



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115316** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2016 11163	(72) Винахідник(и):	Багацька Наталія Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	07.11.2016	(73) Власник(и):	ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", пр. Ювілейний, 52-а, м. Харків, 61153 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.04.2017		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.04.2017, Бюл.№ 7		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ТРИВОЖНО-ФОБІЧНИМИ РОЗЛАДАМИ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення осіб високого ризику щодо хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові дітей та підлітків із тривожно-фобічними розладами шляхом проведення генетичного дослідження. У хворих проводять цитогенетичне обстеження із застосуванням методів гомогенного та диференційного G-забарвлення препаратів хромосом, і при виявленні $\geq 7,1$ % хромосомних порушень на 100 клітин визначають хромосомну нестабільність.

UA 115316 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до психіатрії та генетики, і може бути використана для прогнозування хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові дітей та підлітків із тривожно-фобічними розладами (ТФР).

Згідно з МКХ-10, тривожно-фобічні розлади відносять до групи "невротичних розладів, пов'язаних зі стресом і соматоформними розладами" (F40-F49). В даний час тривожно-фобічні розлади є найбільш частими серед усіх категорій психічних розладів і реєструються в 3,7-5,1 % випадків; вони відрізняються значним поліморфізмом клінічних проявів, динамічністю і часто є причиною серйозних труднощів в терапії. Особливу небезпеку викликає зростання частоти цього стану в дитячому та підлітковому віці.

На сьогодні існує концепція про роль одного з механізмів соматичної мозаїчності - активація руху мобільних генетичних елементів в патогенезі психічних розладів і вважається, що однією з основних причин дестабілізації геному, змін в системі для підтримання стабільності геному є група РНК-редагуючих білків AID/APOBEC. Відомо, що білки групи APOBEC відіграють важливу роль у збереженні стабільності геному нервових клітин шляхом гальмування необмеженої експансії ретроелементів, що здатні привести до психічних хвороб.

Що стосується стану хромосомного апарату у хворих із психічними хворобами, то дослідження проводилися переважно у дорослих осіб, хворих на великі депресивні та біполярні розлади. Є поодинокі дослідження стану хромосомного апарату у дітей і підлітків із депресивними розладами; встановлено підвищений рівень хромосомних порушень.

Виявлення хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові хворих із ТФР та проведення їм своєчасної профілактики, спрямованої на стабілізацію геному хворої дитини, сприятиме покращанню їх репродуктивного здоров'я у майбутньому.

Відомий спосіб визначення рівня хромосомних порушень у хворих із біполярними розладами. Суть методу полягає у проведенні методу флуоресцентної *in situ* гібридизації із застосуванням коштовних ДНК-праймерів [Аналог: Chromosomal abnormalities and mental illness / D.J. MacIntyre, D.H.R. Blackwood, D.J. Porteous [et al.] // Molecular Psychiatry. - 2002. - Vol. 8. - P. 275-287]. Недоліком цього методу є потреба у коштовних реактивах, барвниках та обладнанні, які необхідні для проведення методу FISH (флуорохроми, люмінесцентний мікроскоп, програмне забезпечення). Крім цього, даний метод дозволяє виявити лише поодинокі мутації для окремих хромосом при шизофренії, які можуть бути сполучені з великими депресивними хворобами.

Відомий спосіб визначення генних мутацій у певній ділянці хромосоми 12 у хворих із великими депресіями [Аналог: Predisposition Locus for Major Depression at Chromosome 12q22-12q23.2 / V. Abkevich, N.J. Camp, Ch.H. Hensel [et al.] // Am. J. Genet. - 2003. - Vol. 73. - P. 1271-1281]. Запропонований метод засновано на проведенні молекулярно-генетичного дослідження із застосуванням 45 високополіморфних молекулярних генетичних маркерів, що спрямовані на виявлення локалізації і чутливості генів в регіоні q22-12q23.2 хромосоми 12. Недоліком цього методу є відсутність повної оцінки стану хромосомного апарату в лімфоцитах периферичної крові хворих. Крім цього, даний метод застосовується лише у дослідженні великих депресивних (MDD) і біполярних хвороб та потребує коштовних реактивів для ідентифікації конкретної перебудови в 12 хромосомі.

Найбільш близьким за технічною суттю до корисної моделі, що заявляється, є спосіб визначення рівня хромосомних порушень у хворих із депресивними розладами [Прототип: Спосіб виявлення осіб високого ризику щодо порушень хромосомного апарату у дітей та підлітків із депресивними розладами / Н.В. Багацька, Т.Ю. Проскурина, Е.А. Михайлова, Інас Гх. Свідан // Пат. на корисну модель, № 10906 МПК (2013) А61В 10/00, G06К 9/00. Заявлено 11.09.2013. Опубліковано 11.03.2014. - Бюл. № 22. - 6 с]. Недоліком цього методу є виявлення рівня хромосомних порушень у хворих з тяжкими депресивними розладами), яким тривалий час застосували антидепресивні препарати, коли на раннє виявлення хромосомних порушень не можна розраховувати.

В основу корисної моделі поставлена задача створення такого способу визначення хромосомної нестабільності у хворих із тривожно-фобічними розладами, при якому шляхом проведення генетичного дослідження можна було б у ранні строки виявляти загальний рівень та типи хромосомних порушень. Дана задача може бути вирішена за допомогою цитогенетичного обстеження хворих із застосуванням методів гомогенного та диференційного G-зabarвлення препаратів хромосом, яке проводиться у хворих з метою виявлення частоти та типів хромосомних аберацій.

Перспективність використання класичного цитогенетичного методу зумовлена тим, що біологічним матеріалом є периферична кров, забір якої не спричиняє негативного враження на

хвору дитину. Метод може використовуватися незалежно від віку людини, він не потребує значних економічних витрат.

При виявленні високого рівня хромосомних аберацій >5,1 % обстежену дитину відносять до групи високого ризику щодо тривожно-фобічних розладів, їй необхідно проводити адекватне лікування, яке спричинятиме елімінацію ушкоджених ділянок хромосом.

Метод цитогенетичного дослідження здійснюють за методикою Т.Е. Зерової-Любимової, Н.Г. Горovenko, 2003 та ISCN, 2013. Матеріалом для цитогенетичного аналізу слугують препарати хромосом, отримані з культури лімфоцитів периферичної крові хворих *in vitro*. Спочатку у хворих дітей та підлітків проводять забір крові із ліктьової вени у кількості 1,0 мл, яку додавали в 5,0 мл поживного середовища RPMI 1640 з глютаміном (Sigma, USA), 0,5 мл ембріональної сироватки (Sigma, USA), 0,1 мл фітогемаглютиніну (ФГА) фірми Sigma USA. Лімфоцити культивували в термостаті при $t+37^{\circ}\text{C}$ протягом 72 годин. За 2 години до закінчення культивування проводять зупинку мітозів внесенням колхіцину в кінцевій концентрації 0,1 мкг/мл. У культуральну суміш додають 0,075 М розчину KCl, в якому інкубують клітини протягом 10 хвилин при $+37^{\circ}\text{C}$. Фіксацію клітин проводять сумішшю етанолу і крижаної оцтової кислоти (співвідношення 3:1) протягом 40 хвилин; потім проводять триразову відмивку препаратів у фіксуючій суміші. Суміш наносять на знежирені, мокрі, охолоджені скельця й висушують. Від кожного обстеженого з лімфоцитарних осадів готують препарати, які фарбують барвником Гімза протягом 10 хв. для проведення класичного цитогенетичного аналізу рівномірно забарвлених хромосом або диференційно (GTG- методом) забарвлених хромосом для диференціації певних цитогенетичних аберацій.

Отримані препарати метафазних хромосом шифрують і аналізують "сліпим методом" на бінокулярному мікроскопі Leica CME (Австрія), окуляр 10 × 18, об'єктив 100х, бінокулярна насадка 1,25х. Для кожного випадку аналізують від 100 до 300 метафазних пластинок, які містять 46 ± 2 хромосоми, враховуючи всі структурні аберації хроматидного (одиначні фрагменти, обміни) і хромосомного (парні фрагменти, кільцеві хромосоми, дицентричні хромосоми та ін.) типів.

Суть способу полягає в тому, що у хворих дітей та підлітків проводять забір крові із ліктьової вени у кількості 1,0 мл, потім додають у два культуральних флакони з поживним середовищем, ембріональною сироваткою та фітогемаглютиніном, і культивують у термостаті при $t+37^{\circ}\text{C}$ протягом 72 годин. На наступному етапі клітини крові гіпотенізують, потім проводять фіксацію препаратів розчином етилового спирту (960) та льодяної оцтової кислоти у концентрації 3:1. Суміш наносять на предметне скло і ідентифікацію хромосом проводять на гомогенно забарвлених барвником Гімза препаратах або за GTG-технікою.

При вивченні частоти і спектра хромосомних порушень у хворих аналізують 100 метафазних пластинок. Враховують всі структурні аберації хроматидного (одиначні фрагменти, делеції короткого та довгого плеча хромосом), хромосомного (парні фрагменти, розриви по центромері, кільцеві хромосоми, дицентричні хромосоми, хроматидні обміни) та геномного (передчасне розходження центромер, поліплоїдні клітини, ендоредуплікація) типів.

Для визначення прогностичної значущості рівня хромосомних порушень у хворих із тривожно-фобічними розладами, і віднесення їх до групи високого ризику застосовують методику послідовної процедури Вальда з визначенням інформативності ознак за допомогою критерію Кульбака. Допустимою помилкою при прогнозуванні високого рівня хромосомної нестабільності вважають 5,0 % поріг. Використовують таблицю порогових сум прогностичних коефіцієнтів, при якій прогностичний поріг досягається сумою балів ± 13 . Хромосомну нестабільність в лімфоцитах крові дітей та підлітків із тривожно-фобічними розладами визначають у випадках, коли рівень хромосомних порушень досягає 7,1 % і вище (ПК=+13,5; Інф.=8,0).

Таблиця

Частота хромосомних аберацій у хворих із тривожно-фобічними розладами

Рівень хромосомних аберацій, %	ПК	Інформативність	Загальна інформативність
0-3	- 10,7	3,9	8,0
3,1-5,0	+ 3,5	0,3	
5,1-7,0	+ 3,3	0,1	
7,1 та більше	+ 13,5	3,6	

Запропонований спосіб визначення осіб із тривожно-фобічними розладами, у котрих виявляється підвищений рівень хромосомних аберацій, дозволяє своєчасно провести профілактичні заходи і тим самим мінімізувати несприятливі наслідки в майбутньому.

Клінічний приклад № 1. Хвора дівчинка Дарина І., 12 років (історія хвороби № 780 від 28.02.2014 р.) звернулася до клінічного відділення психіатрії з приводу головного болю, страхів, фобій, депресивного стану.

Об'єктивно: на момент обстеження стан здоров'я дівчинки задовільний. Страху та фобії виникли з 10 років. Зі слів батьків - дівчинка має стрес вдома та в школі.

Із анамнезу життя: дівчинка народилася від першої вагітності із загрозою переривання у 16-17 тижнів на тлі анемії у матері, з кефалогематомою, з вагою 3300 г, довжиною тіла - 51 см. Закричала не відразу, проводилися реанімаційні заходи. До року психомоторний розвиток не відповідав віковим термінам, дівчинка відставала від своїх однолітків.

Перенесені захворювання: алергія, ЗЧМТ у 7 років, операції - пересадка шкіри на руці після опіку. Об'єктивно: на момент обстеження стан здоров'я дівчинки задовільний, вага - 36300 кг, зріст - 164 см. З 11 років у дівчинки з'явилися сильний головний біль, стомлюваність, нудота, непритомність.

За даними лабораторних досліджень: клінічний аналіз крові та сечі без особливостей. РЕГ: пульсове кровонаповнення достатнє. Венозний відтік порушений. КТ-ЕЕГ: дисфункція серединних неспецифічних і дієнцэфальних структур, гіпоксичного ґенезу, дифузні зміни органічного ґенезу. ЕКГ: дифузні зміни загальномоєкового характеру.

За даними генеалогічного аналізу: у матері дівчинки спостерігається депресивний розлад, психопатія; у рідної тітки з боку батька діагностовано психопатію. Спадковість щодо психічних хвороб - обтяжена.

Дані цитогенетичного обстеження: каріотип дівчинки - 46, XX; рівень хромосомних аберацій дорівнював 7,5 % (парні фрагменти - 1; одиночні ацентричні фрагменти - 13).

Клінічний діагноз: Змішаний тривожно-фобічний розлад. Гіперметропія високого ступеня, амбліопія лівого ока.

Клінічний приклад № 2. Хворий Денис А., 13 р. (історія хвороби № 1853 від 03.06.2013 р.) звернувся у клінічне відділення з приводу головних болю з підвищенням артеріального тиску, носових кровотеч, порушення уваги та поведінки, зниженого настрою, конфліктності, відсутності друзів.

Із анамнезу життя: хлопчик народився від другої вагітності на тлі Rh-конфлікту з вагою 3550 г, довжиною тіла - 55 см. Пологи через кесарів розтин, хлопчик народився із дистресс-синдромом. Перебував на грудному вигодуванні до 2 років 8 місяців. До року психомоторний розвиток не відповідав віковим термінам, хлопчик відставав від своїх однолітків. З 5-ти років у хлопчика з'явилися скарги на головний біль, неухабність.

Перенесені захворювання: краснуха. Об'єктивно: на момент обстеження хлопчика стан здоров'я задовільний, вага - 35,7 кг, зріст - 157 см.

Клінічні аналізи крові та сечі - у нормі; біохімічні показники - у нормі. ЕХО-ЕС: М-Ехо без порушень. РЕГ: У басейні а. vertebrobasilaris асиметрія пульсового кровонаповнення судин дрібного калібру (s>d). КТ-ЕЕГ: дисфункція проєкції лімбічних структур, функціональна нестабільність стовбурових структур, дієнцэфальних структур. ЕКГ: синусова брадиаритмія. Помірні ознаки порушення реполяризації.

За даними генеалогічного аналізу: спадковість щодо психічних хвороб - не обтяжена.

Дані цитогенетичного обстеження: каріотип дівчинки - 46, XY; рівень хромосомних аберацій дорівнював 7,0 % (парні фрагменти - 2; одиночні фрагменти - 4, обмін - 1).

Клінічний діагноз: Порушення форм поведінки і соціальної дезадаптації. Тривожно-депресивний розлад. Гіперметропія обох очей, амбліопія лівого ока.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення осіб високого ризику щодо хромосомної нестабільності в лімфоцитах крові дітей та підлітків із тривожно-фобічними розладами шляхом проведення генетичного дослідження, який **відрізняється** тим, що у хворих проводять цитогенетичне обстеження із застосуванням методів гомогенного та диференційного G-забарвлення препаратів хромосом, і при виявленні $\geq 7,1\%$ хромосомних порушень на 100 клітин визначають хромосомну нестабільність.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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

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