



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82069** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**G01N 33/00**  
**A61B 5/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 13242</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Лозинський Ростислав Юрійович (UA),</b> <b>Лозинська Марія Ростиславівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>20.11.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.07.2013</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА ТРАНСФУЗІЙНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ",</b> вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, 79042 (UA), <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",</b> вул. М. Лисенка, 31-а, м. Львів, 79000 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.07.2013, Бюл.№ 14</b>	

**(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН АСПІРАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ IN VITRO ДЛЯ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ МЕТАФАЗНИХ ХРОМОСОМ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ ПРИ ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ ЛЮДИНИ**

**(57) Реферат:**

Спосіб культивування клітин аспірату кісткового мозку in vitro для отримання препаратів метафазних хромосом для цитогенетичного аналізу при онкогематологічних захворюваннях людини включає культивування клітин аспірату in vitro в поживному середовищі RPMI та ембріональній телячій сироватці.

**UA 82069 U**



Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема клінічної діагностики, і може бути використана для визначення спектра цитогенетичних змін при онкогематологічних захворюваннях людини (ОГЗ).

Використання Генетичних методів для діагностики ОГЗ не є загальноприйнятим в Україні, незважаючи на чіткий етіологічний зв'язок цих захворювань з порушеннями в генетичному матеріалі. В країні відсутні реєстри сімей з онкопатологією, які б включали інформацію про хромосомні перебудови безпосередньо в ураженій тканині та мутації генів, які можуть бути причиною різноманітних онкологічних захворювань, значну частку яких становлять ОГЗ. До цього часу в Україні не затверджені стандарти діагностики в цитогенетиці пухлин, а останні методичні рекомендації по цитогенетичних методах дослідження хромосом людини були видані у 2005 році і стосувалися культивування клітин амніоцитів навколоплідних вод [1], а у 2003 році - культивування лімфоцитів периферійної крові [2]. На теперішній час в Україні дослідження хромосомної патології здійснюється в цитогенетичних лабораторіях деяких обласних медико-генетичних центрів, де проводиться лише культивування лімфоцитів периферійної крові з подальшим цитогенетичним аналізом метафазних хромосом за допомогою диференційного забарвлення за Романовським-Гімзою (G-метод). В Україні цитогенетичний аналіз метафазних хромосом кісткового мозку шляхом культивування клітин аспірату для диференційного аналізу хромосом при ОГЗ людини виконують лише в поодиноких лабораторіях, переважно приватних, повністю на імпортованому спеціальному лабораторному посуді - стерильних пробірках з дозованою кількістю розчину антикоагулянту, переважно, K<sub>3</sub>ЕДТА для забору аспірату кісткового мозку, а для культивування використовують одноразові стерильні пластикові пробірки також зарубіжного виробництва.

Відомі способи визначення маркерів злоякісного переродження безпосередньо в кістковому мозку на генетичному рівні базуються на виконанні комплексу цитогенетичних і молекулярно-генетичних досліджень. Невід'ємною складовою встановлення гематологічного діагнозу є результати цитогенетичного аналізу метафазних хромосом кісткового мозку з проведенням культивування клітин аспірату кісткового мозку та подальшим фіксуванням клітин і диференційним забарвленням за Романовським-Гімзою (G-метод), а також молекулярно-цитогенетичних методів із застосуванням специфічних флуоресцентних барвників (FISH та SKY). G-метод дозволяє виявити широкий спектр хромосомних аномалій.

Застосування високочутливих методів FISH та SKY для аналізу препаратів хромосом кісткового мозку допомагають підтвердити із вищою достовірністю наявність хромосомних перебудов, виявити складні комплексні перебудови із залученням малих за розміром ділянок хромосом, уточнити їх характер і локалізацію, що має важливе прогностичне значення, а молекулярно-генетичні методи дослідження дозволяють встановити мутації генів, залучених в процес канцерогенезу [3]. Однак, незважаючи на високу інформативність, ці методи через високу вартість обладнання і реактивів не впроваджені в практику охорони здоров'я України.

Відомим аналогом запропонованого способу є спосіб культивування клітин аспірату кісткового мозку *in vitro* у стерильній пробірці. Після проведення пункції аспірат кісткового мозку вводять у стерильну пробірку, в яку додають антикоагулянт літєвий гепарин чи ЕДТА (10 U/ml), поживне середовище RPMI, антибіотики пеніцилін (50 U/ml) та стрептоміцин (50 mg/ml), 20 % ЕТС [4]. Вся робота виконується в боксі (ламінарі). Клітини вирощують в термостаті протягом 24 год. Далі проводять стандартну фіксацію і диференційне фарбування клітин за допомогою G-методу.

У прототипі запропонованого способу є короткотермінове культивування клітин аспірату кісткового мозку *in vitro*, яке проводять таким чином: набирають від 0,2 до 2 мл аспірату кісткового мозку у шприц, змочений антикоагулянтом літєвим гепарином; вводять 7-9 крапель аспірату у стерильний флакон, в який додають 10 мл поживного середовища RPMI та 20 % ЕТС [5]. Як і у вищезгаданому аналогові, робота виконується повністю в боксі (ламінарі). Отже, недоліком прототипу також є необхідність використання спеціального стерильного лабораторного посуду для культивування клітин *in vitro* та виконання основного етапу роботи в боксі.

Задача корисної моделі є розробка такого способу отримання препаратів метафазних хромосом із клітин кісткового мозку, який, за рахунок застосування одноразового стерильного, доступного в Україні, лабораторного посуду, дозволяв би проводити забір біологічного матеріалу (аспірату кісткового мозку) і культивування клітин аспірату *in vitro* навіть поза межами боксованих приміщень (наприклад, при виїздах в райони, де немає можливості роботи в умовах боксу).

Поставлена задача вирішується тим, що у способі культивування клітин аспірату кісткового мозку *in vitro* для отримання препаратів метафазних хромосом для цитогенетичного аналізу при

онкогематологічних захворюваннях людини, що включає культивування клітин аспірату *in vitro* в поживному середовищі RPMI та ембріональній телячій сироватці (ЕТС), згідно з корисною моделлю, шприцом відбирають надлишкову кількість гепарину з фабричного флакона, залишаючи 0,3 мл розчину, і поміщають у флакон щойно взятий аспірат кісткового мозку, потім шприцом об'ємом 10-12 мл, у якому міститься попередньо набране в умовах боксу (ламінару) поживне середовище RPMI (5 мл) та ЕТС (1,0 мл), набирають 1 мл гепаринізованого аспірату, голку закривають ковпачком, а шприц поміщають в термостат для культивування клітин *in vitro* при температурі 37 °С протягом 24-48 год.

Поставлена задача вирішується також тим, що шприц в термостаті кладуть таким чином, щоб голка була піднята під кутом 30°.

Відмінністю запропонованого способу є те, що для забору аспірату кісткового мозку замість спеціальних пробірок із розчином антикоагулянту використовують стандартний флакон з гепарином, з якого шприцом відбирають надлишковий розчин, а культивування клітин кісткового мозку *in vitro* проводять не у спеціальних пробірках, а в одноразовому шприці об'ємом 10-12 мл для забезпечення нормального співвідношення об'єму розчину до повітряного об'єму з попередньо набраними в одноразовий шприц 5 мл поживного середовища RPMI та з 1,0 мл ЕТС.

Поміщений у шприц гепаринізований аспірат з розчином поживного середовища RPMI і ЕТС можна переносити або перевозити в лабораторію, в якій є термостат, що підтримує температуру 37 °С, та яка має всі інші необхідні умови для проведення фіксації та диференційного забарвлення клітин за Романовським-Гімзою (G-метод).

Перевагою нашого способу є доступність придбання стерильного лабораторного посуду, необхідного для виконання роботи. Адже однією з основних умов отримання якісних препаратів метафазних хромосом є умови стерильності для штучного вирощування клітин шляхом їх культивування *in vitro* в поживних середовищах. Це забезпечує достатню інформативність на генетичному рівні.

Спосіб здійснюють таким чином. Напередодні вранці або за добу до проведення посадки клітин аспірату кісткового мозку в термостат у стерильний шприц об'ємом 10-12 мл набирають 5 мл поживного середовища RPMI і 1 мл ЕТС. Після цього голку закривають ковпачком і переносять шприц у місце проведення пункції. В пацієнтів проводять пункцію, набираючи стерильним шприцом 1 мл кісткового мозку. Набраний кістковий мозок зі шприца відразу вводять у фабричний флакон з 0,3 мл гепарину, з якого попередньо видалено надлишкову кількість гепарину. З гепаринового флакона з розчином аспірату кісткового мозку шприцом з поживним середовищем RPMI й ЕТС набирають 1 мл гепаринізованого аспірату, закривають голку ковпачком і поміщають для вирощування клітин у термостат при 37 °С. Шприц у термостаті кладуть таким чином, щоб голка була піднята під кутом 30°. Через 24-48 год. проводять стандартну фіксацію клітин. Препарати фарбують диференційно з використанням барвника Романовського-Гімзи, розчиненого у фосфатному буфері (рН=6,8), з додаванням 3-5 крапель 0,25 % розчину трипсину. Після цього аналізують метафазні пластинки зі зразка.

Клінічний приклад 1. При клінічному обстеженні пацієнту П., 63 роки, в гематологічному відділенні клініки ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України" було встановлено діагноз: хронічна мієлоїдна лейкемія. Основним хромосомним маркером цього захворювання є виявлення філадельфійської хромосоми (Ph). Ця хромосома утворюється в результаті транслокації t(9;22)(q34,q11). Кількість Ph-хромосом може вказувати на перебіг захворювання, тому підрахунок Ph-хромосом у препаратах, отриманих в результаті культивування клітин аспірату кісткового мозку *in vitro* має важливе діагностичне і прогностичне значення. В результаті застосування запропонованого нами способу культивування клітин *in vitro* у шприці було отримано 22 метафазні пластинки високої якості та виявлено в пацієнта мозаїчний каріотип, що містив 5 клонів клітин, з них 4 були патологічні з триплоїдним, тетраплоїдним та октаплоїдним набором хромосом, а диплоїдний та октаплоїдний - з Ph-хромосомою. Каріотип пацієнта (у квадратних дужках наведено окремі клони клітин, в даному випадку - 5 різних) був таким:

46,XY[6]/44,XY, Ph+[10]/3n±[1]/4n±[1]/8n±, 4Ph+[1].

Особливістю каріотипу клітин кісткового мозку при ОГЗ у людини є клональна різноманітність. Тому цитогенетичний аналіз аспірату кісткового мозку, на відміну від лімфоцитів периферійної крові, не вважається коректним, якщо кількість метафазних пластинок є меншою, ніж 15. Низький мітотичний індекс спостерігають навіть при незначному інфікуванні під час культивування клітин *in vitro*. Завдяки застосуванню запропонованого способу вдалося забезпечити повну стерильність роботи і отримати якісний препарат з достатньою кількістю

клітин для аналізу, виявити прогностично небезпечні перебудови метафазних хромосом навіть в октаплоїдному клоні клітин.

Клінічний приклад 2. Пацієнту М, 66 років, в гематологічному відділенні клініки ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України" було встановлено діагноз: хронічна мієломоноцитарна лейкемія. Для підтвердження діагнозу та виявлення ознак прогресування захворювання проведено цитогенетичне дослідження аспірату кісткового мозку із застосуванням запропонованого способу і виявлено (у квадратних дужках наведено окремі клони клітин, в даному випадку - 5 різних) такий каріотип:

47,XY, +8[15]/48,XY, +8,+9[1]/46,XY[2]/4n±[2]/3n±[1].

Завдяки якісним препаратам з достатньою кількістю клітин для аналізу можна було проаналізувати 21 метафазну пластинку і встановити мозаїчний каріотип із 5 різними клонами клітин. На основі отриманого результату аналізу пацієнту було запропоновано відповідне лікування.

Застосування нового способу було апробовано на клітинах аспірату кісткового мозку у 10 пацієнтів із ОГЗ.

Джерела інформації:

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

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

3. Lindval C. Molecular cytogenetic characterization of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple chromosome rearrangements / C. Lindval, M. Nordenskjold, A. Porwit et al. // Haematol.-2001.-86 (11). - P. 1156-1164.

4. Czepulkowski B.H. Basic techniques for the preparation and analysis of chromosomes from bone marrow and leukemic blood / B.H. Czepulkowski, R. Bratt, D.E. Rooney // Human cytogenetics. Malignancy and abnormalities: A practical approach.-1992.-11:26 s.

5. Cornacoff R. Direct and short term procedure for harvesting bone marrow chromosomes: [Електрон. ресурс]. - Режим доступу: <http://www.bioon.com.cn/protocol/showarticle.asp?newsid=14972>.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб культивування клітин аспірату кісткового мозку in vitro для отримання препаратів метафазних хромосом для цитогенетичного аналізу при онкогематологічних захворюваннях людини, що включає культивування клітин аспірату in vitro в поживному середовищі RPMI та ембріональній телячій сироватці (ЕТС), який **відрізняється** тим, що шприцом відбирають надлишкову кількість гепарину з фабричного флакона, залишаючи 0,3 мл розчину, і поміщають у флакон щойно взятий аспірат кісткового мозку, потім шприцом об'ємом 10-12 мл, у якому міститься попередньо набране в умовах боксу (ламінару) поживне середовище RPMI (5 мл) та ЕТС (1,0 мл), набирають 1 мл гепаринізованого аспірату, голку закривають ковпачком, а шприц поміщають в термостат для культивування клітин при температурі 37 °С протягом 24-48 год.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що шприц в термостаті кладуть таким чином, щоб голка була піднята під кутом 30°.