



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85714** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61B 10/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2013 07549</b>	(72) Винахідник(и): <b>Грабовий Олександр Миколайович (UA), Антонюк Сергій Анатолійович (UA), Воробей Євген Анатолійович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>14.06.2013</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.11.2013</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.11.2013, Бюл.№ 22</b>	

## (54) СПОСІБ НЕПРЯМОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ДНК У ЯДРАХ КЛІТИН ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИН ТОВСТОЇ КИШКИ

### (57) Реферат:

Спосіб непрямого визначення вмісту ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки включає гістологічне дослідження клітин епітеліальних пухлин товстої кишки, вимірювання площі перетину ядра клітин на препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином. Вміст ДНК у ядрах клітин вираховують за формулою:

$$\text{ДНА} = 0,0017S^2 \times 0,012S,$$

де ДНА - кількість ДНК у ядрі клітини кратне диплоїдному (2с),

S - площа перетину ядра клітини на гістологічному препараті.

UA 85714 U



Корисна модель належить до медицини, а саме до патологічної анатомії і може використовуватися для визначення плідності клітин епітеліальних пухлин товстої кишки (ЕПТК) при рутинному гістологічному дослідженні, що дасть змогу об'єктивувати визначення прогнозу перебігу хвороби та скорегувати лікування.

Зміни кількості ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки є типовим явищем [1]. Воно пов'язане з геномною нестабільністю, яка реалізується в поліплоїдії та анеуплоїдії [2]. На сьогодні отримано значну кількість даних, що показують зв'язок між змінами геному при ЕПТК та характером перебігу захворювання [3]. Проведено багато досліджень з метою виявлення зв'язку між вмістом ДНК (плідністю) у ядрах пухлинних клітин та гістологічним типом пухлини і, перш за все з її злоякісним потенціалом [4]. Отримані данні щодо кількості ДНК у ядрах клітин та прогнозу при колоректальному раку, дали підґрунтя для формування уявлення про важливість цього показника, але який сам по собі не є абсолютним, що пов'язано з мінливістю даного явища. Це стало приводом до пошуку більш достовірних об'єктивних показників злоякісності та прогнозу ЕПТК, які враховують зміни кількості ДНК у комплексі з мітотичною активністю та низкою інших ознак [5].

За найближчий аналог (прототип) запропонованого способу для визначення ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки вибрано спосіб прямого визначення кількості ДНК у ядрах клітин пухлини після забарвлення гістологічних препаратів за Фельгіном та денсіометричною оцінкою оптичної щільності ядер клітин [Диагностическая медицинская плоидометрия /под ред. Г.Г. Автандилова. - М.: Медицина, 2006.-192 с.].

Позитивним у прототипі є те, що даний спосіб дозволяє визначити плідність клітин пухлини та використати цей показник для визначення ступеня злоякісності новоутворення.

Недоліком прототипу є те, що підрахунок плідності клітин епітеліальних пухлин товстої кишки проводиться на препаратах забарвлених за Фельгіном, на яких неможливо достовірно відрізнити пухлинні клітини від клітин стромы та запального інфільтрату, спосіб потребує застосування спеціального складного способу забарвлення та оцінки гістохімічної реакції, що у зв'язку зі значною трудомісткістю робить його практично непридатним для використання у повсякденному діагностичному процесі.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб непрямого визначення вмісту ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки, шляхом вимірювання площі перетину ядра, що дасть можливість визначити залежність розмірів ядра клітин пухлини від вмісту нуклеїнових кислот.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

Визначення вмісту ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки, що включає вимірювання площі перетину ядра клітин на препаратах забарвлених гематоксином і еозином, який відрізняється тим, що вміст ДНК у ядрах клітин вираховують за формулою:

$$DNA = 0,0017S^2 \times 0,012S, \quad (1)$$

де:

ДНА - кількість ДНК у ядрі клітини кратне диплоїдному (2с),

S - площа перетину ядра клітини на гістологічному препараті.

Послідовна методика виконання способу:

1. Роблять 5 (можливо і більше) цифрових знімків гістологічного препарату епітеліальних пухлин товстої кишки забарвленого гематоксином і еозином на збільшенні об. 40, ок. 10.

2. Використовуючи морфометричні програми Видео-Тест, Имаджер-ГЦ, ImageJ, ImegeTools або інші, що постачають разом з цифровими камерами до мікроскопів, вимірюється площа перетину ядра пухлинних клітин (мкм<sup>2</sup>).

3. За формулою 1 проводять обчислення вмісту ДНК у ядрі кожної клітини, де значення "1" відповідає диплоїдному стану генома пухлини. Після чого може бути розрахований середній показник. Для отримання достовірних середніх значень вмісту ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки і, відповідно, визначення плідності пухлини необхідний підрахунок не менше ніж у 5 різних точках пухлини з оцінкою не менше ніж 300 клітин пухлини.

4. Для внутрішнього контролю якості дослідження використовують виміри розмірів ядер лімфоцитів, що знаходяться у стромі пухлини. Середня площа ядер лімфоцитів у гістологічному препараті зробленому з дотриманням вимог гістологічної техніки, у якому відсутні явища ретракції або набряку становить 13,4±2,5 мкм<sup>2</sup> (M±δ).

Прикладом конкретного виконання способу є дослідження достовірності оцінки непрямого визначення вмісту ДНК у клітинах епітеліальних пухлин товстої кишки.

Дослідження були проведені на біопсійному матеріалі або матеріалі вилученому при оперативному втручанні від 6 пацієнтів з епітеліальними пухлинами товстої кишки.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10 % формаліні з pH 7,4 та ущільнювали у парафін зі застосуванням гістіопроектора Histos-5 (Milestone, Italy). З отриманих блоків виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 5 мікрметрів за допомогою мікротома Microm HM325 (Thermo scientific, Germany). Зрізи забарвлювалися гематоксиліном і еозином для загальної оцінки пухлини, галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном (pH 1,62, 37 °C, 24 години) для виявлення вмісту нуклеїнових кислот (НК) у клітинах, що досліджують [2, 4]. Для кожного випадку частину зрізів обробляли РНК-азою для екстракції РНК [4]. Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 за стандартизованих умов.

На отриманих зображеннях з препаратів забарвлених галоціанін-хромовим галуном (збільшення мікроскопа  $\times 400$ ,  $1280 \times 960$  пікселів RGB) у 30 клітинах кожної пухлини, за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1,46, визначали: площу перетину ядра клітини (Narea), питому оптичну щільність ядра клітини (NDM), інтегративну оптичну щільність ядра клітини (NIntDen), а також розраховували об'єм ядра (NV) та вміст у ньому сумарної кількості нуклеїнових кислот (NHK) і ДНК (ВДНК) за формулами:

$$NV = \frac{3}{4} \cdot Narea^2 \cdot \sqrt{Narea/\pi} \quad (2)$$

$$NHK \text{ (ВДНК)} = NIntDen \cdot \frac{3}{4} \cdot Narea \cdot \sqrt{Narea/\pi} \quad (3)$$

Як вихідну точку відліку для оцінки вмісту НК у ядрах пухлинних клітин використали показники прийнятий за одиницю, притаманні ядрам лімфоцитів (2с), що знаходилися у стромі пухлин. Шляхом регресійного аналізу зі застосуванням програми Excel 10 визначена закономірність та визначення формула залежності між площею перетину ядра та вмістом ДНК з урахуванням зміни плодючості. Співставленні результати прямого та непрямого визначення місту ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки.

Проведений порівняльний аналіз між визначеннями вмісту ДНК у клітинах епітеліальних пухлин товстої кишки (Таб. 1) прямим денсіметричним способом при гістохімічному забарвленні зрізів галоціанін-хромовим галуном та непрямим способом на препаратах забарвлених гематоксиліном і еозином показав, що середні значення як площ перетину ядер (1) так і вміст у них ДНК при кількості досліджених клітин 300 (не менше ніж у 5 точках кожної пухлини) достовірно не відрізняються.

Таблиця 1

Площа ядер клітин епітеліальних пухлин товстої кишки (мкм<sup>2</sup>) та вміст у них ДНК (1 у.о. = 2с) при прямому та непрямому визначенні (кількість клітин у кожній групі - 300)

№	Пряме визначення ДНК		Непряме визначення ДНК		t (S)	t (ДНК)
	S (мкм <sup>2</sup> )	ДНК (у.о.= 2с)	S (мкм <sup>2</sup> )	ДНК (у.о.= 2с)		
1	38,1 $\pm$ 5,6	2,1 $\pm$ 0,4	41,9 $\pm$ 11,1	2,6 $\pm$ 1,9	1,82	2,0
2	25,5 $\pm$ 4,3	0,8 $\pm$ 0,3	23,8 $\pm$ 5,2	0,7 $\pm$ 0,4	1,95	1,72
3	55,9 $\pm$ 10,53	4,3 $\pm$ 2,1	53,2 $\pm$ 17,0	4,7 $\pm$ 3,4	1,02	0,85
4	52,0 $\pm$ 9,63	4,1 $\pm$ 1,0	53,2 $\pm$ 16,1	4,5 $\pm$ 3,1	0,42	1,03
5	43,6 $\pm$ 7,0	2,2 $\pm$ 0,9	41,5 $\pm$ 10,5	2,6 $\pm$ 1,3	1,29	1,89
6	31,6 $\pm$ 6,7	1,9 $\pm$ 0,9	34,1 $\pm$ 7,0	1,6 $\pm$ 0,8	1,89	1,74

Таким чином, запропонований спосіб непрямого визначення ДНК у клітинах епітеліальних пухлин товстої кишки на препаратах забарвлених гематоксиліном і еозином є достатньо достовірним і придатним для використання в рутинній патогістологічній оцінці властивостей клітин епітеліальних пухлин товстої кишки. Перевагами способу є чітка ідентифікація пухлинних та не пухлинних клітин, простота способу і можливість його реалізації з використанням гістологічних препаратів забарвлених рутинним методом зі застосуванням гематоксиліну і еозину.

Джерела інформації:

1. Aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer / M.V. Hadjihannas, M. Brückner, B. Jerchow [et al.] // PNAS.-2006. -Vol. 103, № 28. - P. 10747-10752.
2. Лупа Х. Основы гистохимии / Х. Лупа: пер. с нем. - М.: Мир, 1980.-344 с.
3. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию / К. Ташке: пер. с рум. - М.: Мир, 1980. - 192 с.
4. Prognostic Factors in Colorectal Cancer / C.C. Compton, L.P. Fielding, L.J. Burgart [et al.] // Arch. Pathol. Lab. Med.-2000. - Vol. 124. - P. 979-994.

5. Dalton W.B. Mitotic Origins of Chromosomal Instability in Colorectal Cancer / W.B. Dalton, V.W. Yang // Curr. Colorectal. Cancer Rep.-2007. - Vol. 3, №2. -P. 59-64.

6. Диагностическая медицинская плоидометрия / под ред. Г.Г. Автандилова. - М.: Медицина, 2006.-192 с. (прототип).

5

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб непрямого визначення вмісту ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки, що включає гістологічне дослідження клітин епітеліальних пухлин товстої кишки, вимірювання площі перетину ядра клітин на препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, який **відрізняється** тим, що вміст ДНК у ядрах клітин вираховують за формулою:

10

$$\text{ДНА} = 0,0017S^2 \times 0,012S,$$

де ДНА - кількість ДНК у ядрі клітини кратне диплоїдному (2с),

S - площа перетину ядра клітини на гістологічному препараті.

15

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601