



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64932 (13) U
(51) МПК
G01N 33/49 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ЛЮДИНИ

1

2

(21) u201104515

(22) 13.04.2011

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) ПІЛІНСЬКА МАРІЯ АНДРІЇВНА, ДИБСЬКИЙ СЕРГІЙ СЕРГІЙОВИЧ, ДИБСЬКА ОЛЕНА БОРИСІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ"

(57) 1. Спосіб діагностики прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові людини, що включає провокацію пошкодження геному хімічною сполукою (блеоміцином).

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для обробки культури лімфоцитів використовується колцемід протягом 4-х годин.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при виготовленні препаратів метафазних хромосом використовується додаткова обробка препаратів 50 % оцтовою кислотою.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як цитогенетичний критерій чутливості хромосом людини до тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином вживається загальна частота аберцій хромосом.

Корисна модель стосується медицини, зокрема медичної генетики та онкології.

У віддалені строки після Чорнобильської аварії особливу актуальність набувають дослідження т. з. немішеневих ефектів в організмі людини, серед яких провідне значення для реалізації медичних наслідків променевого ураження мають різні форми радіаційно-індукованої нестабільності геному. Це, в свою чергу, викликає необхідність розробки нових методичних підходів до виявлення та оцінки хромосомної нестабільності.

Важливу роль в дестабілізації геному людини відіграє прихована хромосомна нестабільність (ПХН), яка проявляється як гіперчутливість хромосом лімфоцитів периферичної крові до дії мутагенів, що визначається *in vitro* за допомогою мутагенів-провокаторів.

Відомий спосіб виявлення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини, де як мутаген-провокатор використовується іонізуюча радіація, якою опромінюється культура лімфоцитів периферичної крові на постсинтетичній стадії мітотичного циклу (G_2 -radiosensitivity assay). За допомогою цього тесту визначалась радіочутливість хромосом лімфоцитів крові людини *in vitro* для дослідження стабільності геному, переважно при реалізованій онкологічній патології [1 - 3]. Недоліком відомого способу є те, що він потребує наявності додаткового коштовного обладнання (джерело випромінювання, камера для підтримки

температурного режиму при опроміненні клітин), що суттєво обмежує можливості його використань при проведенні цитогенетичного моніторингу.

В останні роки як альтернативу іонізуючому випромінюванню як мутаген-провокатор почали використовувати радіоміметик блеоміцин (G_2 -bleomycin sensitivity assay), який індукує специфічний цитогенетичний ефект (фрагментацію хромосом різного ступеня, внаслідок гальмування синтезу ДНК та порушення її структури) в соматичних клітинах людини [4].

Найбільшого поширення G_2 -bleomycin sensitivity assay, як і тест для визначення чутливості хромосом людини до радіаційного впливу, одержав для цитогенетичного обстеження пацієнтів із злоякісними новоутвореннями [4-10], оскільки генетично детерміновану або індуковану мутагенними факторами хромосомну нестабільність вважають одним з ендогенних факторів ризику індукції та/чи реалізації онкологічної патології [4-7]. Але для визначення прихованої хромосомної нестабільності цей тест не використовувався.

Вищевказані роботи були використані нами як прототип. Основним недоліком цих робіт є відсутність уніфікованої моделі та загальноприйнятої методики для діагностики прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини, а саме:

- використання як мутагена-провокатора двох концентрацій блеоміцину (0,05 та 5,00 мкг/мл), які,

(19) UA (11) 64932 (13) U

не пригнічуючи мітотичної активності клітин, індують достовірне підвищення частоти хромосомних аберацій

- вживання різних типів клітин для моделювання цитогенетичного ефекту (лімфоцити крові людини, лінії лімфобластоїдних клітин людини);

- використання різних типів хромосомних аберацій та цитогенетичних показників (частота аберацій або абераційних метафаз) як маркерів прихованої хромосомної нестабільності;

- відсутність кількісних критеріїв оцінки ступеня чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючої дії блеоїцину.

Вказані недоліки суттєво ускладнюють інтерпретацію та порівняння результатів, отриманих різними дослідниками.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення уніфікованого чутливого методу діагностики та оцінки прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини.

Як модельну тест-систему для визначення індивідуальної чутливості хромосом людини до дії мутагенів використано короткотермінову 4-8-годинну культуру лімфоцитів периферичної крові, яку обробляють на більш чутливій до дії мутагену пізній постсинтетичній G₂ стадії першого мітотичного циклу двома оптимальними концентраціями блеоїцину (0,05 та 5,00 мкг/мл), які, не пригнічуючи мітотичної активності клітин, індують достовірне підвищення частоти хромосомних аберацій (без множинної фрагментації чи пульверизації хромосом), що дозволяє отримати достатню кількість метафаз, якість яких відповідає вимогам, необхідним для коректного цитогенетичного аналізу, та виявляти максимальну варіабельність індивідуальних показників прихованої хромосомної нестабільності.

Як основний цитогенетичний критерій чутливості хромосом людини до тестуючого мутагенного навантаження блеоїцином вперше запропоновано вживати загальну частоту всіх типів аберацій хромосом, а не абераційних метафаз.

Для кількісної оцінки ступеня чутливості хромосом людини до тестуючої дії блеоїцину використано коефіцієнт прихованої хромосомної нестабільності (K_{пхн}), який обчислюється за спрощеною нами формулою [10]:

$$K_{пхн} = M_{пхн} / M, \text{ де}$$

M_{пхн} - індивідуальні значення частоти аберацій хромосом при додаванні тестуючого мутагену (блеоїцину) в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл у індивідуума;

M - граничні значення норми для частоти аберацій хромосом при додаванні тестуючого мутагену (блеоїцину) в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл.

Прийняли, що для гіперчутливих осіб цитогенетичний ефект, індукований блеоїцином, перевищує середньогруповий рівень хромосомних аберацій, тому K_{пхн} буде > 1.

Заявлений спосіб здійснюється таким чином.

Для цитогенетичного аналізу використовують цільну венозну кров (~ 3 мл від однієї особи), яку

вміщують в стандартну 5 мл стерильну пробірку з напиленням гепарину (Sarstedt, Germany) і зберігають в холодильнику не більше 24-х годин до постановки культури. Лімфоцити культивують у стандартних 15 мл стерильних одноразових пробірках (Sarstedt, Germany) в термостаті при температурі 37 °C. Культуральна суміш не містить антибіотиків і ембріональної телячої сироватки і складається з наступних компонентів: 0,5 мл цільної крові + 5,0 мл живильного середовища RPMI1640 з L-глутаміном (Sigma, USA) + 0,01 мл фітогемаглютиніну (Difco "P", США). Культуру лімфоцитів інкубують протягом 52-х годин. На 48-й годині (пізня постсинтетична фаза першого мітотичного циклу) в культуру додають блеоїцин в стерильному фізіологічному розчині в кінцевих концентраціях в культурі 0,05 та 5,00 мкг/мл. Для зупинки розподілу лімфоцитів на стадії метафаз використовують колцемід (Sigma, США), який для максимально можливої синхронізації культури і накопичення достатньої для цитогенетичного аналізу кількості метафазних платівок додають в культуру за 4 години до фіксації, у кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл. Гіпотонічну обробку клітин проводять виготовленим ex tempore та нагрітим до 37 °C 0,075 M розчином хлористого калію - протягом 20 хвилин при температурі 37 °C (в термостаті), після чого клітинний осад фіксують свіжовиготовленою охолодженою сумішшю абсолютного етанолу та крижаної оцтової кислоти (3 : 1) із триразовою зміною фіксатора. При необхідності осад зберігають у морозильній камері при температурі - 20 °C до моменту приготування препаратів метафазних хромосом. Для приготування препаратів метафазних хромосом 5-7 крапель клітинної суспензії наносять на знежирене, вологе скло, яке 2-3 сек. підсушують на термостойку при температурі 45° C, після чого з метою покращення розкиду хромосом в метафазах обробляють 50 % розчином оцтової кислоти протягом 20 сек. Препарати зашифровують та фарбують 2 % розчином барвника Гімза (Giemsa stain, Merk, Німеччина) протягом 5-ти хвилин для проведення традиційного цитогенетичного аналізу рівномірно забарвлених хромосом.

Класичний цитогенетичний аналіз проводять "всліпу", на зашифрованих препаратах. Дешифровку одержаних результатів виконують після закінчення хромосомного аналізу всіх випадків. Від кожної особи аналізують від 200 до 500 метафаз, що відповідають встановленим вимогам. При проведенні цитогенетичного аналізу проводять групове каріотипування. Для оцінки стабільності хромосомного апарата враховують всі аберації хроматидного та хромосомного типів - прості (ацентрики) та складні (симетричні та асиметричні хроматидні обміни; поліцентрики; центричні кільця; аномальні моноцентрики, сформовані в результаті транслокацій, інверсій та інсерцій), які можна вірогідно розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом. Встановлюють частоти абераційних клітин (в %) та рівень всіх виявлених типів хромосомних аберацій (на 100 проаналізованих метафаз). Порівнюють цитогенетичний ефект при додаванні блеоїцину в стандартну 5 мл стерильну пробірку з напиленням гепарину (Sarstedt, Germany) і зберігають в холодильнику не більше 24-х годин до постановки культури.

оміцину на 48-й годині культивування, в кінцевих концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл з таким при стандартному культивуванні інтактних лімфоцитів (без додавання блеоміцину), одержаних від обстеженого індивіда. Вірогідність різниці між отриманими даними проводять з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Технічна задача вирішується за рахунок того, що використовуються дві оптимальні концентрації блеоміцину (0,05 та 5,00 мкг/мл), які індуюють достовірне підвищення частоти хромосомних аберацій без пригнічення мітотичної активності культури, якими обробляється культура лімфоцитів крові людини в найбільш чутливий до дії мутагену пізній постсинтетичний стадії першого мітотичного циклу. Окрім того, обробка культури лімфоцитів колцемідом (а не колхіцином) протягом останніх 4-х (а не двох) годин сприяє накопиченню клітин першого мітотичного розподілу, а додаткова обробка препаратів 50 % оцтовою кислотою оптимізує розкид хромосом в метафазах, що дає можливість одержати кількість якісних метафазних платівок, необхідну для коректного цитогенетичного аналізу.

Перевагою способу, на відміну від прототипу, є його економічність (не використовується таке коштовне обладнання та реагенти як джерело іонізуючого випромінювання, камера для підтримки температурного режиму при опроміненні крові, антибіотики та ембріональна теляча сироватка; за рахунок накопичення якісних мітозів з'являється можливість проаналізувати кількість метафаз, достатню для оцінки стабільності хромосомного апарата в культурі лімфоцитів людини при додаванні блеоміцину з використанням мінімальної кількості крові); інформативність (за допомогою способу можна виявити осіб з прихованою хромосомною нестабільністю, яка експресується в клітинах людини тільки при використанні мутагену-протокактора).

Приклад 1

При цитогенетичному обстеженні пацієнта з раком легенів № 1 (чол., 50 р.) вихідний (фоновий) рівень хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові становив 1,6 на 100 проаналізованих метафаз. Цей показник знаходиться в межах норми загальноприйнятих популяційних значень (1,0 - 3,0 на 100 метафаз).

Індивідуальна частота хромосомних аберацій, індукованих блеоміцином, становила 8,2 та 23,0 на 100 метафаз при концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл, відповідно. Визначена верхня границя норми ПХН у осіб даної групи для загальної частоти хромосомних аберацій, яка дорівнює 47,13 та 55,95 на 100 метафаз, відповідно.

Для обстеженого донора №1 $K_{ПХН}$ становлять $8,2/47,13 = 0,17$ та $23,0/55,95 = 0,41$ (для концентрацій 0,05 та 5,00 мкг/мл, відповідно), що менше 1 і свідчить про відсутність прихованої хромосомної нестабільності.

Приклад 2

При цитогенетичному обстеженні пацієнта з раком легенів № 2 (чол., 61 р.) вихідний (фоновий) рівень хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові становив 1,40 на 100 метафаз. Цей

показник знаходиться в межах норми загальноприйнятих популяційних значень (1,0 - 3,0 на 100 метафаз).

Індивідуальна частота хромосомних аберацій, індукованих блеоміцином, становила 109,25 та 99,59 на 100 клітин при концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл, відповідно. Визначена верхня границя норми ПХН у осіб даної групи для загальної частоти хромосомних аберацій, яка дорівнює 47,13 та 55,95 на 100 метафаз, відповідно.

Для обстеженого донора № 2 $K_{ПХН}$ становлять $109,25/47,13 = 2,32$ та $99,59/55,95 = 1,78$ (для концентрацій 0,05 та 5,00 мкг/мл, відповідно), що більше 1 і свідчить про наявність прихованої хромосомної нестабільності.

Приклад 3

При цитогенетичному обстеженні пацієнта з раком легенів № 3 (чол., 47 р.) вихідний (фоновий) рівень хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові становив 2,60 на 100 метафаз. Цей показник знаходиться в межах норми загальноприйнятих популяційних значень (1,0 - 3,0 на 100 метафаз).

Індивідуальна частота хромосомних аберацій, індукованих блеоміцином, становила 38,0 та 68,5 на 100 клітин при концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл, відповідно. Визначена верхня границя норми ПХН у осіб даної групи для загальної частоти хромосомних аберацій, яка дорівнює 47,13 та 55,95 на 100 метафаз, відповідно.

Для обстеженого донора № 3 $K_{ПХН}$ становлять $38,0/47,13 = 0,81$ та $68,5/55,95 = 1,22$ (для концентрацій 0,05 та 5,00 мкг/мл, відповідно). І хоч при концентрації Бл 0,05 мкг/мл значення коефіцієнта ПХН менше 1, при концентрації Бл 5,00 мкг/мл значення коефіцієнта ПХН значно перевищує 1, що дозволяє вважати обстеженого індивіда гіперчутливим до мутагенної дії і підтверджує необхідність використання обох концентрацій Бл для визначення ПХН.

Запропонований спосіб може бути використаний в установах охорони здоров'я для діагностики прихованої хромосомної нестабільності у людини внаслідок радіаційно-індукованої модифікації стабільності геному при формуванні груп ризику з осіб, які зазнали дії іонізуючої радіації, що має провідне значення для прогнозування та попередження віддалених медичних наслідків (зокрема, онкологічної патології) контролюваного чи неконтрольованого опромінення людини.

Джерела інформації:

1. Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer / D. Scot // Cytogen. and Genome Res. - 2004. - Vol. 104, № 1-4. - P. 365-370.

2. Natarajan T. Gamma-radiation-induced chromosomal mutagen sensitivity is associated with breast cancer risk in African-American women: caffeine modulates the outcome of mutagen sensitivity assay / T. Natarajan, N. Ganesan, P. Carter-Nolan [et al.] // Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. - 2006. - Vol. 15. - P. 437-442.

3. Hsu T. C. Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility / T. C Hsu, M. K. Spitz, S. P. Schantz // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention*. -2002.-Vol. 1.-P. 83-89.

4. Adema A. Comparison of bleomycin and radiation in G2 assay of chromatid breaks / A. Adema, J. Closs, R. Verheijen [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* - 2003. - Vol. 79, № 8. -P. 655-661.

5. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? / G. Szekely, E. Remenar, M. Rafsler [et al.] // *Mutagenesis*. - 2003. - Vol. 18, № 1. - P. 59-63.

6. Zajaczek S. Bleomycin test sensitivity in healthy children / S. Zajaczek, G. Krzanowska-Michalska, E. Pikula [et al.] // *Abstracts of 4th Europ. Cytogenetics Conf., Bologna*. -2003.-P. 43.

7. Dabrowski P. Hidden chromosome instability and risk of laryngeal cancer incidence / P. Dabrowski, S. Kita, W. Szyfter [et al.] // *Otolaryngol. Pol.* - 1999. - Vol. 53, № 3. -P. 245-251.

8. Gajicka M. Non-random distribution of chromatid breaks in lymphocytes of laryngeal squamous cell carcinoma patients / M. Gajicka, M. Jarmuz, W. Szyfter [et al.] // *Oncology Reports*. - 2004. - № 12. - P. 153-157.

9. Closs J. Involvement of cell cycle control in bleomycin-induced mutagen sensitivity / J. Closs, O. Temmink, M. Ceelen [et al.] // *Environm. and Molec. Mutagenesis*. - 1999. -Vol. 40, №2.-P. 79-84.

10. Дьоміна Е. А., Дружина М. О., Рябченко Н. М. Індивідуальна радіочутливість людини / ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України. - К.: Логос, 2006. - 126 с.