



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86313** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 08158	(72) Винахідник(и): Грабовий Олександр Миколайович (UA), Зарецький Михайло Борисович (UA), Василишин Олег Ігорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.06.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.12.2013	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2013, Бюл.№ 24	

(54) СПОСІБ НЕПРЯМОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ДНК У ЯДРАХ КЛІТИН НЕЙРОБЛАСТОМ

(57) Реферат:

Спосіб непрямого визначення вмісту ДНК у ядрах клітин нейробластом включає вимірювання площі перерізу ядра клітин на препаратах, забарвлених гематоксилином і еозином. Крім цього, вміст ДНК у ядрах клітин вираховують за формулою:

$DHK = S \cdot (0,0482 \cdot \ln S - k)$, де

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

S - площа перерізу ядра клітини на гістологічному препараті,

k - гангліоневроми = 0,11; гангліонейробластоми = 0,1, нейробластоми (власне) = 0,0703.

UA 86313 U

Заявка належить до галузі медицини, а саме до патологічної анатомії і може використовуватися для визначення плоідності клітин нейробластоми при рутинному гістологічному дослідженні, що дасть змогу об'єктивувати визначення прогнозу перебігу хвороби та скорегувати лікування.

Зміни кількості ДНК у ядрах клітин нейробластоми є типовим явищем. Вони пов'язані з геномною нестабільністю, яка реалізується в поліплоїдії та анеуполоїдії. Визначення кількості ДНК в ядрах клітин можливі різними методиками: флуоресцентна проточна цитометрія, цитофотометрія ядер, що забарвлені фуксином, флуоресцентна скануюча цитометрія [1]. Для проточної цитометрії використовують метод руйнування тканини з наступним забарвленням ядер флуорохромом. Для флуоресцентної скануючої цитометрії використовують фіксовані та забарвлені флуорохромом цілі органи. В методі цитофотометрії використовують давлені в оцтовій кислоті (або іншому фіксаторі) фіксовані препарати органів. Точність досліджень залежить від процедури виготовлення зразків, точності приладів та методів математичної обробки даних [2, 3].

Прототипом запропонованого способу є спосіб прямого визначення кількості ДНК у ядрах клітин пухлини після забарвлення гістологічних препаратів за Фельгіном та денсіометричною оцінкою оптичної щільності ядер клітин [Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. - М.: Медицина, 1990. -384 С.].

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

Недоліком прототипу є те, що підрахунок плоідності клітин нейробластоми проводиться на препаратах, забарвлених спеціальним складним способом забарвлення за Фельгіном, на яких неможливо достовірно відрізнити пухлинні клітини від клітин строми та запального інфільтрату, спосіб потребує застосування та оцінки гістохімічної реакції.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб непрямого визначення вмісту ДНК у ядрах клітин нейробластом шляхом визначення динамічної залежності розмірів ядра клітин пухлини від вмісту нуклеїнових кислот, у тому числі ДНК, що дасть можливість забезпечити визначення плоідності клітин пухлини, та використати цей показник для визначення ступеня злоякісності новоутворення.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

Визначення вмісту ДНК у клітинах пухлини проводять непрямым способом шляхом обчислення з використанням як первинних даних площі перерізу ядра пухлинної клітини на гістологічному препараті, забарвленому гематоксиліном і еозином за формулою:

$$\text{ДНК} = S \cdot (0,0552 \cdot \ln(S) - 0,0903), \quad (1)$$

де

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

S - площа перерізу ядра клітини на гістологічному препараті (мкм).

Послідовна методика виконання способу:

1. Роблять 5 (можливо і більше) цифрових знімків гістологічного препарату нейробластоми забарвленого гематоксиліном і еозином на збільшенні об. 40, ок. 10.

2. Використовують морфометричні програми Відео-Тест, Имаджер-ГЦ, ImageJ, ImegeTools або інші, що постачаються разом з цифровими камерами до мікроскопів, вимірюють площу перерізу ядра пухлинних клітин (мкм²).

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 нейробластоми і, відповідно, визначення плоідності 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 $13,4 \pm 2,5 \text{ мкм}^2$ ($M \pm \delta$).

Прикладом конкретного виконання способу є дослідження достовірності оцінки непрямого визначення вмісту ДНК у клітинах нейробластом.

Дослідження були проведені на матеріалі біопсій або вилученому при оперативному втручанні від 7 пацієнтів з нейробластомою.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10 % формаліні з рН 7,4 та ущільнювали у парафін із застосуванням гістіопроесор Histo-5 (Milestone, Italy). З отриманих блоків виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 5 мікрометрів 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. Для кожного випадку частину зрізів обробляли РНК-азою для екстракції РНК. 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 $\times 400$, 1280×960 пікселів RGB) у 30 клітинах кожної пухлини за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1,46 визначали: площу перерізу 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 (NDHK) за формулами:

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

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

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

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

Таблица 1

Площа ядер клітин нейробластом (мкм²) та вміст у них ДНК (1 у.о. = 2с) при прямому та непрямому визначенні (кількість клітин у кожній групі - 300)

№, № ПГЗ	Пряме визначення ДНК		Непряме визначення ДНК		t (S)	t (ДНК)
	S (мкм)	ДНК (у.о.= 2с)	S (мкм)	ДНК (у.о.= 2с)		
1. 14938-47/12	22,13±5,37	2,04±0,78	21,6±3,88	1,93±0,58	1,7	1,9
2. 9435-42/8	18,52±4,25	1,35±0,56	18,11±3,8	1,44±0,52	1,6	2,0
3. 2778-82/08	30,61±9,0	3,41±0,12	29,88±7,54	3,26±1,29	1,4	2,0
4. 18780-1/08	24,98±5,68	2,3±0,28	25,31±3,14	2,23±0,61	1,0	1,8
5. 11779-3/08	37,86±9,06	4,58±1,61	38,93±10,29	4,86±1,9	2,0	1,9
6. 9281/08	16,95±3,57	1,41±0,68	17,26±3,01	1,32±0,41	1,5	2,0
7. 16920-2/08	33,51±14,7	3,06±1,26	31,87±7,28	3,26±1,18	1,9	1,98

Таким чином, запропонований спосіб непрямого визначення ДНК у клітинах нейробластом на препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином є достатньо достовірним і придатним для використання в рутинній патогістологічній оцінці властивостей нейробластом.

Перевагами способу є чітка ідентифікація пухлинних та непухлинних клітин, простота способу і можливість його реалізації з використанням гістологічних препаратів, забарвлених рутинним методом зі застосуванням гематоксиліну і еозину.

Джерела інформації:

1. Пичугин Ю. Г., Семьянов К. А., Чернышев А. В. и др... Особенности цитометрических методов определения содержания ДНК в ядре. / Цитология 2012, Том 54, №2.

2. Ташке К. (1980) Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. (Пер. с рум.). М.: Изд. Акад. Соц. Респ. Румынии: 192.

3. Лупа Х. Основы гистохимии / Х. Лупа: пер. с нем. - М.: Мир, 1980.-344 с. (прототип).

4. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. - М.: Медицина, 1990.-384 С.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб непрямого визначення вмісту ДНК у ядрах клітин нейробластом, що включає вимірювання площі перерізу ядра клітин на препаратах, забарвлених гематоксилином і еозином, який **відрізняється** тим, що вміст ДНК у ядрах клітин вираховують за формулою:
- $$\text{ДНК} = S \cdot (0,0482 \cdot \ln S - k), \text{ де}$$
- ДНК - кількість ДНК у ядрі клітини, кратне диплоїдному (2с),
 S - площа перерізу ядра клітини на гістологічному препараті,
 k - гангліоневроми = 0,11; гангліонейробластоми = 0,1, нейробластома (власне) = 0,0703.

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