомная локализация	Последовательность	Т отжига, °С
<i>CASP3</i>	NM_032991.2	4q34	F:CTGGAATATCCCTGGACAACA GT R:TCGACATCTGTACCAGACCGA	60
<i>CASP8</i>	NM_001228.4	2q33-q34	F:CTGAAGCAAACAGCCAGTGC R:GACCTCAATTCTGATCTGCTC AC	60
<i>CASP9</i>	NM_001229.4	1p36.21	F:TGAGACCCTGGACGACATCT R:TCCCTTTCACCGAAACAGCA	60
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	7p22	F:AAC CGC GAG AAG ATG ACC C R:AGC ACA GCC TGG ATA GCA AC	60

В таблице 2 представлены данные относительной экспрессии генов *CASP3*, *CASP8* и *CASP9* в ткани почек пациентов (биоптат получен до ишемии почки), у которых после хирургического вмешательства развивалась и не развивалась ОПН. Также в таблице представлены данные об изменении уровня креатинина у этих пациентов (до операции и после).

Таблица 2

Способ прогнозирования развития острой почечной недостаточности по уровню экспрессии генов *CASP3*, *CASP8* и *CASP9*.

Наименование гена	(RE) у пациентов с ОПН, *10 <sup>-2</sup>	Изменение уровня креатинина у пациентов с ОПН	(RE) у пациентов без ОПН, *10 <sup>-2</sup>	Изменение уровня креатинина у пациентов без ОПН
<i>CASP3</i>	3,17±0,9	на 125,8%	6,08±1,2	на 26,3%
<i>CASP8</i>	5,87±0,8		15,87±3,6	
<i>CASP9</i>	4,34±1,6		29,26±9,5	

Заявляемый способ осуществляется следующим образом.

На первом этапе во время проведения лапароскопической резекции почки с использованием тепловой ишемии, до остановки кровоснабжения в резецируемой почки с помощью пистолета Pro Mag Ultra иглой 16 G выполняют пункционную биопсию среднего сегмента резецируемой почки, забирая столбик ткани интактной паренхимы. Образцы для транспортировки в лабораторию и хранения замораживают в жидком азоте.

Фрагменты ткани измельчают скальпелем и/или ножницами, дополнительно растирают в фарфоровых ступках в присутствии лизирующего раствора, содержащего 4 М гуанидин тиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,5% саркозил и 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Затем в лизат добавляют 1 М цитрат Na pH 4,0, кислый фенол и смесь хлороформ/

изоамиловый спирта, перемешивают на вортексе и охлаждают образцы при 0°C в течение 15 мин.

Дальнейшее выделение РНК из тканей проводят по методу по P. Chomczynski & N. Sacchi (2006) (см. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc. 2006; 1(2):581-5).

Выделенная РНК обрабатывается ДНКазой. Перед проведением реакции обратной транскрипции для проверки качества выделенной РНК проводят электрофорез в 2% геле агарозы по методу Masek T. et al. (2005). Также перед проведением реакции обратной транскрипции необходимо измерить концентрацию полученных препаратов РНК на флюориметре и нормализоваться ее до 2 нг/мкл. Синтез кДНК можно проводить с использованием коммерческих наборов, основанных на применении обратной транскриптазы M-MuLV Reverse Transcriptase и случайных праймеров (random hexamer). Реакцию обратной транскрипции проводят при 37°C в течение 30 минут.

Анализируемые последовательности генетических локусов амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1-кратный ПЦР-буфер и 0,1 единица активности ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus*, краситель EVA-Green и по 230 нМ прямого и обратного праймеров для референтного гена (актина, АСТВ) или гена-мишени. Прямые и обратные праймеры были разработаны с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank (таблица 1).

Количественную ПЦР-РВ амплификацию проводили на термоциклере в соответствии с инструкциями производителя по следующей программе. Первичная денатурация: t=95°C в течение 3 мин. 40 циклов: t=95°C в течение 10 с, t=58°C в течение 30 с, t=72°C в течение 15 с. На матрице кДНК опытной пробы (биоптат почки, до ишемии) одновременно определяли сигналы, продуцируемые амплификатами локусов CASP3, CASP8, CASP9 и референтного АСТВ, каждого в трех повторностях.

Относительная экспрессия генетических локусов вычислялась следующим образом:

- рассчитывали медиану C<sub>t</sub> по трем повторам для каждого целевого локуса и референтного АСТВ,

- далее рассчитывали величину ΔC<sub>t</sub> (ΔC<sub>t</sub>=C<sub>t</sub> (исследуемого гена)-C<sub>t</sub> (АСТВ))

- относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле  $2^{-\Delta C_t}$ .

При уровне относительной экспрессии генов RE<sub>CASP3</sub>=(3,17±0,9)\*10<sup>-2</sup>; RE<sub>CASP8</sub>=(5,87±0,8)\*10<sup>-2</sup> и RE<sub>CASP9</sub>=(4,34±1,6)\*10<sup>-2</sup> в ткани почек прогнозируют развитие ОПН в послеоперационный период. При уровне относительной экспрессии генов RE<sub>CASP3</sub>=(6,08±1,2)\*10<sup>-2</sup>; RE<sub>CASP8</sub>=(15,87±3,6)\*10<sup>-2</sup> и RE<sub>CASP9</sub>=(29,26±9,5)\*10<sup>-2</sup> в ткани почек прогнозируют благоприятный послеоперационный период (без развития ОПН).

Заявленный способ включает следующие приемы: выделение тотальной РНК из тканевых проб с помощью метода гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформной экстракции; определение относительной экспрессии генетических локусов методом ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA-Green и специфичных праймеров на матрице синтезированной кДНК; анализ первичных данных с помощью программного продукта амплификатора; расчет экспрессии гена на основании соотношения сигналов, продуцируемых амплификатами изучаемой и референтной последовательностей, и обработка данных на соответствие значениям относительной экспрессии, характерной для групп пациентов с ОПН и без развития ОПН.

Приводим примеры клинического применения способа.

Пример №1. Больной С. 63 лет. Поступил в урологическое отделение ФГБУ РНИОИ МЗ РФ 14.07.2014 г с диагнозом: опухоль верхне-среднего сегмента левой почки. Сопутствующий диагноз: Гипертоническая болезнь II-ст., риск 4. ХСН 0-ст.

5 Диагноз установлен на основании данных МРТ органов брюшного пространства, при котором в верхне-среднем сегменте левой почки определяется образование 43×32 мм с выраженным интрапаренхиматозным ростом, вплотную прилежащее к средней и нижней группе чашечек. По данным экскреторной урографии, реносцинтиграфии - секреторная и экскреторная функция обеих почек не нарушена, пассаж мочи по верхним мочевыводящим путям с обеих сторон не нарушен.

Сложность предполагаемой резекции почки по шкале RENAL оценена в 8 баллов. Уровень креатинина крови до операции составил - 64 мкмоль/л.

Больному показано выполнение лапароскопической резекции почки.

15 17.07.2014 г. больного уложили в литотомическое положение, выполнили общую эндотрахеальную анестезию. Затем цистоскопом с рабочим каналом выполнили уретроцистоскопию, катетеризацию обоих мочеточников по стандартной методике.

Мочеточниковые катетеры, маркированные отдельно как «правый» и «левый», провели в полостную систему обеих почек. Затем установили уретральный катетер. К последнему нитью зафиксировали оба мочеточниковых катетера.

20 Следующим этапом больного уложили на бок для выполнения резекции почки. Резекцию почки осуществили лапароскопическим доступом в условиях тепловой ишемии почки (см. патент РФ №2532897, опубл. 10.11.2014, бюл. №31). До остановки кровоснабжения почки выполнена пункционная биопсия пистолетом Pro Mag Ultra иглой 16 G интактной паренхимы среднего сегмента левой почки. Продолжительность тепловой ишемии составила 20 мин, объем кровопотери 50 мл.

Через 16 часов после операции диурез по мочеточнику из резецированной левой почки составил 950 мл, из контралатеральной правой почки - 1300 мл (с момента операции).

30 Относительная экспрессия генетических локусов CASP3, CASP8 и CASP9 в биоптатах, полученных во время операции, составляла  $5,74 \cdot 10^{-2}$ ,  $19,45 \cdot 10^{-2}$  и  $19,95 \cdot 10^{-2}$  соответственно, что позволило прогнозировать послеоперационный период без осложнений.

18.07.2014 г. Мочеточниковые катетеры и уретральный катетер были удалены.

35 Уровень креатинина крови в первые трое суток после операции не превышал 66 мкмоль/л, т.е. прирост уровня креатинина не превысил 50% от исходного уровня.

Получен результат гистологического исследования №56095-56104/14 - умеренно-дифференцированный светло-клеточный почечно-клеточный рак без инвазии фиброзной и жировой капсулы почки. Хирургический край резекции опухоли отрицательный.

40 Установлен заключительный диагноз: рак левой почки T1bN0M0 G2, кл. гр. 3.

Послеоперационный период протекал без осложнений.

Больной выписан на 9-е сутки после операции.

Пример №2. Больной К. 54 лет, поступил в урологическое отделение ФГБУ РНИОИ МЗ РФ 11.09.2014 г. с диагнозом: опухоль средне-нижнего сегмента правой почки.

45 Сопутствующий диагноз: Гипертоническая болезнь II-ст., риск 4. Дисциркуляторная энцефалопатия II-ст. ХСН 0-ст.

Диагноз установлен на основании данных МРТ органов брюшного пространства, при котором в средне-нижнем сегменте правой почки определяется образование 41×38 мм с преимущественно интрапаренхиматозным ростом, вплотную прилежащее к средней

группе чашечек. По данным экскреторной урографии, реносцинтиграфии - секреторная и экскреторная функция обеих почек не нарушена, пассаж мочи по верхним мочевыводящим путям с обеих сторон не нарушен.

Сложность предполагаемой резекции почки по шкале RENAL оценена в 8 баллов.

5 Уровень креатинина крови до операции составил - 92,7 мкмоль/л.

Больному показано выполнение лапароскопической резекции почки.

15.09.2014 г. больного уложили в литотомическое положение, выполнили общую эндотрахеальную анестезию. Затем цистоскопом с рабочим каналом выполнили уретроцистоскопию, катетеризацию обоих мочеточников по стандартной методике.

10 Мочеточниковые катетеры, маркированные отдельно как «правый» и «левый», провели в полостную систему обеих почек. Затем установили уретральный катетер. К последнему нитью зафиксировали оба мочеточниковых катетера.

Следующим этапом больного уложили на бок для выполнения резекции почки.

15 Резекцию почки осуществили лапароскопическим доступом в условиях тепловой ишемии почки (см. патент РФ №2532897, опублик. 10.11.2014, бюл. №31). До остановки кровоснабжения почки выполнена пункционная биопсия пистолетом Pro Mag Ultra иглой 16 G интактной паренхимы среднего сегмента правой почки. Продолжительность тепловой ишемии составила 15 мин, объем кровопотери 50 мл.

20 Через 16 часов после операции диурез по мочеточнику из резецированной правой почки составил 350 мл, из контралатеральной левой почки - 1100 мл (с момента операции). Последующие трое суток у больного сохранялась полиурия до 5 литров мочи.

25 Относительная экспрессия генетических локусов CASP3, CASP8 и CASP9 в биоптатах, полученных во время операции составляла  $3,08 \cdot 10^{-2}$ ,  $5,08 \cdot 10^{-2}$  и  $3,67 \cdot 10^{-2}$  соответственно, что позволило прогнозировать развитие ОПН в послеоперационный период.

16.09.2014 г. мочеточниковые катетеры были удалены.

Уровень креатинина крови в первые сутки после операции - 111,5 мкмоль/л, на вторые - 174,5 мкмоль/л, на третьи - 122,5 мкмоль/л, на седьмые - 94,1 мкмоль/л.

30 Основываясь на показателях шкалы RIFLE, у больного на вторые сутки после операции констатировано развитие острой почечной недостаточности (повышения уровня креатинина крови в 1,5 раза от исходного уровня), что ранее было прогнозировано по данным экспрессии генов CASP3, CASP8 и CASP9.

35 Получен результат гистологического исследования №70799-80814/14 - умеренно-дифференцированный светло-клеточный почечно-клеточный рак с частичной инвазией фиброзной капсулы почки без инвазии жировой капсулы. Хирургический край резекции опухоли отрицательный. Установлен заключительный диагноз: рак правой почки T1bN0M0 G2, кл. гр. 3.

40 Учитывая осложнения в раннем послеоперационном периоде, в виде острой почечной недостаточности, больному была проведена дополнительная консервативная нефропротективная терапия.

Больной выписан в удовлетворительном состоянии на 12-е сутки после операции.

45 Предлагаемым способом был осуществлен прогноз развития острого повреждения почек 20 больным. Критериями эффективности проведенного лечения считали отсутствие в раннем послеоперационном периоде осложнений, связанных с функцией почек - повышение содержания в сыворотке крови креатинина более чем на 50% от исходных значений.

Заявляемый способ является экономически оправданным, осуществляется в условиях стандартной лаборатории молекулярной биологии (ПЦР), без использования

специального дорогостоящего оборудования; обладает высокой чувствительностью и специфичностью, универсален, его осуществление возможно с операционными биоптатами, регистрацию результатов производят однократно в конце исследования, реализация способа занимает менее 10 часов.

5

#### Формула изобретения

Способ прогнозирования развития острой почечной недостаточности по уровню экспрессии генов CASP3, CASP8 и CASP9 после кратковременной ишемии почки, заключающийся в том, что выделяют тотальную РНК из тканевых проб почки до ишемии, получают кДНК путем обратной транскрипции на матрице РНК, осуществляют амплификацию в режиме реального времени - ПЦР-РВ с использованием высокоспецифичных праймеров для генов CASP3, CASP8, CASP9 и АСТВ, проводят анализ первичных данных с помощью программного продукта амплификатора; рассчитывают относительную экспрессию генетических локусов CASP3, CASP8, CASP9 и АСТВ и при уровне относительной экспрессии генов  $RE_{CASP3}=(3,17\pm 0,9)*10^{-2}$ ;  $RE_{CASP8}=(5,87\pm 0,8)*10^{-2}$  и  $RE_{CASP9}=(4,34\pm 1,6)*10^{-2}$  в ткани почек прогнозируют развитие ОПН в послеоперационный период, при уровне относительной экспрессии генов  $RE_{CASP3}=(6,08\pm 1,2)*10^{-2}$ ;  $RE_{CASP8}=(15,87\pm 3,6)*10^{-2}$  и  $RE_{CASP9}=(29,26\pm 9,5)*10^{-2}$  в ткани почек прогнозируют благоприятный послеоперационный период.

25

30

35

40

45