



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108521** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61B 10/00
G01N 33/574 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2015 12522	(72) Винахідник(и):	Грабовий Олександр Миколайович (UA), Антонюк Сергій Анатолійович (UA), Савчин Тарас Михайлович (UA)
(22) Дата подання заявки:	18.12.2015	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.07.2016		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.07.2016, Бюл.№ 14		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЧАСТКИ ФУНКЦІОНАЛЬНО АКТИВНИХ КЛІТИН У СКЛАДІ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИН ТОВСТОЇ КИШКИ

(57) Реферат:

Спосіб визначення частки функціонально активних клітин у складі епітеліальних пухлин товстої кишки включає визначення низки параметрів, які характеризують форму і розміри ядра клітини, та здійснення розподілу клітин на морфо-функціональні типи: з функціональними ядрами, у стані апоптозу, у стані мітозу, старіючі. Пухлинні клітини ранжують за вмістом ДНК у ядрі з кроком де $1=2c$ (диплоїдні), виходячи з площі перерізу і вмісту ДНК та обчислюють індекс нормальності ядра пухлинних клітин.

UA 108521 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до патологічної анатомії та гістології, та призначена для визначення частки функціонально активних клітин у складі епітеліальних пухлин товстої кишки за об'єктивними ознаками стану ядер функціонально активних клітин (домінуючий пул, що визначає потенції пухлини) і таких, що зазнали патологічних змін та є нежиттєздатними.

Відомий спосіб каріометрії на цифрових гістологічних зображеннях ґрунтується на можливості візуального сприйняття інформації фахівцем-гістологом [1]. Однак, використання цього способу має певні труднощі. Діагностичні можливості таких досліджень обмежені, оскільки органи зору людини, за психофізичними законами Вебера-Фехнера та Стівенса, сприймають зміни в медичних зображеннях лише в логарифмічній прогресії. Проблемним питанням візуального підходу є обмеженість його діагностичної ефективності, суттєва залежність від досвіду та психоемоційного стану самого лікаря, і те, що при рутинній клінічній практиці це займає багато часу [2].

За прототип вибрано спосіб морфометричної оцінки стану ядер клітин (Nuclear Morphometric Analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities / E.C. Filippi-Chiela, M.M. Oliveira, B. Jurkovski [et al.] // PLoS ONE.-2012. - Vol. 7, № 8. - P. e42522), за яким визначають низку параметрів, що характеризують форму і розміри ядра клітини та здійснюють розподіл клітин на морфо-функціональні типи: з функціональними ядрами, у стані апоптозу, у стані мітозу, старіючі та інші.

Позитивним у прототипі є те, що спосіб дозволяє ідентифікувати клітини з інтерфазними ядрами, а також клітини у стані поділу, використовуючи тільки морфологію ядра без застосування спеціальних методів, а також визначити клітини, що зазнали патологічних змін ядра.

Недоліком прототипу є його обмежена придатність та незручність для застосування в рутинній морфологічній діагностиці.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення частки функціонально активних клітин у складі епітеліальних пухлин товстої кишки шляхом розділення цих клітин за питомим вмістом ДНК у ядрі на три різні функціональні групи: з умовно нормальними ядрами (функціонально активні, життєздатні); з ядрами в стані хроматолізу; з гіперхромними ядрами (у стані пікнозу), що дасть можливість виділити частину функціонально активних клітин у складі епітеліальних пухлин товстої кишки.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

На препаратах, забарвлених за Ейнарсоном, визначають вміст ДНК в ядрах клітин та вимірюють площу перетину ядра.

Дослідна вибірка клітин пухлини поділяють на N рангів (R), з кроком, що дорівнює середньому вмісту ДНК у ядрах лімфоцитів: R1 - до 1, R2-1-2, R3-2-3, і так далі.

На основі цього обчислюють індекс нормальності ядра кожної клітини (N_i):

$$N_i = \frac{NDNA_i \times NArea_R}{NDNA_R \times NArea_i}, (1)$$

де: N_i - індекс нормальності ядра досліджуваної клітини,

$NDNA_i$ - вміст ДНК у ядрі досліджуваної клітини,

$NDNA_R$ - середній вміст ДНК у ранзі R, до якого належить клітина,

$NArea_i$ - площа перетину ядра досліджуваної клітини,

$NArea_R$ - середнє значення площі перерізу ядра у ранзі R, до якого належить клітина.

Значення $NDNA_R$, $NArea_R$ обчислювали емпірично для кожного рангу на основі загальної вибірки пухлинних клітин 133 пухлин.

R	NArea _R	NDNA _R
1	26,1	0,82
2	33,5	1,52
3	40,8	2,41
4	47,8	3,35
5	53,9	4,39
6	59,2	5,24
6+	65,3	6,52

Значення N_i , які відповідали б нормальним ядрам, були вибрані напівемпіричним шляхом і встановлені у межах: $1 \pm 0,2$. Для вибірки клітин з нормальними показниками N_i було обчислено середнє значення оптичної щільності ядра, середньоквадратичне відхилення і на основі цього - мінімальне та максимальне значення, що дозволило розширити можливості N_i .

До клітин N_n були віднесені клітини, середня оптична щільність ядер яких лежала у межах між мінімумом і максимумом, які були обчислені на попередньому кроці. Ядра зі щільністю понад нормальний діапазон (вище максимуму) були віднесені до N_p (що зазнали пікнозу: велика оптична щільність одночасно з низькими показниками площі перетину). Клітини з ядрами, які мали оптичну щільність нижче мінімального значення визначеного діапазону, були віднесені до N_l (що зазнали хроматолізу).

Прикладом конкретного виконання способу є визначення відносної частки трьох різних груп за питомим вмістом ДНК в епітеліальних пухлинах товстої кишки.

Дослідження були проведені на біопсійному матеріалі або матеріалі вилученому після оперативного втручання у 10 пацієнтів з епітеліальними пухлинами товстої кишки.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10 % формаліні з pH 7,4 та ущільнювали у парафін із застосуванням гістіопроектора Histo-5 (Milestone, Italy). З отриманих блоків виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 мкр за допомогою мікротома Microm HM325 (Thermoscientific, Germany). Зрізи забарвлювали гематоксилином і еозином для загальної оцінки пухлини, галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном (pH 1,62, 37 °C, 24 год.) для виявлення вмісту нуклеїнових кислот (НК) у клітинах, що досліджували. Для кожного випадку частину зрізів обробляли РНК-азою для екстракції РНК. Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 за стандартизованих умов.

На отриманих зображеннях з препаратів, забарвлених галоціанін-хромовим галуном (збільшення мікроскопа $\times 400$, 1280 \times 960 пікселів RGB), у 30 клітинах кожної пухлини, за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1,46, визначали: площу перерізу ядра клітини (N_{Area}), питому оптичну щільність ядра клітини (N_{DM}), інтегративну оптичну щільність ядра клітини (N_{IntDen}), а також розраховували вміст у ньому сумарної кількості нуклеїнових кислот (NNA) і ДНК ($NDNA$).

Для кожної клітини за формулою (1) обчислювали індекс нормальності ядра (з урахуванням рангу). На основі N_i для кожної пухлини обчислювали діапазон N_{DM} для клітин з життєздатними ядрами, відповідно до клітин, що потрапляли у цей діапазон, відносили до групи клітин з нормальними ядрами, вище діапазону - до клітин з гіперхромними ядрами (пікнозом), нижче - до групи клітин з ядром, що зазнали хроматолізу. Фактичну кількість клітин у кожній групі було переведено у відсоткову кількість (табл. 1).

Таблиця 1

№	NDM	Min	Max	N_n , %	N_p , %	N_l , %
1	105,93	83,55	128,31	80	16,67	3,33
2	87,41	72,14	102,69	93,33	3,33	3,33
3	107,61	74,76	140,46	96,67	0	3,33
4	62,73	61,47	64	13,33	6,67	80
5	72,01	50	94,01	66,67	0	33,33
6	88,59	75,45	101,73	36,67	63,33	0
7	107,18	80,9	133,46	86,67	6,67	6,67
8	81,71	62,21	101,22	76,67	20	3,33
9	101,74	76,39	127,09	70	23,33	6,67
10	100,63	82,66	118,6	43,33	56,67	0

Наведені дані можна розглядати як відображення концепції клональної еволюції пухлин та демонструвати поступове набуття домінування в аденокарциномах товстої кишки клону(ів) з ефективними системами життєзабезпечення і, можливо, зі стабілізованим геномом. З набуттям клональної еволюції отримує максимум субстрату для реалізації відбору і зі складу пухлини елімінуються нежиттєздатні морфо-функціональні типи пухлин. Разом з тим, з клітинного різноманіття виділяються такі, що мають спотворений генотип, який забезпечує високу проліферативну активність зі збереженням систем життєзабезпечення та втратою специфічних функцій інтегрування у тканинні комплекси та є основою для виникнення стійких клонів, здатних до необмеженого існування. Визначення частки функціонально-активних клітин пухлини дає можливість уточнити стадію її розвитку та ступінь злосудного потенціалу клітин пухлини.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє відрізняти життєздатні морфо-функціональні типи пухлинних клітин від нежиттєздатних, з використанням лише двох параметрів - вмісту ДНК та площі поперечного перерізу ядра клітини. Перевагами методу є його простота у застосуванні.

5 Джерела інформації:

1. Автандилов Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия / Г.Г. Автандилов. - М.: Медицина, 2006.-192 с.

2. Nonlinear analysis of digital images and Doppler measurements for trophoblastic tumor / V. Orel, T. Kozarenko, K. Galachin [et al.] // Nonlinear Dynamics Psychol. Life Sci.-2007. - Vol. 11, № 3. - P. 309-331.

3. Nuclear Morphometric Analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. / E.C. Filippi-Chiela, M.M. Oliveira, B. Jurkovski [et al.] // PLoS ONE. - 2012. - Vol. 7, № 8. - P. e42522 (прототип).

15 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення частки функціонально активних клітин у складі епітеліальних пухлин товстої кишки, що включає визначення низки параметрів, які характеризують форму і розміри ядра клітини, та здійснення розподілу клітин на морфо-функціональні типи: з функціональними ядрами, у стані апоптозу, у стані мітозу, старіючі, який **відрізняється** тим, що пухлинні клітини ранжують за вмістом ДНК у ядрі з кроком де $1=2c$ (диплоїдні), виходячи з площі перерізу і вмісту ДНК та обчислюють індекс нормальності ядра пухлинних клітин (N_i) для кожного рангу за формулою:

$$N_i = \frac{NDNA_i \times NArea_R}{NDNA_R \times NArea_i},$$

25 де: N_i - індекс нормальності ядра досліджуваної клітини,

$NDNA_i$ - вміст ДНК у ядрі досліджуваної клітини,

$NDNA_R$ - середній вміст ДНК у ранзі R, до якого належить клітина,

$NArea_i$ - площа перетину ядра досліджуваної клітини;

клітини зі значенням N_i у межах: $1 \pm 0,2$, вважаються функціонально активними у складі епітеліальних пухлин товстої кишки.