



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15113 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61B 5/00  
G01N 33/49  
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

### ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

#### (54) СПОСІБ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

1

(21) u200512022

(22) 14.12.2005

(24) 15.06.2006

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Швачко Людмила Павлівна, Бух Інна Георгіївна, Степаненко Аркадій Павлович, Процик Володимир Семенович, Кікоть Володимир Онурійович, Климнюк Григорій Іванович, Гульчій Микола Васильович

(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ ОНКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, Швачко Людмила Павлівна, Бух Інна Георгіївна, Степаненко Аркадій Павлович, Процик

2

Володимир Семенович, Кікоть Володимир Онурійович, Климнюк Григорій Іванович, Гульчій Микола Васильович

(57) Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин, що включає операцію дослідження цитогенетичних порушень хромосомної організації на клітинах крові, за результатами якої виконують ранню діагностику злоякісних пухлин, який **відрізняється** тим, що операцію дослідження цитогенетичних порушень хромосомної організації на клітинах крові виконують на стадії інтерфазного поділу клітин - стадії максимальної деконденсації гетерохроматину та реплікації ДНК/гетерохроматину.

Пропонована корисна модель відноситься до медицини, зокрема до способів ранньої діагностики злоякісних пухлин.

Найбільш близьким до пропонованого способу за сукупністю суттєвих ознак є спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин, що включає операцію дослідження цитогенетичних порушень хромосомної організації на клітинах крові, за результатами якої виконують ранню діагностику злоякісних пухлин [Деклараційний патент України на винахід №64533 А, МПК7 А61В5/00, G01N33/49, G01N33/48; дата публікації: 16.02.2004р., Бюл. №2, 2004р.]. У відповідності до описаного способу ранню діагностику встановлюють на основі виявлення деконденсації центромерного гетерохроматину у вигляді дифузії центромер (за DAPI гетерохроматин-специфічним флуоресцентним барвником), як критерію появи передчасного розділення хроматид та С-анафазного каріотипу на стадії метафази мітотичного поділу клітин крові, поза пухлиною.

Недоліком описаного способу є невизначеність молекулярно-генетичних підстав надмолекулярних змін деконденсації гетерохроматину на стадії метафази, оскільки в мітотичному поділі

клітини стадія метафази (G<sub>2</sub>/M) є ключовою стадією для визначення максимальної конденсації та упаковки гетерохроматину перед розходженням хроматид до мітотичного веретина та цитокінезом. Окрім сказаного, недоліком описаного способу є і невизначеність стану гетерохроматину на попередній стадії мітотичного поділу - стадії інтерфазної деконденсації та реплікації гетерохроматину (G<sub>1</sub>/S).

У основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу створення більш чутливого способу ранньої діагностики злоякісних пухлин, за рахунок створення умов для визначення молекулярно-генетичних підстав надмолекулярних змін деконденсації гетерохроматину на стадії метафази, а також визначення стану гетерохроматину на попередній стадії мітотичного поділу - стадії інтерфазної деконденсації та реплікації гетерохроматину (G<sub>1</sub>/S), який би розширив уяву про механізми порушення хромосомної організації при пухлинній прогресії.

Поставлена задача вирішується використанням пропонованого способу, який, як і відомий спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин, містить операцію дослідження цитогенетичних пору-

(19) UA (11) 15113 (13) U

шень хромосомної організації на клітинах крові, за результатами якої виконують ранню діагностику злоякісних пухлин, а, відповідно до пропозиції, операцію дослідження цитогенетичних порушень хромосомної організації на клітинах крові виконують на стадії інтерфазного поділу клітин - стадії максимальної деконденсації гетерохроматину та реплікації ДНК/гетерохроматину.

Суть пропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами та фотографіями, де:

На Фіг.1 показано інтенсивність флюоресценції інтерфазних ядер бласттрансформованих лімфоцитів крові у хворих на онкологічну прогресію за DAPI та Hoechst 33258 флюорохромів, типових до АТ-зв'язування сателітних ДНК повторів гетерохроматину, а також специфічна індукція інтенсивності флюоресценції інтерфазного гетерохроматину при дії 5'-аза-цитидин-ДНК-деметилуючого реагенту в культурі лімфоцитів здорових донорів.

На Фіг.2 наведена діаграма, де показано інтенсивність флюоресценції інтерфазних ядер бласттрансформованих лімфоцитів крові у хворих на онкологічну прогресію та при дії 5'-аза-цитидин-ДНК-деметилуючого реагенту в культурі лімфоцитів здорових донорів.

На Фіг.3 показана специфічна ампліфікація типових перичентромерних/центромерних Alu-ДНК повторів за DIG-Alu dot-гібридизацією геномних ДНК лімфоцитів хворих на онкологічну прогресію.

На Фіг.4 показана специфічна ампліфікація сателітних Alu-ДНК повторів прицентромерно/центромерного гетерохроматину в культурі лімфоцитів здорових донорів при дії 5'-аза-цитидин-ДНК-деметилуючого реагенту.

За специфічними до гетерохроматину DAPI та Hoechst 33258 (флюорохромами) виявлено достовірний приріст флюоресценції інтерфазного гетерохроматину, що корелював з ампліфікацією Alu ДНК повторів - типових сателітних повторів прицентромерно/центромерного гетерохроматину, як при онкологічній прогресії, що супроводжується геномним ДНК гіпометилуванням, так і при дії 5'-аза-цитидину ДНК-деметилуючого реагенту (Фіг.3).

В основі дослідження авторів лежить концепція соматичного мутагенезу канцерогенного типу, як стратегія для пошуку ранніх молекулярних та надмолекулярних змін у геномі соматичних клітин поза пухлинною, змін, адекватно асоційованих з індукцією канцерогенезу та онкологічного захворювання зокрема. Головного змісту соматичного мутагенезу канцерогенного типу набуває поняття передканцерного механізму пухлинної прогресії, вирішення якого автори обмежують дослідженням таких змін на рівні соматичних клітин крові, а саме ядерних лімфоцитів у хворих з різним типом первинних солідних пухлин та пов'язують з генетичними молекулярними/надмолекулярними маркерами, неспецифічними до етнології пухлини, що можуть зумовлювати розробку системи ранньої діагностики та прогнозування онкологічних захворювань на клітинах крові. Саме геном соматичних клітин, а не пухлини, як наслідку соматичного мутагенезу канцерогенного типу, стає епіцентром

досліджень у динаміці розвитку злоякісної клітинної трансформації.

Авторами встановлено, що на стадії інтерфази мітотичного поділу клітин крові у хворих на онкологічну прогресію має місце принципова гетерохроматизація за специфічним до герерохроматинових ройонів DAPI-флюоресцентним аналізом та Hoechst 33258 (також специфічним флюорохромом до АТ-зв'язування переважно сателітних ДНК-повторів гетерохроматинових районів), який використовують в кількісному аналізі синтезу та реплікації ДНК (див. Фіг.2). Окрім того, експериментально встановлено, що саме ампліфікація Alu-повторів, сателітних перецентромерних/центромерних ДНК-повторів, корелює з гетерохроматинізацією за рахунок екстрареплікації інтерфазного гетерохроматину ядерних лімфоцитів у хворих з онкологічною прогресією та при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину в культурі лімфоцитів здорових донорів (Ф3).

Пропонований спосіб здійснюють так.

Клітини периферійної крові як онкохворих, так і контрольних здорових донорів, культивували на середовищі RPMI 1640 з 10% ембріональною телячою сироваткою в присутності мітогенстимулюючого фітогемаглютиніну для отримання мітотичних хромосом та бласттрансформованих інтерфазних клітин лімфоцитів на протязі 48 або 72 год. при 37°C, синхронізуючи культуру клітин з застосуванням колхіцину [McGregor H.C.; Varley J.M. Working with Animal Chromosomes., Wiley, New York 1983.]. Методика культивування, отримання препаратів метафазних хромосом та інтерфазних бласттрансформованих клітин лімфоцитів є базовою, як для способу-прототипу, так і для пропонованого способу. Однак, об'єктом досліджень у способі прототипі були метафазні хромосоми ядерних лімфоцитів крові хворих на онкологічну прогресію, та виявлення принципової кореляції з деконденсацією перичентромерного/центромерного гетерохроматину, що спричинює специфічні аномалії метафазних хромосом, асоційованих з передчасним розділенням сестринських хроматид та появою С-анафазного каріотипу в популяції метафазних хромосом. Об'єктом досліджень пропонованого способу є подальший цитогенетичний аналіз гетерохроматину на стадії інтерфази клітинного поділу, як ключової стадії деконденсації та реплікації хромосом - G1/S-фази. Отримані препарати інтерфазних ядер фітогемаглютинін-бласттрансформованих лімфоцитів за допомогою фіксатору, за складом: 96 % етанол та льодова оцтова кислота (у співвідношенні 3:1, extempore), аналізували за специфічними до гетерохроматину та реплікації ДНК DAPI та Hoechst 33258 флюоресцентними барвниками, специфічними до АТ-зв'язування переважно ДНК сателітних послідовностей гетерохроматину (спектри емісії 450nm та 465nm, відповідно) із застосуванням флюоресцентного мікроскопу Axiotar plus FL фірми ZEISS (Німеччина) та програми "Scion Image". Під час досліджень за пропонованим способом виявлені принципіві кількісні зміни інтерфазного гетерохроматину, що корелюють з онкологічною прогресією (див. Фіг.1). Показано, що в основі значного збільшення флюоресценції інтерфазного гетерох-

роматину при онкологічній прогресії, у порівнянні з інтерфазним гетерохроматином здорових донорів, за DAPI та Hoechst 33258 аналізом (на  $72\% \pm 5,45$  та  $86\% \pm 6,21$ , відповідно) (див. Фіг.2), лежить принципова екстраєплікація гетерохроматину, що асоціюється з ампліфікацією Alu-повторів, найчисельніших у геномі людини типових сателітних ДНК-повторів перицентромерного/центромерного гетерохроматину (див. Фіг.3) та корелює як з глобальним геномним ДНК-гіпометилуванням, виявленим при пухлинній прогресії на клітинах крові як у онкологічних хворих [див. заявку на корисну модель №u200508943 від 21 вересня 2005р.], так і при дії специфічного ДНК-деметилуючого реагенту 5'-азацитидину в культурі лімфоцитів здорових донорів на протязі 72 год. культивування при  $37^{\circ}\text{C}$  (Фіг.3, 4). За пропонуванням способом саме принципове збільшення інтенсивності флюоресценції інтерфазних ядер клітин лімфоцитів у онкологічних хворих за рахунок специфічно-індукованої ДНК-гіпометилування екстраєплікації перицентромерного/центромерного гетерохроматину набуває чинника адекватного цитогенетичного маркера, а тому може бути використаний для ранньої діагностики онкологічних захворювань на клітинах крові, поза пухлиною.

#### Приклад 1

Хвора Р., 26 років, з клінічним діагнозом лімфосаркома пройшла лікування з хірургічним втручанням в Центрі лікування та реабілітації хворих на патологію щитоподібної залози м. Києва. Аналіз ядерних клітин лімфоцитів периферійної крові хворої за способом порівняння з контролем здорових донорів інтенсивності флюоресценції гетерохроматину інтерфазних ядер бласттрансформованих лімфоцитів за DAPI та Hoechst 33258 (специфічних до АТ-зв'язування сателітних послідовностей ДНК гетерохроматину) флюорохромів засвідчує значний рівень інтенсивності флюоресценції (на  $72 \pm 4,28\%$ ) за рахунок гетерохроматинізації на стадії реплікації ДНК, що корелює з пух-

линною прогресією та узгоджується з верифікацією клінічного онкодіагнозу.

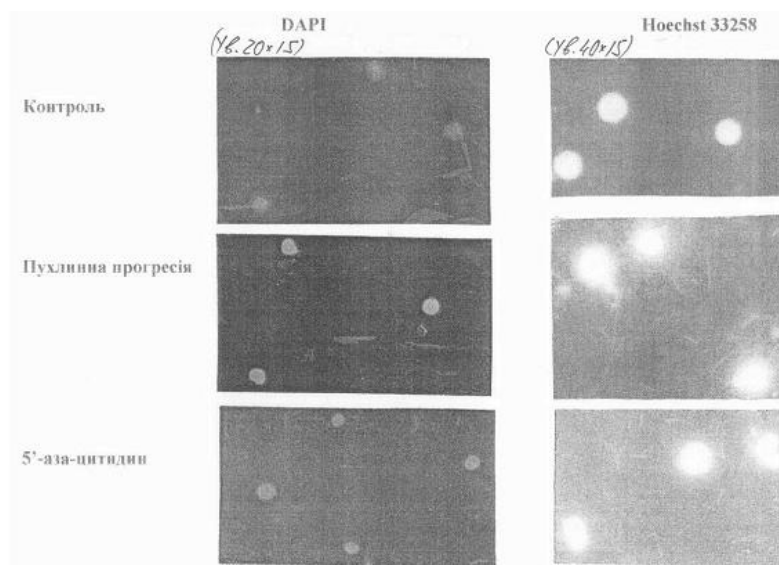
#### Приклад 2

Хворий Р., 12 років, з клінічним діагнозом пухлина Юнга, пройшов лікування з хірургічним втручанням у дитячому відділенні Інституту онкології АМН України. За способом корисної моделі аналізували культуру фітогемаглютинін-бласттрансформованих лімфоцитів периферійної крові хворого на стадії інтерфазних ядер за допомогою DAPI та Hoechst 33258 специфічних до гетерохроматину флюорохромів у порівняльному з контролем визначенні інтенсивності флюоресценції інтерфазного гетерохроматину лімфоцитів хворого. Принципове збільшення інтенсивності флюоресценції (на  $64 \pm 5,31\%$ ) інтерфазного гетерохроматину на стадії реплікації ДНК, за даним способом ранньої цитогенетичної онкодіагностики на соматичних клітинах крові, поза пухлиною - корелювало з верифікацією клінічного діагнозу онкологічного захворювання.

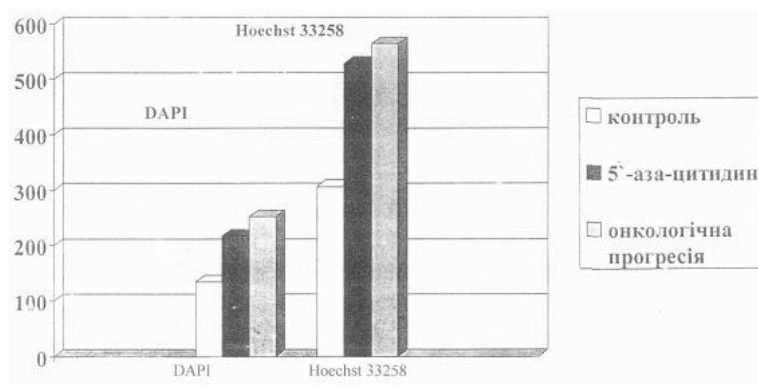
#### Приклад 3

Хвора Б., 48 років, пройшла лікування з хірургічним втручанням за клінічною верифікацією діагнозу - карцинома щитоподібної залози. За способом корисної моделі аналізували інтенсивність флюоресценції інтерфазних ядер фітогемаглютинін-бласттрансформованих лімфоцитів периферійної крові хворої за специфічними до гетерохроматину DAPI та Hoechst 33258 флюорохромами, де визначався достовірний приріст флюоресценції інтерфазного гетерохроматину у порівнянні з контролем здорових донорів на  $74 \pm 6,23\%$ , який корелював з онкологічною прогресією.

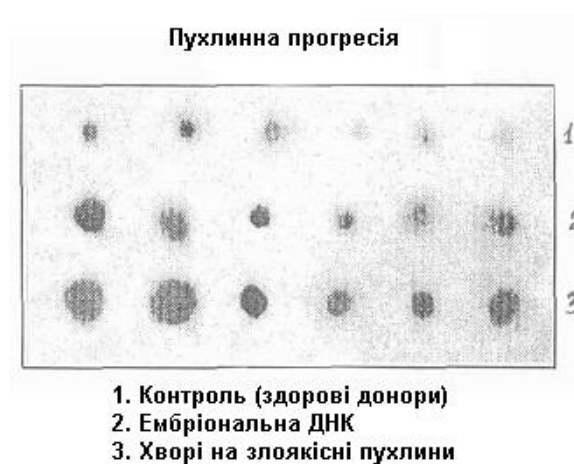
Отже, чинник гетерохроматинізації інтерфазного гетерохроматину є принциповим генетичним надмолекулярним маркером, що асоціюється з глобальним ДНК-гіпометилуванням на рівні геному соматичних клітин крові, поза пухлинною, у хворих на онкологічну прогресію, а тому може використовуватись у системі ранньої діагностики онкологічних захворювань.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4