



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 58404

(13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ МЕТАФАЗНИХ ХРОМОСОМ ІЗ КУЛЬТУРИ АМНІОЦИТІВ

1

2

(21) 2003032589

(22) 25 03 2003

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл. № 7, 2003 р.

(72) Гулеюк Наталя Любомирівна, Заставна Дану-
та Володимирівна, Безкоровайна Галина Михайлі-
вна, Акоюн Гаяне Рубенівна, Козаревська Ірина
Степанівна(73) ІНСТИТУТ СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб отримання препаратів метафазних хромосом із культури амніоцитів, який включає синхронізацію культури амніоцитів, внесення колхіцину, гіпотонізацію та фіксацію, який **відрізняється** тим, що після внесення колхіцину культуру амніоцитів знімають зі скла культурального флакона, суспензію клітин центрифугують і після гіпотонізації та фіксації розкапують на предметні стек-

Винахід відноситься до медичної генетики, а саме до цитогенетики і може бути використаний для отримання препаратів метафазних хромосом із культури амніоцитів.

Відомі способи отримання препаратів метафазних хромосом із культури амніоцитів, які ґрунтуються на синхронізації культури амніоцитів, вирощених на покривних стеклах у чашках Петрі, внесенні розчину колхіцину, гіпотонізації та фіксації препаратів метафазних хромосом *in situ* [1, 2].

Недоліком цих способів приготування препаратів метафазних хромосом з культури амніоцитів є трудомісткість, методична складність, поганий розкид хромосом на склі.

Найближчим аналогом є спосіб приготування препаратів метафазних хромосом з культури амніоцитів, який включає синхронізацію культури амніоцитів, вирощену у слайд-флаконах, внесення розчину колхіцину, гіпотонізацію та фіксацію препаратів метафазних хромосом *in situ* [3].

Недоліком цього способу приготування препаратів метафазних хромосом з культури амніоцитів *in situ* є поганий розкид хромосом.

Задачею винаходу є розробка такого способу отримання препаратів метафазних хромосом з культури амніоцитів, який би за рахунок знімання культури амніоцитів зі скла культурального флакона з послідовним розкапуванням гіпотонізованої та зафіксованої-клітинної суспензії на предметні скла дозволив би покращити розкид хромосом.

Поставлена задача вирішується тим, що в спосіб отримання препаратів метафазних хромосом з культури амніоцитів, який включає синхроні-

зацію культури амніоцитів, внесення розчину колхіцину, гіпотонізацію та фіксацію препаратів метафазних хромосом, згідно з винаходом, після внесення колхіцину в культуральне середовище, культуру амніоцитів знімають зі скла флакона, і після гіпотонізації та фіксації, суспензію клітин розкапують на предметні скла.

Знімання культури амніоцитів зі скла культурального флакона з наступним розкапуванням клітинної суспензії на предметні скла забезпечує більший вихід препаратів, придатних для цитогенетичного аналізу, оскільки розкапування забезпечує добрий розкид хромосом і знижує кількість пластин з поліплоїдним та анеуплоїдним набором хромосом. При цьому, відпадає необхідність у повторних заборах біологічного матеріалу.

Спосіб виконують наступним чином: сформовану культуру амніоцитів синхронізують заміною середовища росту, через 16-20 годин вносять 0,5-0,8 мкг/мл колхіцину на 5-6 годин. Далі культуру промивають, знімають зі скла трипсин-версеном та скрейпером, суспензію клітин центрифугують, гіпотонізують 0,075M розчином KCl, фіксують стандартним фіксатором (етанол оцтовою льодяною кислотою) та розкапують на предметні скла.

Приклад 1

Тетяна О., 22 роки, вагітність перша, 23-24 тижні, скерована на інвазивну пренатальну діагностику у об'ємі амніоцентезу з приводу завищеного у 2,5 рази альфа-фетопротейну у крові, відносного багатовіддя та двобічних піелоектазій плоду.

Клітини амніотичної рідини, отримані під час амніоцентезу, культивували до формування куль-

(13) A
58404
(11)
(19) UA

тури амніоцитів, проводили заміну середовища з метою синхронізації клітин. Через 16-20 годин у середовище вводили колхіцин в концентрації 0,5-0,8мкг/мл на 5-6 годин. Далі середовище зливали, культуру промивали розчином HEPES та вносили по 3-4мл розчину трипсин-версену. Через 2-3 хв розчин відсмоктували, а культури залишали ще на 5-6хв при кімнатній температурі. Після цього флакони заливали середовищем, скрейпером зшкрябували решту клітин із дна флакона, клітини відцентрифугували, до клітинної суспензії додавали 3-4мл 0,075М теплої розчину KCl на 15хв, проби центрифугували, вводили стандартний охолоджений фіксатор етанол оцтова льодяна кислота в пропорції 3:1. Фіксацію проводили при кімнатній температурі протягом 30-40хв. Суспензію клітин розкапували на предметні скла.

Приклад 2

Валентина Б., 36 років, 1-ша вагітність 17-18 тижнів. Скерована на інвазивну пренатальну діагностику в об'ємі амніоцентезу з приводу вікового цензу, заниженого рівня альфа-фетопroteinу та завищеного хоріогонічного гонадотропіну в крові вагітної. У рідного брата - син з синдромом Дауна.

Клітини амніотичної рідини культивували до формування культури амніоцитів, культуру синхронізували заміною середовища. Через 16-20 годин у середовище вводили колхіцин в концентрації 0,5-0,8мкг/мл на 5-6 годин. Далі середовище зливали, культуру промивали розчином HEPES та вносили 3-4 мл розчину трипсин-версену. Через 2-3хв розчин відсмоктували, а культури залишали ще на 5-6хв при кімнатній температурі. Після цього флакони заливали середовищем, скрейпером

зшкрябували решту клітин із дна флакона, клітини відцентрифугували, до клітинної суспензії додавали 3-4мл 0,075М теплої розчину KCl на 15хв, проби центрифугували, вводили стандартний охолоджений фіксатор етанол оцтова льодяна кислота в пропорції 3:1. Фіксацію проводили при кімнатній температурі протягом 30-40хв. Суспензію клітин розкапували на предметні скла.

Запропонований спосіб використаний при 25 дослідженнях. При цьому, у 20 випадках вдалося отримати більше 50 метафазних хромосомних пластин на скло з повним набором хромосом, придатних для аналізу, а у 5 випадках - 25-30 метафаз на скло з повним набором хромосом, придатних для аналізу, в той час як при використанні способу найближчого аналога в усіх 25 випадках отримані 10-15 метафазних пластин на скло. Таким чином, використання запропонованого способу дозволяє збільшити вихід якісних препаратів хромосом при зменшенні кількості клітинного матеріалу.

Джерела інформації

1. Гринберг К.Н., Кухаренко В.И., Золотухина Т.В. // Методические рекомендации по культивированию клеток для диагностики наследственных болезней человека. - М. - 1990. - С. 19-22.

2. Современные проблемы в клинической цитогенетике (под редакцией Н.П.Кулешова) - М. - 1991. - С. 103-104.

3. Арбузова С.Б., Хлевная Л.А., Малова С.А. Усовершенствованная методика культивирования и фиксации амниоцитов человека // Биополимеры и клетка. - 1996. - Т. 14, №6. - С. 559-560. - ближайший аналог.