



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **30871** (13) **U**
(51) **МПК (2006)**
A61B 5/00
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ЦИТОМОРФОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ
ПЕРИЦЕНТРОМЕРНОГО/ЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНУ З МЕТОЮ КЛІНІЧНОЇ ВЕРИФІКАЦІЇ
ДІАГНОЗУ НА ОНКОЛОГІЧНЕ ЗАХВОРЮВАННЯ

1

2

(21) u200713930

(22) 12.12.2007

(24) 11.03.2008

(72) ШВАЧКО ЛЮДМИЛА ПАВЛІВНА, UA, БЄЛКІН
КОСТЯНТИН ВІКТОРОВИЧ, UA(73) ШВАЧКО ЛЮДМИЛА ПАВЛІВНА, UA, БЄЛКІН
КОСТЯНТИН ВІКТОРОВИЧ, UA

(56)

(57) Спосіб виявлення цитоморфологічних
порушень перичентромерного/центромерного

гетерохроматину з метою клінічної верифікації
діагнозу на онкологічне захворювання, під час
якого досліджують метафазні хромосоми та
інтерфазні ядерні лімфоцити периферійної крові
пацієнта і у випадку виявлення де-епігенетичних
цитоморфологічних порушень
перичентромерного/центромерного
гетерохроматину роблять висновок щодо клінічної
верифікації діагнозу на онкологічне захворювання.

Пропонована корисна модель відноситься до
медицини, а більш конкретно, до способу
виявлення цитоморфологічних порушень
перичентромерного/центромерного
гетерохроматину з метою клінічної верифікації
діагнозу на онкологічне захворювання та ранньої
діагностики злоякісних пухлин і може бути
використана, зокрема, для ранньої діагностики
онкологічних захворювань.

Як відомо, у хворих з онкопатологією на різний
тип солідного раку (рак щитоподібної залози,
колоноректальний рак, рак молочної залози,
нейробластома, пухлина Вільмса та пухлина
Юнга) має місце значне епігенетичне ДНК
гіпометилування на рівні соматичного геному -
лімфоцитів периферійної крові, що корелює з
глобальним деметилуванням найбільш
чисельніших перичентромерних сателітних Alu-
ДНК повторів та критичною деконденсацією
перичентромерного/центромерного
конститутивного гетерохроматину метафазних
хромосом [Деклараційний патент України на
корисну модель №13616U, МПК (2006)
A61K31/727, A61B17/94, G01N33/49, G01N33/48;
опубл.17.04.2006, Бюл. №4, 2006р.]. Але,
подальші, глибші морфологічні порушення
деконденсованого конститутивного
перичентромерного/центромерного
гетерохроматину за умов епігенетичного ДНК
гіпометилування при онкологічному процесі не
були виявлені.

Відомо, що аномальне геномне ДНК
гіпометилування визнано на сьогоднішній день
важливим ініціюючим фактором розвитку
канцерогенезу [Hoffmann M.J., Schulz W.A. 2005.
Causes and consequences of DNA hypomethylation
in human cancer. - Biochem. Cell Biol., 83(3): 246-
321], насамперед, за рахунок безпосередньої
індукції ДНК гіпометилуванням хромосомальної
нестабільності, що поєднується з онкологічною
пропреедією [Eden A., F. Gaudet, A. Waghmare, R.
Jaenisch. 2003. Chromosomal Instability and Tumors
Promoted by DNA Hypomethylation. - Science, 300
(5618): 455; Chen T., Hevi S., Gay F., Tsujimoto N.,
He T., Zhang B., Ueda Y., Li E. 2007. Complete
inactivation of DNMT1 (pattern DNA
methyltransferase) leads to mitotic catastrophe in
human cancer cells. - Nat. Genet. 39 (3): 391-396].
Але, біологічні механізми феномену ДНК
гіпометилування у розвитку соматичної клітинної
малігнізації, як основи канцерогенезу,
залишаються ще не з'ясованими.

У основу пропонованої корисної моделі
поставлено задачу створення такого способу
виявлення цитоморфологічних порушень
перичентромерного/центромерного
гетерохроматину, який би дозволив його
використовувати для клінічної верифікації діагнозу
на онкологічне захворювання.

Поставлена задача вирішується за рахунок
створення умов для визначення таких адекватних
соматичних змін геному, які б поєднувалися з

(13) U

(11) 30871

(19) UA

феноменом епігенетичного ДНК гіпометилування при онкологічному процесі та мали б, насамперед, прогностичне і діагностичне значення у період раннього розвитку онкологічного процесу.

Пропонований спосіб виявлення цитоморфологічних порушень перичентромерного/центромерного гетерохроматину з метою клінічної верифікації діагнозу на онкологічне захворювання, включає досліджування метафазних хромосом та інтерфазних ядерних лімфоцитів периферійної крові пацієнта, а у випадку виявлення де-епігенетичних цитоморфологічних порушень перичентромерного/центромерного гетерохроматину роблять висновок щодо клінічної верифікації діагнозу на онкологічне захворювання.

Головна функція епігенетичного ДНК метилування, як відомо, поєднується з глобальною репресією транскрипції геному, майже на 90%, шляхом організації транскрипційно "мовчащого" хроматину або гетерохроматину [Richards E.J., Sarah C.R. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. - *Cell*, 2002, 108: 489-500]. Динамічна структура гетерохроматину, як правило, пов'язується з факультативним гетерохроматином - еухроматином на стадії періодичної конденсації, тоді як конститутивний гетерохроматин залишається незмінним, конденсованим, на протязі мітозу, з пізньою реплікацією на стадії S-інтерфази [Grimes B.R., Babcock J., Rudd M.K., Chadwick B., Willard H.F. Assembly and characterization of heterochromatin and euchromatin on human artificial chromosomes. - *Genome Biol.*, 2004, 5 (11): R89; Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. - *Nat. Rev. Genet.*, 2002, 3: 662-673]. Саме тому, конститутивний гетерохроматин бере на себе функцію соматичного епірегулятора стабільності геному. Дотримуючись того факту, що клональне соматичне походження пухлини є біологічною основою етіології раку, незалежно від типу, саме конститутивний гетерохроматин визначений, як адекватна глобальна мішень у епігенетичному механізмі розвитку соматичної неопластичної трансформації. А тому, пропонований спосіб побудований на використанні саме згаданого факту.

Суть пропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, що показують виявлені адекватні де-епігенетичні морфологічні структурні зміни конститутивного перичентромерного/центромерного гетерохроматину, на рівні лімфоцитів периферійної крові, при онкологічному процесі, за умов аберантного геномного ДНК гіпометилування. А саме:

на Фіг.1 показано характерну латентну політенну хромомеризацію перичентромерного/центромерного гетерохроматину метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові у хворих з онкологічною прогресією (n=75, p<0,001);

на Фіг.2 показано виявлену інтерфазну гетерохроматинізацію у вигляді ядерного гетеропікнозу, на рівні соматичних клітин -

лімфоцитів периферійної крові, у хворих з онкологічною прогресією (n=75, p<0,001);

на Фіг.3 показано виявлений інтерфазний ядерний гетеропікноз, у вигляді масивних хромоцентрів, при направленій дії модельного ДНК деметилуючого реагенту 5-азацитидину в культурі лімфоцитів здорових донорів (n=20, p<0,001).

Приклад

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були соматичні клітини - лімфоцити периферійної крові, від хворих з солідним неспадковим типом пухлин, рак щитоподібної залози, колоректальний рак, рак молочної залози, нейробластома та пухлина Вільмса (n=75). За контрольну групу мали умовно здорових донорів, віком від 24 до 40 років (n=20).

Бласттрансформацію культури лімфоцитів проводили за допомогою мітоген-стимулюючої дії фітогемаглютиніну [ФГА "Р" фірми "Sigma-Aldrich"] у середовищі RPM1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, як описано [Mc Gregor H.C., Varley J.M. Working with Animal chromosomes. / Wiley, New York, 1983. - 280с.]. Інтерфазні лімфоцити контрольної групи (n=500) та групи від хворих на солідний тип пухлин (n=500) аналізували методом флуоресцентної мікроскопії за використанням гетерохроматин-специфічних флуорохромів DAPI та Hoechst 33258 [фірми Boehringer Mannheim], що характеризуються переважно АТ- зв'язуванням в сателітній ДНК геному та спектрами емісії - 450nm та 465nm, відповідно [Dolezel J, Sporbat S, Lucretti S. 1992. Comparison of the DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. - *Physiol. Plant.*, 85: 625-631]. Аналіз інтенсивності інтерфазної ядерної флуоресценції проводили із застосуванням мікроскопу "Axiotar plus FL" (ZEISS, Німеччина) та програми "Scion Image" (ZEISS, Німеччина).

Статистичну обробку результатів проводили незалежним методом з використанням критерію Ст'юдента. [Мінцер О.П., Угаров Б.Н., Власов В.В. Методы обработки медицинской информации. - Київ: Вища школа. - 1982. - 159с.].

В результаті проведених досліджень були виявлені характерні ознаки індукції латентної політенії соматичного геному (на рівні лімфоцитів крові) при онкологічному процесі під впливом геномного ДНК гіпометилування/деметилування.

А саме:

1. Латентна політенна хромомеризація конститутивного перичентромерного/центромерного гетерохроматину на стадії метафази та здатність такого хромомерного гетерохроматину до латеральної ектопічної кон'югації на рівні сестринських хроматид (Фіг.1);

2. Інтерфазний ядерний гетеропікноз за рахунок екстрареплікації конститутивного гетерохроматину з утворення масивних хромоцентрів, та появи гіпертрофованих інтерфазних клітин лімфоцитів (Фіг.2, Фіг.3), як при онкологічній прогресії, так і за дії модельного ДНК деметилуючого реагенту 5-азацитидину в культурі нормальних лімфоцитів від здорових донорів.

Приклади кореляції даних цитоепігенетичних маркерів з клінічною верифікацією онкозахворювання:

Хвора Г., 34 р., (Центр лікування та реабілітації хворих на рак щитоподібної залози, м. Київ), з клінічною верифікацією діагнозу папілярний рак щитоподібної залози, при дослідженні метафазних хромосом та інтерфазних ядерних лімфоцитів периферійної крові, мали місце характерні де-епігенетичні цитоморфологічні порушення перичентромерного/центромерного гетерохроматину, а саме: його метафазна латентна хромомеризація та інтерфазна ядерна гетерохроматинізація з утворенням гетеропікнотичних хромоцентрів.

Хворий Ч., 46 р., (Інститут онкології АМН України, проктологічне відділення, м. Київ), з клінічним діагнозом колоректальний рак, пройшов генетичне дослідження, яке показало наявність каріотипу з чіткою латентною хромомеризацією гетерохроматинових ділянок метафазних хромосом та наявність гетеропікнотичних хромоцентрів в інтерфазних ядрах лімфоцитів, що адекватно супроводжували онкологічне захворювання хворого.

Хвора В., 50 р., (Онкологічний Центр ім. Н.Н. Блохіна РАМН, відділення молочної залози, м. Москва), з клінічним діагнозом карцинома молочної залози, пройшла генетичний аналіз, який виявив цитоморфологічні порушення конститутивного перичентромерного/центромерного гетерохроматину на рівні метафазних та інтерфазних лімфоцитів периферійної крові. Дані порушення супроводжувались критичними морфологічними епігенетичними порушеннями конститутивного гетерохроматину, а саме: метафазною латентною політенною хромомеризацією мітотичних лімфоцитів, та появою гетеропікнотичних хромоцентрів інтерфазних ядерних лімфоцитів периферійної крові, що генетичне поєднувались з перебігом онкологічного захворювання пацієнтки.

Висновки:

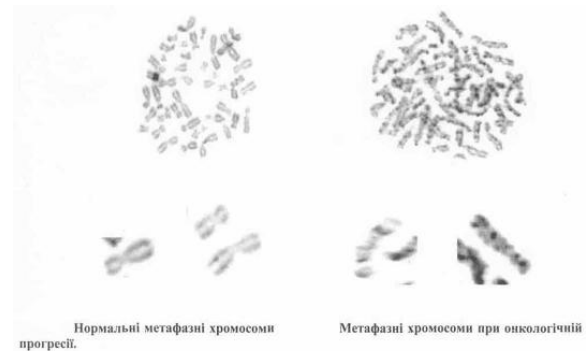
1. В основі соматичної плідізації при онкологічній прогресії лежать де-епігенетичні морфологічні зміни конститутивного гетерохроматину, пов'язані з його аномальною латентною політенною хромомеризацією та пікнотичною ядерною інтерфазною гетерохроматинізацією, за умов ДНК гіпометилування/деметилування.

2. Виявлені характерні де-епігенетичні порушення конститутивного перичентромерного гетерохроматину в сторону латентної політенії, а саме - метафазна хромомеризація та інтерфазний ядерний гетеропікноз з утворенням хромоцентрів, за умов геномного ДНК гіпометилування/деметилування, визначені адекватними цитогенетичними маркерами соматичної клітинної малігнізації в процесі розвитку онкологічного захворювання.

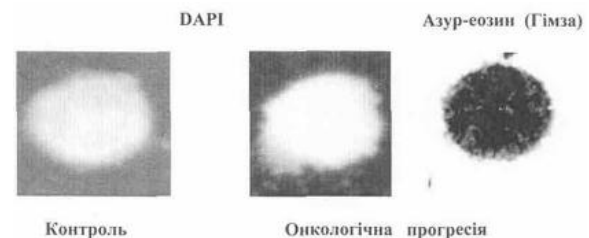
3. Показана інвазія латентної політенії в соматичному геномі, яка направлено індукується геномним ДНК гіпометилуванням/деметилуванням, і може

розглядатися стратегічною парадигмою епігенетичної біології раку.

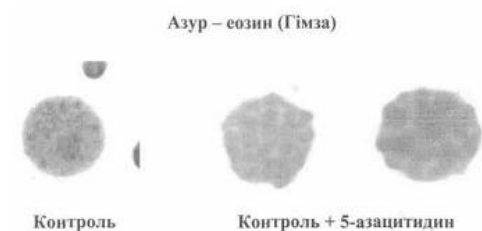
Таким чином, пропонований спосіб має ефективне прогностичне і діагностичне значення у період раннього розвитку онкологічного процесу.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3