



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75975** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 04716	(72) Винахідник(и): Багацька Наталія Василівна (UA), Нефідова Валентина Євгенівна (UA), Бугай Андрій Юрійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.04.2012	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", пр. 50-річчя ВЛКСМ, 52-а, м. Харків, 61153 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.12.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2012, Бюл.№ 24	

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ПРИЦЕНТРОМІРНИХ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВИХ ДІЛЯНОК ХРОМОСОМ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки прицентромерних гетерохроматинових ділянок хромосом шляхом мікроскопічного спостереження метафазних хромосом. Застосовуючи якісну бальну оцінку, оцінюють співвідношення розмірів С-гетерохроматинових ділянок хромосом за допомогою комп'ютерної програми у балах, які присвоюються хромосомі на основі співвідношення протяжності забарвленого району до довжини плеча хромосоми (для хромосоми 1 - до довжини плеча, в якому знаходиться гетерохроматинова ділянка, для хромосом 9 та 16 - до довжини короткого плеча) і довжини всієї хромосоми (у випадку інверсій).

UA 75975 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної генетики (цитогенетики), і може бути використана для якісної оцінки розмірів С-гетерохроматинових ділянок хромосом людини в нормі і при різній патології.

Конституційний гетерохроматин не має у своєму складі активних генів, але має велике значення для регуляції геному, процесів ділення клітин, правильного проходження мейотичних процесів, забезпечення стабільності і захисту активного генетичного матеріалу. Важливою рисою прицентромірного гетерохроматину є наявність поліморфізму С-гетерохроматину в популяціях.

Дослідження останніх років вказують на зв'язок між наявністю у пробанда певних варіантів С-гетерохроматину та збільшенням вірогідності таких патологічних станів, як аутистичні розлади, репродуктивні порушення у осіб чоловічої або жіночої статі та інші.

Найбільш доступним способом вивчення С-гетерохроматину хромосом є використання методів диференційного забарвлення метафазних хромосом людини, отриманих з клітин культури периферичної крові. Існує декілька методів диференційного забарвлення хромосом, котрі дозволяють вивчити поліморфізм прицентромірного гетерохроматину. Серед них значне поширення отримала методика С-забарвлення хромосом, яка заснована на лужній обробці $Ba(OH)_2$ препаратів хромосом та забарвленням препаратів за Романовським-Гімзою.

При дослідженні поліморфізму прицентромірних ділянок С-гетерохроматину хромосом на препаратах, отриманих шляхом С-забарвлення, визначаються такі параметри, як розмір С-сегмента, його положення на хромосомі, ступінь його забарвленості.

Для оцінки поліморфізму існує декілька способів визначення розміру забарвлених гетерохроматинових ділянок.

Відомий спосіб кількісної оцінки довжини С-гетерохроматинового сегмента (у мкм), що полягає у вимірюванні фактичного розміру С-сегмента хромосоми на фотографіях або малюнках з фотонегатива (аналог: «Предложения по стандартизации методов учета полиморфизма хромосом: Метод, рекомендации». - М., 1982. - 36 с.).

Але цей метод потребує додаткового обладнання (фотозбільшувач, мікроскоп для оцінки розмірів С-сегмента хромосом), і є вельми складним та довготривалим за часом.

Відомий спосіб оцінки розміру С-гетерохроматинових ділянок шляхом оцінки розміру досліджуваної ділянки С-сегмента хромосоми з подальшим зіставленням отриманих величин С-ділянок з довжинами досліджуваних хромосом та знаходженням відповідних відсоткових даних (аналог: Прокофьева-Бельговская А.А. «Система учета размеров гетерохроматиновых участков хромосом 1, 9, 16, Y и хромосом группы D и G» // «Полиморфизм хромосом у человека». - М., 1981. - С. 245-246).

Недоліком цього методу є попередній аналіз розмірів С-гетерохроматинових ділянок хромосом за методом вимірювання фактичного розміру С-сегмента хромосоми на фотографіях або малюнках з фотонегатива, що вказаний вище.

Найбільш близьким за технічною суттю до корисної моделі, що заявляється, є бальний спосіб оцінки поліморфізму гетерохроматинових ділянок, що був стандартизований та вперше задекларований на Паризькій цитогенетичній конференції (прототип: ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) // Cytogenetics and Cell Genetics-2005. - P. 114).

Бальний метод оцінки є найбільш простим та доступним і виправдовує себе в умовах необхідності аналізу великих досліджуваних груп людей за наявності обмежених людських та матеріальних ресурсів. Суть методу полягає у візуальному аналізі С-блоків гетерохроматину шляхом мікроскопічного спостереження відповідно зафарбованих метафазних пластинок та винесенні висновку щодо його розміру на основі зіставлення його розмірів з розмірами плеча хромосоми, відносно якого проводиться візуальна оцінка. На основі такого зіставлення виноситься бал від 1, що відповідає дуже малому відносному розміру С-блока, до 5, що відповідає дуже великому розміру блока.

Суттєвим недоліком цього методу є високий рівень суб'єктивності такого способу оцінки. Відносні величини, які отримані, залежать від кваліфікації дослідника і його вміння правильно оцінити розмір досліджуваної ділянки С-гетерохроматину, що призводить до високої похибки, особливо при середніх значеннях величин.

Задачею корисної моделі є створення такого методу оцінки С-сегментів хромосом шляхом мікроскопічного спостереження, який би зменшував похибку бального способу, зберігаючи при цьому його суттєві переваги.

Дана задача може бути вирішена за допомогою системи оцінки гетерохроматинових ділянок хромосом, а саме: відношення розмірів С-блока та хромосом, на яких вони розташовані.

Метод оцінки С-сегментів хромосом, що пропонується, оснований на системі якісної оцінки гетерохроматинових ділянок хромосом. Результатом визначення відносного розміру С-сегмента

певної хромосоми є бал, який присвоюється хромосомі на основі відношення протяжності забарвленої ділянки до довжини плеча хромосоми (зокрема для хромосоми 1 - до довжини плеча, в якому фактично знаходиться гетерохроматин, а для хромосом 9 та 16 - до довжини короткого плеча) і довжини всієї хромосоми (у випадку інверсій) згідно з пропозиціями щодо

5 стандартизації оцінки поліморфізму хромосом людини.

Зображення хромосом пацієнта отримують шляхом фотографування метафазних пластинок з хромосомами, забарвленими за С-методом, з використанням можливостей мікроскопа щодо збільшення. Методика цитогенетичного дослідження здійснюється за Р. Moorhead et al., 1960. Препарати хромосом людини отримують шляхом культивування лімфоцитів периферичної крові

10 людини з подальшою їхньою гіпотенізацією, фіксацією на предметному склі та забарвленням барвником Романовського-Гімзи після лужної обробки гідроксидом барію (A.T. Simmer et al., 1971).

Комп'ютерний розрахунок співвідношення розмірів хромосом та зафарбованих ділянок на них вимагає введення даних про ці розміри. Досягається це шляхом роботи з електронним зображенням хромосом, а саме відміткою дослідника за допомогою маніпулятора "миші" безпосередньо на цьому зображенні точок, що відповідають кінцям хромосоми, центромірі, межах зафарбованої ділянки, повторенням за необхідності викривленої форми хромосоми. Таким способом у пам'ять комп'ютера вводиться лінійна схема хромосоми, що дає йому змогу вирахувати умовну (у пікселях) довжину хромосоми, плеча та гетерохроматинової ділянки.

20 Отримані умовні цифрові дані використовуються для автоматичного розрахунку відношень, необхідних для виводу бала, а саме:

розмір ГХ-сегмента / розмір плеча,
розмір ГХ-сегмента / розмір хромосоми.

25 Ці відношення автоматично підставляються у систему балів і на основі цієї системи робиться висновок про бал даної хромосоми. Ці дані надалі зберігаються у електронній базі даних.

Пропонується використовувати різні варіанти проведення розрахунків для хромосом 1, 9, 16, а також у випадку перичентричної інверсії, які закладені у програмі у вигляді різних алгоритмів оцінювання.

30 В стандартному випадку (рекомендовано для хромосоми 1) бал хромосоми вноситься на основі відношення розміру ГХ-сегмента до довжини плеча, у якому він знаходиться, ввівши його у таку систему балів:

0,00-0,10 - «1 бал»;
0,11-0,25 - «2 бали»;
35 0,26-0,33 - «3 бали»;
0,34-0,50 - «4 бали»;
0,51-1,00 - «5 балів».

Для хромосом 9, 16 рекомендовано проводити оцінку за відношенням забарвленої ділянки до короткого плеча хромосоми, яке визначається програмою у разі відповідної відмітки користувача. Відношення вводиться автоматично при цьому до такої системи:

40 0,00-0,25 - «1 бал»;
0,26-0,33 - «2 бали»;
0,34-0,50 - «3 бали»;
0,51-1,00 - «4 бали»;
45 більше 1,00 - «5 балів».

У випадку інверсії ГХ-сегмента розрахунок проводиться з огляду на відношення розміру С-блока до довжини хромосоми за допомогою такої системи балів:

50 0,00-0,05 - «1 бал»;
0,06-0,12 - «2 бали»;
0,13-0,20 - «3 бали»;
0,21-0,25 - «4 бали»;
більше 0,25 - «5 балів».

До бази даних автоматично заносяться умовні розміри гетерохроматинових блоків, пліч хромосом, самих хромосом, співвідношення розмірів С-сегментів до довжини плеча та хромосоми, бал, а також дані про інверсії та спосіб оцінки (мається на увазі - по довгому чи короткому плечу проводилась оцінка).

Запропонований метод дозволяє проводити бальну оцінку гетерохроматинового сегмента на основі конкретних співвідношень розмірів, які є правдивими, незважаючи на відсутність фактичного виміру довжин С-ділянок і хромосом. Оцінка, отримана за допомогою комп'ютерної

програми, нівелює можливу суб'єктивність візуальної оцінки і переводить дані дослідження у цифрову систему, яка надалі надає різні можливості використання отриманих результатів.

Спосіб, що пропонується, дає можливість максимально стандартизувати дослідження поліморфізму С-гетерохроматинових ділянок у різних медико-генетичних лабораторіях спеціалістами різного рівня.

Приклад. Хвора Ірина К., 13 років (історія хвороби № 3109), була госпіталізована до клініки інституту зі скаргами на артралгії в колінних суглобах незалежно від навантаження.

Анамнез життя: дівчинка народилась від першої вагітності, яка перебігала із загрозою переривання та гестозом 2 половини вагітності, перших фізіологічних пологів. Маса тіла при народженні - 2700 г, довжина тіла - 49 см. До року психомоторний розвиток дівчинки відповідав віковим нормам. Артралгії в колінних суглобах спостерігалися протягом останнього року.

Перенесені захворювання: часті ОРЗ, вітряна віспа. Операцій не було, травма - в 2006 році: розтягання зв'язок правого гомілковостопного суглоба.

Об'єктивно: на момент обстеження дівчинки загальний стан здоров'я задовільний. Дівчинка астеничної статури. Шкіра, слизові оболонки чисті, звичайного кольору. В легенях везикулярне дихання, тони серця ритмічні, приглушені, короткий систолічний шум. Живіт м'який, при пальпації безболісний. Печінка, селезінка не збільшені. Суглоби зовні не змінені. Рухливість - гіпермобільність багатьох суглобів.

За даними лабораторних досліджень: клінічний аналіз крові та сечі без особливостей. Гострофазові показники - СНБ – негативн., сіалові кислоти - 140 од., сіромукоїди - 0,124 од., глюкопротеїди - 0,315 од.

Дослідження на обмін сполучної тканини - кров: ГАГС загальні - 10 од., 1 фр. - 6,4 од., 2 фр. - 2,4 од., 3 фр. - 1,2 од., хондроїтинсульфати - 0,097 г/л, кальцій - 2,4 ммоль/л, фосфор - 1,5 ммоль/л, ЛФ - 4,2 од. Бод, КФ - 5,7 од. Бод, магній - 0,91 ммоль/л.; сеча: оксипролін - 177 мг/добу, уронові кислоти - 5,2 мг/добу., кальцій - 115 мг/добу, фосфор - 0,64 мг/добу.

Рентгенографія колінних суглобів: ущільнення суглобних поверхонь великогомілкових кісток, зовнішніх та внутрішніх поверхонь надколінників. подовжені міжмищелкові підвищення, медіальні - загострені.

УЗД колінних суглобів: явищ синовіїту немає. Синовіальна оболонка не змінена, суглобова щільність нерівномірно звужена, товщина хряща зменшена.

За даними клініко-генеалогічного аналізу - спадковість щодо захворювань суглобів обтяжена з материнської лінії у родички другого ступеня спорідненості (бабуся з боку матері).

При проведенні цитогенетичного аналізу було встановлено каріотип 46,XX, якій відповідав нормальному жіночому, та підвищений рівень хромосомних аберацій – 13 %.

Клінічний діагноз: вторинний остеоартроз колінних суглобів, системна дисплазія сполучної тканини, дискінезія жовчовивідних шляхів.

Проведення оцінки розмірів С-гетерохроматинових сегментів у хворої на остеоартроз Ірини К. Для аналізу були завчасно приготовані препарати хромосом, забарвлені за С-методом. Дослідження гетерохроматинових блоків було здійснено серед повних метафазних пластинок, які були сфотографовані на цифрову фотокамеру Canon A560 через окуляр мікроскопа Leica SME з загальним збільшенням зображення у 1000 разів.

Фотографії метафазних пластинок стали об'єктом аналізу (див. фотографію).

Зображення були відкриті та проаналізовані в оригінальній програмі "C-segment". Дані щодо розмірів С-гетерохроматинових блоків занесені в таблицю-протокол дослідження в Microsoft Excel.

У ході оцінки С-блоків гетерохроматину дослідником визначалось положення хромосоми і гетерохроматинового блока на ній, а також вибирався алгоритм розрахунку в залежності від хромосоми. Програма здійснювала розрахунок співвідношень розмірів ГХ-блока і плечей хромосоми і виносила бальну оцінку згідно з загальноприйнятими нормативами.

Хромосома 1:

№ клітини	1 гомолог	2 гомолог
1	2	2
2	3	2
3	3	2
4	3	2
5	3	2

Хромосома 9:

№ клітини	1 гомолог	2 гомолог
1	3	3
2	3	3
3	2	3
4	3	2
5	3	2

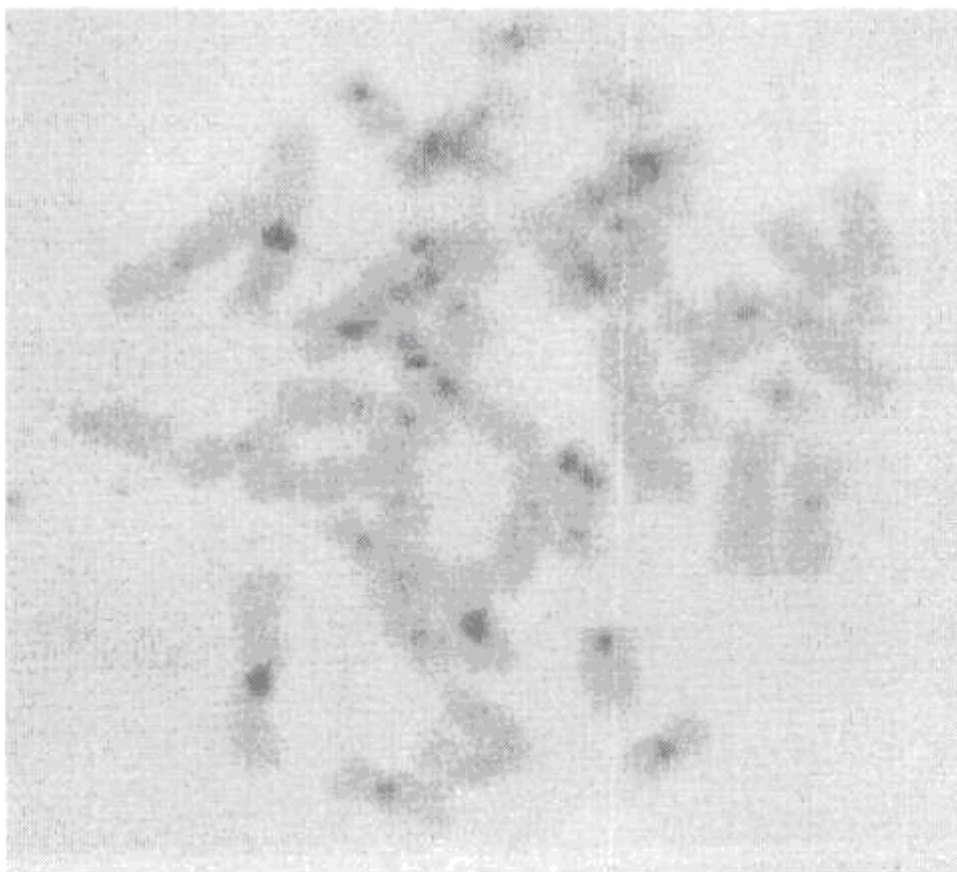
Хромосома 16:

№ клітини	1 гомолог	2 гомолог
1	1	2
2	2	2
3	2	2
4	3	3
5	2	2

- Таким чином, було оцінено загалом 10 метафазних пластинок для кожної хромосоми, в результаті визначено розміри гетерохроматинових блоків для хромосом 1, 9, 16 за п'ятибальною шкалою. Бали хромосом 1, 2, 3 дають змогу зробити висновок про малі розміри гетерохроматинового сегмента і генетичну нестабільність хворої.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб оцінки прицентромерних гетерохроматинових ділянок хромосом, що здійснюють шляхом мікроскопічного спостереження метафазних хромосом, який **відрізняється** тим, що на основі застосування якісної бальної оцінки оцінюють співвідношення розмірів С-гетерохроматинових ділянок хромосом за допомогою комп'ютерної програми у балах, які присвоюються хромосомі на основі співвідношення протяжності забарвленого району до довжини плеча хромосоми (для
- 15 хромосоми 1 - до довжини плеча, в якому знаходиться гетерохроматинова ділянка, для хромосом 9 та 16 - до довжини короткого плеча) і довжини всієї хромосоми (у випадку інверсій).



**Фотографія метафазних хромосом хворої Ірини К.,
забарвлених за С-методикою**

Комп'ютерна верстка Шеверун Д.М.

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