



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **22280** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
**G01N 33/48**  
**A61B 10/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ МЕТАФАЗНИХ ХРОМОСОМ ІЗ ПСЕВДОПОЛІПІВ ПРИ ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ ТОВСТОЇ КИШКИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ КРИТЕРІЇВ ЗЛОЯКІСНОГО ПЕРЕРОДЖЕННЯ**

1

2

(21) u200610111

(22) 21.09.2006

(24) 25.04.2007

(46) 25.04.2007, Бюл. № 5, 2007 р.

(72) Лозинська Марія Ростиславівна, Лозинський  
Юрій Сильвестрович

(73) ІНСТИТУТ СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ  
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб приготування препаратів метафазних хромосом із псевдополіпів при запальних захворюваннях товстої кишки для визначення генетичних критеріїв злоякісного переродження, при якому проводять лабораторний цитогенетичний аналіз, який **відрізняється** тим, що лабораторний цитогенетичний аналіз виконують прямим методом *in vivo*, причому забір біоптату здійснюють із псевдополіпів.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема клінічної діагностики, і може бути використана для визначення ризику злоякісної трансформації епітелію при запальних захворюваннях товстої кишки - неспецифічному виразковому коліті та хворобі Крона.

Відомі способи визначення можливих показників передракового стану безпосередньо в тканині на генетичному рівні базуються на виконанні комплексу цитогенетичних, молекулярно-генетичних досліджень та мікроспектрометричного аналізу дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК).

Серед молекулярних маркерів в першу чергу слід назвати визначення кількості ДНК в залозистому епітелії методом проточної цитометрії [1]. Цей метод дозволяє встановити, що у хворих з неспецифічному виразковому коліті (НВК) переважають анеуплоїдії ДНК, що корелює з тривалістю захворювання і наявністю гістологічно підтвердженої дисплазії чи карциноми. Однак на сьогоднішній день оцінка плоідності ДНК не стала розповсюдженим клінічним методом у зв'язку з наявністю суперечностей в трактуванні результатів і з високою вартістю методики.

Відомі способи мікроспектрометричного аналізу ДНК зразків слизової після резекції кишки при НВК та хворобі Крона (ХК) дозволяють встановити наявність анеуплоїдних та поліплоїдних клонів, однак не дають можливості виявити точно спектр аномалій хромосом, що є можливим за допомогою диференціального аналізу метафазних хромосом

[2, 3]. Отже, прогноз здійснений за допомогою цих способів, буде менш точний, тобто даватиме помилку.

Найближчим аналогом запропонованого способу є лабораторний цитогенетичний аналіз слизової товстої кишки шляхом культивування клітин у пацієнтів із НВК та при НВК, ускладненому раком товстої кишки (РТК), при якому проводять аналіз метафазних хромосом в слизовій товстої кишки без лабораторного цитогенетичного аналізу конкретно в псевдополіпах - ділянках найбільш змінених епітеліальних базифільних клітин зі збільшеними ядрами, що не дозволяє об'єктивно оцінити весь спектр аномалій метафазних хромосом для визначення генетичних критеріїв злоякісного переродження. Недоліком прототипу є також культивування клітин *in vitro*, при якому відбувається селекція клітин певного типу, що може спотворювати об'єктивність результату [4].

Завданням корисної моделі є розробка такого способу приготування препаратів метафазних хромосом, який би дозволив без тривалого культивування клітин оцінити наявність аномалій хромосом чи ознак хромосомної нестабільності, що вказувало б на нестабільність геному як можливу ознаку канцерогенезу.

Поставлене завдання вирішується тим, що у процесі приготування препаратів метафазних хромосом із псевдополіпів при запальних захворюваннях товстої кишки для визначення генетичних критеріїв злоякісного переродження, при якому

(13) **U**

(11) **22280**

(19) **UA**

проводять лабораторний цитогенетичний аналіз, згідно з корисною моделлю, лабораторний цитогенетичний аналіз виконують прямим методом *in vivo*, причому забір біоптату здійснюють із псевдополіпів.

Особливістю РТК при запальних захворюваннях товстої кишки, зокрема, НВК і ХК є те, що він розвивається на фоні хронічного запалення, яке утруднює оцінку основного морфологічного критерію загрозливої малигнізації - дисплазії. Хоча морфологічні критерії дисплазії детально описані, постановка діагнозу залишається проблематичною. Особливо важко виявити незначні диспластичні зміни, які більшість морфологів оцінюють як дисрегенераторні і звичайно не пов'язують з ризиком виникнення раку [5]. Крім того, для НВК характерна висока кінетика оновлення епітеліальних клітин у зв'язку з виразковими дефектами слизової оболонки товстої кишки. Це може розглядатися як нормальний репаративний процес, однак завжди існує небезпека пропустити ознаки дисплазії чи ранньої карциноми у епітелії, що швидко оновлюється. Виявлення ділянки дисплазії високого ступеня в слизовій оболонці товстої кишки вважається фактором високого ризику виникнення РТК і в середньому у 43% випадків асоційовано з наявністю інвазивної карциноми [6]. Високий ризик РТК при запальних захворюваннях товстої кишки і труднощі у виявленні дисплазії стимулюють пошук додаткових критеріїв, що дозволять оцінити ризик зловиясної трансформації.

Запропонований спосіб ілюструється рисунками, де на Фіг.1 (мікрофото, збільшення 10x100) зображено мультиаберантну метафазну пластинку у псевдополіпі товстої кишки пацієнта з ХК, на Фіг.2 - ідіограму, де стрілками позначено місця пошкоджень хромосом.

Спосіб здійснюють таким чином. У пацієнтів із запальними захворюваннями товстої кишки проводять забір біоптату з псевдополіпів, подрібнюють зразок і виконують лабораторний цитогенетичний аналіз прямим методом *in vivo*. Експозицію зразка розміром не менше від (3,0x3,0)мм, взятого відразу ж після проведення біопсії, здійснюють в 3мл середовища ІГЛА з подвійним набором амінокислот протягом 2 годин в термостаті при 37,0°C з розчином колхіцину в кінцевій концентрації 0,5мкг/мл. Потім зразок біоптату переносять пінцетом в гіпотонічний розчин - суміш хлористого калію (0,075М) і 1%-го цитрату натрію у співвідношенні 2:1 і витримують в термостаті при 37,0°C. Після інкубації в гіпотонічному розчині, яка повинна становити 40хв, зразок переносять у приготований *ex tempore* охолоджений фіксатор, що містить 3мл етилового спирту та 1мл льодяної оцтової кислоти, і витримують 20хв в холодильнику при  $t=+5$  -  $+8^{\circ}\text{C}$ . Далі зразок переносять у краплю 30%-ного розчину льодяної оцтової кислоти, поміщену на попередньо нагріте до 60,0°C предметне скельце, проводять мацерацію, легко розпилюючи краплю зі зразком струменем повітря. Скельце підсушують і нагрівають у термостаті 10хв. Фарбування одержаного препарату проводять за допомогою стандартного диференціального методу із застосуванням розчину барвника Гімзи у фосфатному буфері

(рН=6,8) з додаванням 3-5 крапель 0,25%-ного розчину трипсину. Після цього аналізують 10-12 метафазних пластинок зі зразка.

#### Приклад 1

Пацієнт Богдан П., 1947р.н., постійно проживає у м.Львові. При обстеженні за допомогою колоноскопії у 2001р. у нього виявлено псевдополіпи прямої кишки на фоні хронічного запального процесу. Поставлено діагноз: НВК з підозрою на малигнізацію. Проведено гістологічне дослідження 3-х зразків псевдополіпів поряд з цитогенетичним аналізом і підтверджено дисплазію епітелію II-III-го ст. у зразку №2. Результати цитогенетичного аналізу 12 метафазних пластинок зразка псевдополіпа з ознаками дисплазії за допомогою прямого методу показали присутність трьох клонів клітин з анеуплоїдними та еуплоїдними наборами хромосом. Поява клональної різноманітності клітин є свідченням можливого зловиясного переродження епітелію.

#### Каріотип клітин зразка №2:

56,XY,+der2,+3,+der3,+6,+7,+16,+17,+22,+X,+mar1,+mar2/47,XY,+17/46,XY

Співвідношення клонів було наступним: 2/8/2

#### Приклад 2

Пацієнт Василь П., 1956р.н., постійно проживає у м.Моршин Львівської області. При обстеженні за допомогою колоноскопії у 2001р. у нього виявлено псевдополіпи товстої кишки. Пацієнт протягом 7-ми років професійно контактує зі шкідливими чинниками: працює акумуляторщиком зі свинцевими пластинками. Поставлено діагноз: НВК з підозрою на малигнізацію. Результат гістологічного аналізу 3 зразків, взятого з біопсійного матеріалу псевдополіпів товстої кишки наступний: псевдополіпи прямої та сигмоподібної кишки на фоні хронічного запального процесу із загостренням. Поліповидний утвір слизової оболонки товстої кишки вкритий однорядним циліндричним слизепродуючим епітелієм із залозами без ознак малигнізації. Результат цитогенетичного аналізу 10 метафазних пластинок є наступні.

#### Каріотип клітин зразка:

46,XY (з присутністю 2 аберантних метафаз, які містили по 2 аберації хроматидного і хромосомного типів).

Це може вказувати на наявність ендегенного мутагенезу - як прояву хвороби, або ж можливого результату дії професійних шкідливостей.

#### Приклад 3

Пацієнту Богдану К, 1966р.н., що проживає в Сокальському районі Львівської області. При обстеженні за допомогою колоноскопії у 2003р. у нього виявлено з псевдополіпи товстої кишки. Поставлено діагноз: ХК. Результат гістологічного аналізу 3 зразків, взятих шляхом біопсії псевдополіпів товстої кишки, наступний: псевдополіпи товстої кишки на фоні хронічного запального процесу із загостренням. Поліповидний утвір слизової оболонки товстої кишки з ознаками дисплазії I-II ступеня.

Результати цитогенетичного аналізу 10 метафазних пластинок зразка псевдополіпа за допомогою прямого методу є наступні.

#### Каріотип клітин зразка:

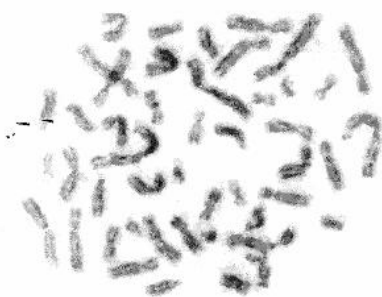
46,XY (з присутністю однієї мультиаберантної метафази з 10-ма абераціями одночасно та 3 метафазні пластинки, які містили по 1 аберації хроматидного типу).

Поява мультиаберантної метафазної пластинки свідчить про хромосомну нестабільність, яка відображена на Фіг.1 та Фіг.2 (ідіограмі), і її можна розглядати в якості можливої ознаки канцерогенезу. Аналогічні хромосомні дефекти спостерігаються у культурі лімфоцитів периферичної крові при ряді спадкових захворювань з високим ризиком злоякісного переродження, таких як атаксія-телеангіктазія, деяких сімейних гемопатія, хвороби Німейгена та ін.

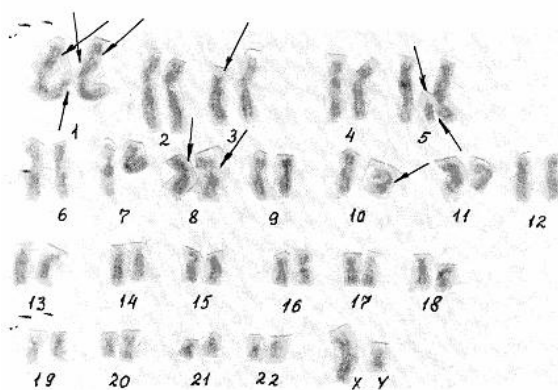
Таким чином, за допомогою розробленого способу з більшою вірогідністю можна прогнозувати ризик виникнення РТК шляхом лабораторного цитогенетичного аналізу псевдополіпів товстої кишки та оцінки хромосомної нестабільності шляхом обліку спектра хромосомних аберацій, що важливо для планування та проведення лікувально-профілактичних заходів. Запропонований спосіб може бути використаний у лікувальних закладах.

#### Джерела інформації:

1. Klump B., Hoizmarm K., Kuhn A. et al. Distribution of cell populations with DNA aneuploidy and p53 protein expression in ulcerative colitis // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1997. - V.9. - P.789-794.
2. Porschen R., Robin U., Schumacher A. et al. DNA aneuploidy in Crohn's disease and ulcerative colitis: results of a comparative flow cytometric study // *Gut.*, 1992. - V.33. - P.663-667.
3. Suzuki K., Muxo T., Masaki T. et al. Microspectrophotometric DNA analysis in ulcerative colitis with special reference to its application in diagnosis of carcinoma and dysplasia // *Gut.* - 1990. - V.92. - P.143-150.
4. Xavier G., Prola J., Benvenuti G. et al. Tissue cytogenetic studies in chronic ulcerative colitis and carcinoma of colon // *Cancer.* - 1974. - V.34. - P.684-695.
5. Аруин Л.О., Капуллер Л.Л., Исаков В.И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М.: Триада-Х, 1998. - 496с.
6. Иоффе А.Ю., Ткач С.М., Кузнецов Ю.Г. Современные стратегии предупреждения и раннего выявления колоректального рака у больных воспалительными заболеваниями кишечника. *Современная гастроэнтерология.* №2(22). - 2005. - С.96-100.



Фіг. 1



Фіг. 2