



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82455** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 8/00
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 11026	(72) Винахідник(и): Гулеюк Наталія Любомирівна (UA), Заставна Данута Володимирівна (UA), Ткач Ірина Романівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 21.09.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.08.2013	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. М. Лисенка, 31-а, м. Львів, 79000 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.08.2013, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПРОМЕТАФАЗНИХ ТА РАННЄМІТОТИЧНИХ ХРОМОСОМ ІЗ КУЛЬТУРИ ЛІМФОЦИТІВ

(57) Реферат:

Спосіб отримання прометафазних та раннємітотичних хромосом із культури лімфоцитів включає забір периферійної крові, культивування, гіпотонізацію розчином KCl, фіксацію сумішшю етанолу/метанолу та льодяної оцтової кислоти, центрифугування, розкапування осаду клітин на зволожені охолоджені стекла, фарбування диференційним методом та цитогенетичний аналіз за допомогою світлового мікроскопа. При цьому після забору крові та культивування додають етидіум бромід, колцемід, відцентрифугують, додають гіпотонічний розчин, фіксатор, центрифугують та проводять цитогенетичний аналіз.

UA 82455 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема - медичної генетики, а саме – цитогенетики, і може бути використана для детекції хромосомних аномалій у людини.

Відомі способи детекції хромосомних аномалій ґрунтуються на 72-годинному культивуванні лімфоцитів периферійної крові, фіксації культур, отриманні препаратів метафазних пластин хромосом та цитогенетичному аналізі в світловому мікроскопі [1-7].

Найближчим аналогом є метод отримання препаратів прометафазних та ранньмітотичних хромосом для цитогенетичного аналізу, який полягає у додатковому додаванні в процесі культивування метотрексату та 5-бромдезоксипіридину/тимідину, актиноміцину Д та додаткової заміни середовища [2].

Недоліком аналогів є застосування в процесі культивування додаткових хімічних чинників (метотрексату, 5-бромдезоксипіридину, актиноміцину) та додаткової заміни культурального середовища, а отже, додаткових матеріальних затрат, та продовження часу культивування лімфоцитів.

Задачею корисної моделі є розробка такого способу діагностики хромосомних аномалій, який би за рахунок доступних та недорогих методів дозволяв покращити цитогенетичний аналіз хромосомних порушень у людини. Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі без додаткових затрат на реактиви та без видовження часу культивування покращується якість діагностики за рахунок отримання препаратів прометафазних та ранньметафазних хромосом. Спосіб забезпечує точну ідентифікацію хромосомної аномалії при зменшенні часу діагностики та здешевленні на 30 % вартості проведення аналізу.

Спосіб застосовують наступним чином: проводять забір венозної крові в кількості 2 мл в гепаринізований стерильний шприц, культивують 72 години в середовищі RPMI1640 з глютаміном, фітогемаглютиніном та 10 % ембріональною телячою сироваткою, на 66-68-й годині культивування вводять 0,5 мл етидіуму броміду в кінцевій концентрації 10 мкг/мл, на 67-69 годині додають 0,05 мл колцеміду в кінцевій концентрації 0,01мкг/мл, культивують 10-20 хвилин, відцентрифугують при швидкості 1500 об/хв. протягом 8 хвилин, супернатант зливають, до осаду додають 5 мл підігрітого до +37,2 °C гіпотонічного розчину 0,075M KCl, витримують при кімнатній температурі 25 хвилин, додають 0,5 мл фіксатора (суміш етанолу/метанолу та льодяної оцтової кислоти у пропорції 3:1), відцентрифугують при 1500 об/хв. протягом 8 хвилин, забирають супернатант, осад струшують та наносять 2-3 краплі клітинної суспензії на охолоджені предметні стекла, отримані препарати диференційно забарвлюють та проводять цитогенетичний аналіз за допомогою світлового мікроскопа.

Приклад 1.

Пацієнт Б., 1981 р.н., проживає у м. Львові, звернувся у 2011 році до Львівського міжобласного медико-генетичного центру з приводу первинного непліддя протягом 5-ти років. В комплексі обстежень виконане цитогенетичне дослідження згідно з стандартним протоколом, викладеним у методичних рекомендаціях [2]. На отриманих препаратах хромосоми знаходились на стадії середньої та пізньої метафази. Зідентифіковано зміни Y-хромосоми невідомого характеру. На підставі підозри хромосомної патології була проведена цитогенетична діагностика за допомогою запропонованого способу.

З 1 мл венозної крові пацієнта шляхом 72-годинного культивування отримано 2 незалежні культури. Після розкапування на предметні стекла та диференційного фарбування виконана цитогенетична діагностика в світловому мікроскопі при збільшенні $\times 1000$. Проаналізовано 20 метафазних пластин із ранньмітотичними та прометафазними хромосомами. Встановлений каріотип 46,X, inv(Y)(p11.2q11.222). Для виявлення походження зміненої Y-хромосоми аналогічне дослідження виконане у батька пацієнта, 1957 р.н. Встановлений аналогічний каріотип 46,X, inv(Y)(p11.2q11.222).

Отримані результати свідчать про те, що:

1. застосований метод дозволяє отримати високоякісні препарати прометафазних та ранньмітотичних хромосом без застосування додаткових хімічних чинників, додаткової заміни середовища та видовження процедури культивування.

2. застосований метод дозволяє провести точну ідентифікацію хромосомної перебудови, що дає можливість встановити коректний діагноз та призначити відповідне лікування.

Отже, в результаті проведення цитогенетичної діагностики у пацієнтів ідентифікована інверсія Y-хромосоми.

Приклад 2.

Пацієнтка Ф, 2011 р.н., народилася та постійно проживає у м. Ужгороді Закарпатської області. Проходила медико-генетичне консультування у Львівському міжобласному медико-генетичному центрі з приводу стигм дизембріогенезу. На підставі підозри хромосомної патології була проведена цитогенетична діагностика згідно з стандартним протоколом (2) та встановлено

наявність 45 хромосом із відсутністю 21-ї хромосоми та зміни довжини коротких плечей 18-ї хромосоми, зідентифіковано зміни хромосом невідомого характеру.

Для ідентифікації хромосомних перебудов виконано цитогенетичні дослідження запропонованим способом.

З 1 мл венозної крові пацієнта Ф. та її батьків методом 72-годинного культивування отримано по 2 незалежні культури від кожного обстежуваного. Проаналізовано по два диференційно забарвлених препарати, по 10 метафаз із прометафазними та ранніми мітотичними хромосомами. Проводили цитогенетичний аналіз в світловому мікроскопі при збільшенні $\times 1000$. У пробанда Ф. встановлений каріотип 45,XX, -18,-21, der(18),t(18;21)(p11;p11).

Отримані результати свідчать про те, що:

1. застосований метод дозволяє отримати високоякісні препарати прометафазних та раннімітотичних хромосом без застосування додаткових хімічних чинників, додаткової заміни середовища та видовження процедури культивування.

2. застосований метод дозволяє провести точну ідентифікацію хромосомної перебудови, що дає можливість встановити коректний діагноз та призначити відповідне лікування.

Отже, в результаті проведення цитогенетичної діагностики встановлено складну хромосомну перебудову, яка включає моносомію по коротких плечах 18-ї хромосоми з утворенням деривату внаслідок транслокації між 18-ю та 21-ю хромосомами.

Запропонований спосіб застосований при 150 дослідженнях. При цьому, в 7 випадках вдалося діагностувати наявність хромосомних перебудов. В той час, як при використанні найближчого аналога, стандартного культивування однозначний діагноз (без продовження культивування із застосуванням додаткових чинників) не вдалося встановити у жодному випадку.

Таким чином, використання запропонованого способу дозволяє збільшити ефективність діагностики при зниженні тривалості процесу та зменшенні матеріальних видатків.

Джерела інформації:

1. Гулеюк Н.Л. Методи культивування амніоцитів: Методичні рекомендації / Н.Л. Гулеюк, Д.В. Заставна, Г.М. Безкоровайна, О.З.Гнатейко. - Київ, 2005.-17 с.

2. Зерова-Любимова Т.Е. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: Методичні рекомендації / Т.Е. Зерова-Любимова, Н.Г. Горovenko. - Київ, 2003.-23 с.

3. Захаров А.Ф. Хромосоми человека. Атлас / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. - М.: Медицина, 1982.-263 с.

4. Bangs C.D. Chromosome Preparation from Peripheral Blood. / C.D. Bangs, T.A. Donlon // Current Protocols in Human Genetics.-2005. - Suppl. 45.-4.1.1-4.1.19.

5. Lockwood D.H. The Use of Subchromosome-Length Unique Band Sequences in the Analysis of Prophase Chromosomes / D.H. Lockwood, D.A. Johnston, V.M. Riccardi, S.O. Zimmerman // Am. J. Hum. Genet.-1988. - V. 43. - P. 934-947.

6. Rybak J. A Simple Reproducible Method for Prometaphase Chromosome Analysis / J. Rybak, A. Tharapel, S. Robinett, M. Garcia, C. Mankinen, M. Freeman // Hum Genet.-1982. - V. 60. - P. 328-333.

7. Sawyer J.R. High resolution mid-prophase human chromosomes induced by echinomycin and ethidium bromide / J.R. Sawyer // Hum Genet.-1995. - V. 95. - P. 49-55.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання прометафазних та раннімітотичних хромосом із культури лімфоцитів, який включає забір периферійної крові, культивування 72 години при $+37,2^{\circ}\text{C}$, гіпотонізацію розчином 0,075M KCl, фіксацію сумішшю етанолу/метанолу та льодяної оцтової кислоти у пропорції 3:1, центрифугування при швидкості 1500 об/хв. протягом 8 хвилин, розкапування осаду клітин на зволожені охолоджені стекла, фарбування диференційним методом та цитогенетичний аналіз за допомогою світлового мікроскопа, який **відрізняється** тим, що після забору крові та культивування на 66-68 годині додають етидіум бромід в кінцевій концентрації 10 мкг/мл, на 67-69 годині додають колцемід в кінцевій концентрації 0,01 мкг/мл на 10-20 хвилин, відцентрифугують, додають гіпотонічний розчин, фіксатор, центрифугують та проводять цитогенетичний аналіз.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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