



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 6039

(13) U

(51) 7 G01N33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДЕТЕКЦІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ ПІД ЧАС ПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ

1

(21) 20040705938

(22) 19.07.2004

(24) 15.04.2005

(46) 15.04.2005, Бюл. № 4, 2005 р.

(72) Вінніков Володимир Анатолійович, Мазник
Наталія Олександрівна(73) ІНСТИТУТ МЕДИЧНОЇ РАДІОЛОГІЇ ІМ. С.П.
ГРИГОР'ЄВА АМН УКРАЇНИ, Вінніков Володимир
Анатолійович, Мазник Наталія Олександрівна

(57) 1. Спосіб детекції генетичної нестабільності в лімфоцитах крові онкологічних хворих під час променевої терапії, що включає цитогенетичне визначення загальної частоти клітин з абераціями хромосомного типу (C_{cs}), загальної частоти клітин з абераціями хроматидного типу (C_{cl}), яке проводять у стандартній культурі лімфоцитів до і після радіаційного впливу, який відрізняється тим, що визначають частоту клітин, які мають одночасно аберації хромосомного та хроматидного типів (C_{cs+cl}), обчислюють надочікувану частоту клітин, які мають одночасно аберації хромосомного та хроматидного типів ($Extra\ C_{cs+cl}$); оцінюють різницю між значеннями параметрів в опромінену та інтактному зразках ($\Delta Extra\ C_{cs+cl}$) і при встановленні його значення більше 0 проводять аналіз подовженої культури лімфоцитів після променевої терапії із оцінкою аналогічних параметрів, порівнюють значення $Extra\ C_{cs+cl}$ у подовженій і стандартній культурах лімфоцитів та обчислюють персистенцію індукованої нестабільності геному ($Extra$

2

C_{cs+cl} (Trans), і при встановленні його значення, що дорівнює чи більше 1 констатують успадкування нестабільності геному нащадками опромінених клітин зі стабільною персистенцією та ампліфікацією ефекту у низці клітинних генерацій.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що оцінку надочікуваної частоти клітин, які містять водночас аберації хромосомного та хроматидного типів ($Extra\ C_{cs+cl}$) проводять за формулою:

$$Extra\ C_{cs+cl} = C_{cs+cl} - C_{cs} \cdot C_{cl},$$

де:

C_{cs+cl} - частота клітин, які мають одночасно аберації хромосомного та хроматидного типів;

C_{cs} - загальна частота клітин з абераціями хромосомного типу;

C_{cl} - загальна частота клітин з абераціями хроматидного типу.

3 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що порівняння значень параметрів $Extra\ C_{cs+cl}$ у довгостроковій і стандартній культурах лімфоцитів та обчислення персистенції індукованої нестабільності геному $Extra\ C_{cs+cl}$ (Trans) проводять за формулою:

$$Extra\ C_{cs+cl} \text{ (Trans)} = Extra\ C_{cs+cl} \text{ (100 h)} / Extra\ C_{cs+cl} \text{ (50 h)}$$

де:

$Extra\ C_{cs+cl} \text{ (100 h)}$ - параметр у подовженій (100-годинній) культурі;

$Extra\ C_{cs+cl} \text{ (50 h)}$ - параметр у стандартній (50-годинній) культурі.

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної радіології, променевої терапії, і може бути використаний для оцінки радіаційних ефектів у онкологічних хворих під час променевої терапії.

На сьогоднішній день променева терапія є одним з найбільш розвинених засобів лікування онкопатології. Серед різноманітних методик терапевтичного радіаційного впливу переважає зовнішнє

локальне опромінення. В реальних умовах променевого лікування є неможливою абсолютна концентрація іонізуючої дії виключно на клітинах пухлини, і тому впливу радіації зазнають також нормальні тканини в опроміненій зоні тіла. Внаслідок цього, розробка підходів і критеріїв оцінки радіаційних ефектів у нормальних тканинах пацієнтів під час променевого лікування становить актуаль-

(13) U

(11) 6039

(19) UA

не завдання сучасної радіології та радіобіологічних основ променевої терапії.

Для вирішення завдань з радіобіологічної оцінки наслідків променевого впливу на організм людини широко використовується цитогенетичний аналіз із виявленням хромосомних перебудов у лімфоцитах крові. В останні роки особлива увага в галузі радіобіології і радіаційної генетики приділяється феномену опосередкованої дестабілізації геному під впливом іонізуючого опромінення, проявом якої виступає підвищена інтенсивність мутагенезу в нащадках опромінених клітин та в інтактних клітинах при негомогенному опромінюванні. Необхідність дослідження цього класу цитогенетичних ефектів у онкологічних хворих при терапевтичному опроміненні зумовлюється тим, що радіаційно-індукована нестабільність геному може мати негативні наслідки у вигляді вторинного канцерогенезу і клінічних проявів, якісно подібних до спадкових синдромів підвищеної ламкості хромосом, при тому, що прогнозування розвитку цих ефектів *in vivo* за даними модельних експериментів *in vitro* є неможливим.

Відомий спосіб детекції генетичної нестабільності в нащадках опромінених клітин шляхом диференційної оцінки частоти хромосомних фрагментів, утворених *de novo* у третьому мітозі після радіаційного впливу. [Жлоба А. А., Севаньяев А. В. Идентификация aberrаций хромосом, отражающих нестабильность генома потомков облученных клеток // Докл. АН СССР. - 1991. - Т.316, №5. - С.1239-1244]. Використання способу дозволяє забезпечити чітке розпізнання аберацій, що виникли внаслідок пропуску нерепарованих пошкоджень ДНК, які утворилися у передсинтетичній фазі клітинного циклу. Недоліки цього способу полягають у тому, що він не дозволяє визначати прояви розвитку генетичної нестабільності у першій генерації опромінених клітин, не враховує виникнення ламкості хромосом у постсинтетичній фазі клітинного циклу, не дозволяє кількісно оцінювати ступінь успадкування генетичної нестабільності у нащадках опромінених клітин та потребує технічно складної процедури пульсового мічення клітин бромдезоксирідином.

Відомий також спосіб детекції геномної нестабільності шляхом оцінки накопичення частоти аберацій у трьох послідовних мітозах культури лімфоцитів після тестового опромінення в низькій дозі *in vitro* [Кузьмина Н.С., Сусков И.И. Экспрессирование геномной нестабильности в лимфоцитах детей, проживающих в условиях длительного действия радиационного фактора // Радиаци. Биол. Радиозкол. - 2002. - Т.42, №6. - С.735-739]. Недоліки даного способу полягають у тому, що він не дозволяє визначати прояви розвитку генетичної нестабільності у першій генерації опромінених клітин, не містить диференційного розпізнання виниклих *de novo* аберацій у нащадках опромінених клітин, не дозволяє оцінювати успадкованість підвищеної ламкості хромосом, потребує опромінення крові *in vitro* в низьких дозах і непрямоздає при тестовому опроміненні у високих дозах.

Найближчим до способу, що заявляється, за технічною суттю та ефектом, який досягається, є спосіб оцінки віддаленої радіаційно-індукованої

генетичної нестабільності у нащадках опромінених клітин [Radiation-induced genomic instability: delayed cytogenetic aberrations and apoptosis in primary human bone marrow cells /Kadhim M. A., Lorimore S. A., Townsend K. M. S., et al. //Int.J. Radiat.Biol. - 1995. - Vol.67, №3. - P.287-293.]. Технічна сутність способу полягає в оцінці частоти аберацій хромосомного типу, частоти аберацій хроматидного типу і співвідношення між цими параметрами у клітинах довгострокової культури (4, 16 і 20 доби) кісткового мозку людини після опромінення *in vitro*. Показником розвитку віддаленої генетичної нестабільності є зростання частоти радіаційно-неспецифічних аберацій хроматидного типу в нащадках опромінених клітин та в нащадках клітин, що залишилися інтактними при негомогенному опромінюванні.

До недоліків слід віднести: потребу у довготривалому культивуванні клітин, що може призвести до артефактного викривлення даних, відсутність визначення генетичної нестабільності у першій генерації опромінених клітин і низьку чутливість при рідкоіонізуючому опромінюванні, яке не викликає значного підвищення частоти хроматидних аберацій в лімфоцитах людини.

В основу корисної моделі поставлено завдання зі створення такого способу детекції генетичної нестабільності в лімфоцитах крові онкологічних хворих під час променевої терапії, в якому цитогенетичне визначення загальної частоти клітин з абераціями хромосомного та хроматидного типу у стандартній культурі лімфоцитів до і після радіаційного впливу, обчислювання їх частоти і надочікуваної частоти, різниці між параметрами в опроміненому та інтактному зразках, персистенції індукованої нестабільності геному дозволяє констатувати успадкування нестабільності геному нащадками опромінених клітин зі стабільною персистенцією та ампліфікацією ефекту у низці клітинних генерацій.

Використання способу, який заявляється, дозволяє визначати наявність радіаційно-індукованої генетичної нестабільності у безпосередньо опромінених клітинах внаслідок пригнічення активності системи репарації ДНК у фазах G_1 і S та підвищення ламкості хромосом у фазі G_2 клітинного циклу, а також оцінювати здатність нестабільності геному до успадкування нащадками первинно опромінених клітин та персистенції у послідовних клітинних генераціях, і при цьому не потребує додаткового тестового опромінення *in vitro*, застосування техніки пульсового мічення клітин бромдезоксирідином і дуже довгострокового культивування із декількома пасажами, не страждає викривленням результатів через "ефект засновника", що присутній при виведенні лімфобластоїдних ліній. Спосіб заснований на врахуванні механізмів утворення цитогенетичних пошкоджень у соматичних клітинах людини, і тому не потребує додаткового диференційного виявлення успадковано-реплікованих аберацій, і на відміну від прототипу дозволяє визначати прояви генетичної нестабільності після опромінення як у високих, так і низьких дозах *in vivo*, причому після впливу рідкоіонізуючих випромінювань.

Поставлене завдання вирішують таким чином. У відомому способі детекції генетичної нестабіль-