



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62672 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 5/0444 (2006.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЗАТРИМКИ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО РОЗВИТКУ ПЛОДУ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ГЕНОМУ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ НОВОНАРОДЖЕНИХ

1

2

(21) u201101428

(22) 08.02.2011

(24) 12.09.2011

(46) 12.09.2011, Бюл.№ 17, 2011 р.

(72) КОЧЕРГА ЗОРЯНА РОСТИСЛАВІВНА, КОВАЛЬЧУК ЛАРИСА ЄВГЕНІВНА

(73) КОЧЕРГА ЗОРЯНА РОСТИСЛАВІВНА, КОВАЛЬЧУК ЛАРИСА ЄВГЕНІВНА

(57) Спосіб діагностики затримки внутрішньоутробного розвитку плоду за показниками функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів

периферійної крові новонароджених за активністю функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові, який включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, який **відрізняється** тим, що додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів крові з визначенням індексів морфологічно змінених ядер та мікроядер, за відображенням яких визначають порушення імунотетичного статусу новонародженого, генетичну нестабільність і схильність до захворювань.

Корисна модель належить до медицини, а саме до неонатології, і може бути використана для визначення спадкової схильності до виникнення та ступеня важкості затримки внутрішньоутробного розвитку у новонароджених за активністю функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові.

Відомо, що всі клітини людини містять однаково генетичну інформацію, яка в процесі розвитку і життєдіяльності зчитується вибірково, одночасно всі гени ніколи не працюють. Включення або виключення певних генів при збереженні всієї останньої інформації контролюється епігенетичними механізмами, які детермінують майбутнє клітини: її диференціювання, види синтезованих білків [Sims R. J., Nishioka K., Reinberg D. Histone lysine methylation; a signature for chromatin function // Trends Genet. - 2003. - V. 19. - P. 2117-2124]. Епігенетичні феномени проявляються на будь-якому з етапів реалізації спадкової інформації - від транскрипції ДНК до трансляції РНК і процесингу білкової молекули [Лебедев И. Н., Пузырев В. П. Эпигенетические аспекты безопасности вспомогательных репродуктивных технологий // Генетика. - 2007. - Т. 43, № 9. - С. 1157-1171, Newburger P. E., Subrahmanyam Y. V., Weissman S. M. Global analysis of neutrophil gene expression // Cur. Opin. Haematol. - 2000 - № 7. - V.1. - P. 16-20]. Епігенетичні модифікації ступеня компактизації хроматину, стан ядерцевого апарату соматичних клітин нейтрофільних гранулоцитів периферійної

крові (НГПК) відображають функціональний і структурний аспекти гомеостазу.

Найбільш близьким до корисної моделі, що заявляється, є «Спосіб ранньої діагностики функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень», що включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, причому додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів крові з визначенням індексів хроматизації (співвідношення ядер з перевагою еухроматину та ядер з гетерохроматином), ядерцевого, гетеропікнотичної Х-хромосоми та морфологічно змінених ядер (Патент України на корисну модель № 26789 від 10.10.2007 р. Бюл. № 16. Заявка № u2007 04785 від 28.04.2007 р. Чернюк Н. В., Ковальчук Л. Є, Палійчук І. В.). Проте даний спосіб не дає змогу встановити спадкову схильність до затримки внутрішньоутробного розвитку плоду (ЗВУР).

В основу корисної моделі «Спосіб діагностики затримки внутрішньоутробного розвитку плоду за показниками функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові новонароджених» поставлено задачу створення об'єктивного способу визначення спадкової схильності до виникнення затримки внутрішньоутробного розвитку плоду шляхом лабораторного аналізу мазку крові новонародженого та цитогенетичного дослідження нейтрофільних гранулоцитів з визначен-

(19) UA (11) 62672 (13) U

ням індексів морфологічно змінених ядер і мікроядер, які відображають порушення імуногенетичного статусу новонародженого, генетичну нестабільність і схильність до захворювань. Це дозволить отримати об'єктивну оцінку функціональної активності генів на різних етапах реалізації спадкової інформації та встановити особливості функціонального стану геному (ФСГ) НГПК новонароджених із ЗВУР та здорових дітей за індексами хроматизації (IX), статевого хроматину (СХ), ядерцевих (ЯІ) та патологічних ядер (ПЯ).

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення спадкової схильності за активністю функціонального стану геному НГПК, що включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів крові з визначенням індексів морфологічно змінених ядер (патологічних ядер) та мікроядер.

Поліфункціональна здатність нейтрофільних гранулоцитів зумовлена активною експресією генів, продукти яких забезпечують продукцію ферментів (кислі протеази, мієлопероксидаза). Достовірних змін відносного показника нейтрофілів серед загальної кількості формених елементів у периферійній крові дітей із ЗВУР порівняно з таким у здорових новонароджених нами не виявлено (відповідно $53,33 \pm 2,70$ і $54,95 \pm 3,30$ у дівчаток, та $52,63 \pm 5,48$ і $54,43 \pm 3,16$ у хлопчиків). Водночас зміни структури хроматину, які засвідчують активність реалізації спадкової інформації, підтвердили інтенсифікацію транскрипції та трансляції. Це доводить перевага IX, який засвідчує активність транскрипції, у новонароджених дітей порівняно з таким у новонароджених із ЗВУР (відповідно $0,98 \pm 0,02$ та $0,95 \pm 0,03$ у дівчаток і $0,97 \pm 0,01$ та $0,95 \pm 0,02$ у хлопчиків).

Отримані дані засвідчили, що активність першого етапу реалізації генетичної інформації - транскрипції була вищою у новонароджених дітей. Саме такий механізм лежить в основі порушення контролю транскрипції. Закономірним продовженням дослідження ФСГ був аналіз регуляторних сайтів Х-хромосоми за показником СХ з урахуванням статевих особливостей. За результатами індексу СХ доведено, що у новонароджених дівчаток він у 1,2 рази перевищував аналогічний показник у здорових новонароджених зі ЗВУР, у хлопчиків навпаки - СХ у здорових новонароджених в 2,3 рази менший, ніж аналогічний показник у новонароджених із ЗВУР.

Показником другого етапу реалізації спадкової інформації - трансляції (рРНК) цього процесу є активність ядерцевого апарату, де здійснюється транскрипція генів, які кодують рибосомні білки [Lachner M., O'Sullivan R. J., Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation // J. Cell Sci. - 2003. - V. 116. - P. 2117-2124]. Оскільки структурно-функціональні зміни ядерця є важливим компонентом реакції клітин на стрес і зумовлюють їх адаптацію до зовнішніх впливів, ЯІ може бути об'єктивним діагностичним маркером активності трансляційного апарату. Встановлено, що частота клітин з ядерцями в усіх новонароджених

дівчаток ($4,48 \pm 0,34$) суттєво не відрізняється, а у здорових новонароджених хлопчиків ($4,43 \pm 0,43$) відмічено перевагу даного показника в 1,3 рази над таким у дітей із ЗВУР $4,62 \pm 0,44$ і $3,48 \pm 0,31$ (у дівчаток і хлопчиків відповідно). Функціональна активність геному залежить і від стану каріолеми, з якою з'єднується ДНК хроматину для наступної деспіралізації. Оскільки морфологічні зміни компонентів ядра впливають на конденсацію хроматину і транскрипцію, закономірним було зростання частоти патологічних ядер (ПЯ) у всіх новонароджених із ЗВУР порівняно з такою у здорових новонароджених дівчаток і хлопчиків, відповідно у 1,1, 1,2 рази.

Об'єктивним критерієм ступеня порушення структури хромосомного апарату НГПК у новонароджених із ЗВУР є збільшення частоти клітин мікроядрами у дівчаток ($1,02 \pm 0,03$) та хлопчиків ($1,05 \pm 0,04$) порівняно із здоровими новонародженими (відповідно $0,12 \pm 0,06$ та $0,23 \pm 0,05$).

Для виявлення особливостей підтримання функціональної єдності всієї системи реалізації спадкової інформації проведено кореляційний аналіз. Визначено обернений зв'язок між IX та HI. Характерним для хлопчиків із ЗВУР є посилення позитивного взаємозв'язку між IX та HI ($r = 0,2$), яке перевищує таке у здорових новонароджених у 2,5 рази. У хлопчиків цієї групи із ЗВУР маркером дисрегуляторного процесу синтезу і РНК були слабкі позитивні кореляції між IX та СХ. У цих же хлопчиків, як пристосувальний процес до підтримки необхідної активності функціонального стану геному, є сильна позитивна кореляція між IX та ПЯ ($r = 0,7$; $p < 0,01$). Особливістю функціонального стану геному у дівчаток із ЗВУР є порушення регуляторних взаємозв'язків між активністю синтезу рРНК (HI) і СХ.

Набір хворих проведений на базі обласного перинатального центру, визначення ступеня порушень спадкового апарату соматичних клітин проведено на кафедрі медичної біології з курсом медичної генетики Івано-Франківського національного медичного університету.

Обстежено 75 новонароджених, віком 1-3 дні. Обстежені 30 новонароджених мали затримку внутрішньоутробного розвитку, 35 було здорових новонароджених дітей, з них - 33 дівчинки і 32 хлопчики.

Даний спосіб здійснюють наступним чином.

Для цитогенетичного дослідження у пацієнтів забирали 0,5 мл периферійної крові, виготовляли мазки крові, які після висушування доставлялись у генетичну лабораторію ЦНДЛ. Забарвлення ядер здійснювали за Фольгеном у модифікації Л. Є. Ковальчук і співавт. Функціональну активність геному встановлювали за морфологічними особливостями інтерфазних ядер нейтрофільних гранулоцитів. За розробленою нами методикою проводили і комплексний аналіз чотирьох індексів їх каріограми (хроматизації, ядерцевий, гетеропікнотичної Х-хромосоми, морфологічно змінених ядер).

Препарати досліджували методом світлової мікроскопії за допомогою оптико-електронного комплексу Метаскан-2. У кожному препараті ви-

вчали по 100 інтерфазних ядер з наступною оцінкою їх структурних характеристик. Частоту патологічних ядер реєстрували за співвідношенням кількості нормальних ядер та таких зі зміненою структурою каріоплазми або каріолеми.

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень здійснювали за допомогою персонального комп'ютера та ліцензованих прикладних програм для роботи з електронними таблицями Microsoft Excel і пакета "STATISTIKA 7,0".

Корисна модель дозволить об'єктивно відобразити особливості функціонального стану спадкового апарату новонароджених із ЗВУР за комплексом каріологічних показників інтерфазних ядер НГПК. Виявлені нами зміни ФСГ нейтрофільних гранулоцитів засвідчують єдність генетичних та епігенетичних механізмів контролю структурного і функціонального аспектів гомеостазу в процесі росту і розвитку дитячого організму.