



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83863** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 5/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 09890	(72) Винахідник(и): Чапля Ольга Володимирівна (UA), Гонтар Юлія Вікторівна (UA), Білько Надія Михайлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 09.08.2013	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "КИЄВО- МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ", вул. Григорія Сковороди, 2, м. Київ, 04070 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2013	(74) Представник: Ломаковська Тетяна Романівна, реєстр. №272
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2013, Бюл.№ 18	

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ ХРОМОСОМ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб отримання препаратів хромосом лімфоцитів периферійної крові людини включає культивування гепаризованої венозної крові у культуральній суміші, яка містить фітогемаглютинін; синхронізацію культивованих лімфоцитів на межі G1/S фаз клітинного циклу із використанням комбінації метатрексату та тимідину; інкубацію клітинної суспензії з додаванням мітостатиків впродовж не більше 15 хв.; гіпотонічну обробку зразків та фіксацію культури; подальше висушування препаратів, обробку їх розчином трипсину і G-фарбування, та наступний аналіз фарбованих препаратів хромосом при збільшенні $\times 1000$, із використанням спеціального комп'ютерного забезпечення. Культивування здійснюють протягом не більше 42 годин за умови концентрації фітогемаглютиніну у культуральній суміші 3-4 %. Метотрексат додають до суспензії клітин крові не пізніше 24-ї години культивування, тимідин - через 16-18 годин після додавання метатрексату, мітостатики - не раніше ніж через 5 годин після додавання тимідину. Висушування препаратів здійснюють при температурі $t +60^{\circ}\text{C}$ протягом 30-60 хв. та подальше їх фарбування протягом не більше 3 хв. Одразу після цього проводять аналіз отриманих препаратів.

UA 83863 U

Корисна модель належить до галузі клітинної біології, біотехнології та медицини, а саме, до цитогенетичних способів дослідження з метою встановлення каріотипу (хромосомного набору) конкретного пацієнта, що передбачає виявлення можливих кількісних чи структурних порушень хромосом із наступним записом встановленого каріотипу відповідно уніфікованим правилам.

Корисна модель може бути використана у лабораторіях клінічної діагностики, у лабораторіях науково-дослідних установ та у гематологічних відділеннях, зокрема для культивування і приготування високоякісних препаратів прометафазних хромосом лейкоцитів периферійної крові людини у найкоротший термін.

Кількісні та структурні хромосомні аномалії можуть бути причиною порушення фізичного чи розумового розвитку, безпліддя, не виношування вагітності, виникнення злоякісних новоутворень та інших хвороб. Ефективним методом виявлення таких генетичних відхилень є хромосомний аналіз - один з основних методів сучасної клінічної цитогенетики.

Результат цитогенетичного дослідження є основою медико-генетичного консультування, адже виявлена хромосомна патологія може бути причиною аномалій розвитку чи порушення фертильності обстеженого пацієнта (пробанда). Саме тому важливо вчасно обстежувати пацієнтів з підозрами на хромосомну патологію із застосуванням ефективних та інформативних методів дослідження.

Проведення цитогенетичного аналізу можливе лише за умови отримання в досліджуваному біологічному матеріалі популяції клітин, що поділяються. Це пояснюється тим, що саме на стадії метафази клітинного поділу (мітозу) генетичний матеріал клітини набуває конденсованого вигляду із формуванням власне придатних для аналізу хромосом. За умови відсутності у первинному біологічному матеріалі клітин з високою мітотичною активністю, отримані зразки культивують у поживних середовищах з додаванням (за потреби) стимуляторів клітинного поділу.

Найбільш простим та водночас ефективним методом отримання хромосомних препаратів для постнатальної діагностики є культивування лімфоцитів периферійної крові. На сьогоднішній день основними напрямками удосконалення даного методу постнатальної цитогенетики є:

- а) отримання більшої кількості придатних для аналізу метафаз у досліджуваних зразках;
- б) підвищення якості препаратів хромосом (здебільшого за рахунок накопичення довших та більш інформативних прометафазних хромосом у зразку);
- в) скорочення термінів підготовки придатних для аналізу хромосомних препаратів.

Загальноприйнята методика культивування лімфоцитів периферійної крові (відома із таких джерел, як Методичні рекомендації МОЗ "Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини", 2003; Barch, 1997; Hangerfold, 1965) передбачає витримування периферійної крові пацієнта протягом трьох діб у поживному середовищі з додаванням фітогемаглютиніну, що стимулює присутні у зразку лімфоцити до поділу. Через 69-72 години до культури додається розчин колcemіду (колхіцину), який блокує клітинний поділ на стадії метафази, для отримання придатних для аналізу хромосом. Надалі клітини обробляють гіпотонічним розчином, що спричиняє руйнацію клітинних оболонок із відособленням хромосомного набору клітин, що знаходяться у цільовій стадії мітозу. Наступна обробка клітин фіксуючим розчином дозволяє відокремити хромосоми від залишків цитоплазми клітини і отримати придатні для диференційного фарбування та наступного аналізу препарати хромосом у результаті нанесення очищеного осаду на предметне скло. Після висушування препаратів при кімнатній температурі не менше ніж 24 год. їх обробляють розчином трипсину та фарбують розчином барвника Гімза. Аналіз фарбованих препаратів хромосом здійснюється при збільшенні $\times 1000$ із використанням, за потреби, спеціального комп'ютерного забезпечення.

Хоча зазначений метод і є найбільш уживаним для приготування препаратів для постнатального цитогенетичного дослідження, але він дозволяє провести якісний аналіз метафазних пластинок лише через тиждень після отримання біологічного матеріалу.

Крім того, стандартний метод цитогенетичного дослідження передбачає отримання препаратів хромосом лімфоцитів крові у яких абсолютна більшість пластинок є метафазними (коротшими, які мають нижчу роздільну здатність), а відтак каріотип можна встановити лише на рівні 200-400 сегментів на гаплоїдний набір. Оскільки, застосування цього методу не дозволяє провести дослідження на вищих рівнях організації хромосом (на прометафазних зразках), він є низько чутливим.

Водночас, дослідження прометафазних хромосом на рівні 550-800 сегментів на гаплоїдний набір дозволяло б виявляти приховані хромосомні перебудови незначного розміру та уточнювати точки розриву хромосомних перебудов.

Відома модифікована методика отримання саме прометафазних препаратів лімфоцитів крові (Yunis J.J., 1976), що також передбачає культивування гепаризованої венозної крові

пацієнта протягом трьох діб у поживному середовищі з додаванням фітогемаглютиніну з концентрацією 1-2 %. Через 69-72 години, згідно з зазначеним методом, здійснюють інкубацію клітин у розчині мітостатиків впродовж 15 хв., після чого клітини обробляють гіпотонічним розчином і фіксують. Отримані препарати висушують при $t +37^{\circ}\text{C}$ чи при кімнатній температурі протягом щонайменше 24 год., обробляють їх розчином трипсину та фарбують розчином барвника Гімза протягом 5-20 хв. Відповідно, аналіз препаратів можна провести не раніше, ніж через тиждень з моменту забору венозної крові пацієнта.

На відміну від вищезгаданого стандартного методу отримання метафазних препаратів лімфоцитів крові, модифікована методика отримання саме прометафазних препаратів передбачає синхронізацію культивованих лімфоцитів на межі G1/S фаз клітинного циклу із використанням комбінації інгібітору (метотрексату) та нуклеотиду тимідину. При цьому метотрексат додають до суспензії клітин крові на 48-й годині культивування, а тимідин вносять до культури через 16-18 год. після додавання метотрексату. Після цього зразки залишають при $t +37^{\circ}\text{C}$ ще протягом 5 год.

Додавання до культури метотрексату як інгібітору процесу утворення тимідину, необхідного для синтезу ДНК, блокує клітини у S-фазі клітинного поділу. Введення до культури розчину тимідину нівелює дію метотрексату і всі раніше заблоковані клітини одночасно переходять до мітозу. Застосування комбінації метотрексату та тимідину дозволяє накопичити у культурі достатню кількість клітин, що знаходяться на однаковому етапі клітинного циклу - на стадії ранньої метафази, коли хромосоми менш конденсовані, а відтак і більш інформативні. Завдяки цьому, такий метод дозволяє отримати препарати прометафазних хромосом високої роздільної здатності і, відповідно, провести дослідження каріотипу на вищих рівнях організації хромосом - 550-850 сегментів на гаплоїдний набір.

Але даний метод (прийнятий заявником за найближчий аналог - прототип) не позбавлений недоліку стандартного методу отримання метафазних препаратів лімфоцитів крові, оскільки час, що проходить з моменту отримання крові пацієнта і до моменту аналізу отриманих препаратів хромосом, складає в середньому тиждень.

А втім, як зазначалося вище, саме скорочення термінів підготовки придатних для аналізу хромосомних препаратів є на сьогоднішній день одним з основними напрямків удосконалення методів сучасної клінічної цитогенетики.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлена задача вдосконалення загальноприйнятої методики приготування препаратів хромосом лейкоцитів периферійної крові людини, за рахунок отримання у найкоротший термін якісних хромосомних препаратів, що містять достатню для досліджень кількість клітин у цільовій фазі мітозу (прометафазі).

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання препаратів хромосом лімфоцитів периферійної крові людини, що включає культивування гепаризованої венозної крові у культуральній суміші, яка містить фітогемаглютинін; синхронізацію культивованих лімфоцитів на межі G1/S фаз клітинного циклу із використанням комбінації метотрексату та тимідину, який додають до суспензії через 16-18 годин після додавання метотрексату; інкубацію клітинної суспензії з додаванням мітостатиків впродовж не більше 15 хвилин; гіпотонічну обробку зразків та фіксацію культури; подальше висушування препаратів, обробку їх розчином трипсину і G-фарбування, та наступний аналіз фарбованих препаратів хромосом за збільшення $\times 1000$, із використанням спеціального комп'ютерного забезпечення, згідно з корисною моделлю, що заявляється, культивування гепаризованої венозної крові здійснюють протягом не більше 42 годин за умови концентрації фітогемаглютиніну у культуральній суміші 3-4 %.

При цьому метотрексат додають до суспензії клітин крові не пізніше 24-ї години культивування, мітостатики додають не раніше ніж через 5 годин після додавання тимідину.

Висушування препаратів здійснюють при $t +60^{\circ}\text{C}$ протягом 30-60 хвилин, а подальше їх фарбування - протягом не більше трьох хвилин, одразу після чого проводять аналіз отриманих препаратів.

Як мітостатики використовують колцемід або колхіцин.

У заявленому способі синхронізація культивованих лімфоцитів на межі G1/S фаз клітинного циклу із використанням комбінації інгібітору (метотрексату) та нуклеотиду тимідину, як і у способі-прототипі, дозволяє отримати хромосомні препарати високої роздільної здатності.

Введення метотрексату на 24-й годині культивування спричиняє блокування усіх готових до поділу клітин першої хвили мітозів, а наступне додавання розчину тимідину активує призупинені процеси поділу із накопиченням в культурі клітин на різних стадіях мітозу. В результаті навіть за умови скорочення терміну культивування (до 42-х год.), у зразку, на момент початку фіксації, знаходиться достатня кількість якісних прометафаз, придатних для аналізу, чому, за рахунок

активування більшої кількості клітин до поділу, додатково сприяє підвищення концентрації фітогемаглютиніну у культуральній суміші до 3-4 %.

Підвищення температури висушування препаратів (до +60 °C) на стадії їх підготовки до диференційного фарбування сприяє можливості значного скорочення терміну (не більше, ніж одна година) цієї стадії заявленого способу, без втрати якості препаратів при їх наступній обробці трипсином, а відповідно і якості їх аналізу. Відтак, зазначене експрес-висушування отриманих препаратів за високих температур дозволяє невдовзі (через 30-60 хв.) після підготовки препаратів розпочати їх фарбування.

Отож, запропонована корисна модель є вдосконаленою методикою приготування у найкоротший строк (протягом трьох діб після отримання біологічного матеріалу) препаратів хромосом лейкоцитів периферійної крові, що містять клітини у цільовій фазі мітозу (прометафази), які, завдяки своїй вищій роздільній здатності, дають можливість досліджувати каріотип на рівні 550-850 сегментів на гаплоїдний набір. Застосування запропонованої методики отримання цитогенетичних препаратів клітин крові забезпечить подальше оперативне проведення високочутливого аналізу хромосомного набору пацієнта.

Тобто, заявлена сукупність відмітних ознак необхідна і достатня для досягнення мети створення запропонованої корисної моделі.

Для дослідження використовувалось 10 зразків гепаризованої венозної крові, отриманих пункцією ліктьової вени у пацієнтів (5 жінок та 5 чоловіків) з первинним непліддям, що планували розпочати лікування методами допоміжних репродуктивних технологій.

Для подальшого культивування зразки вносились до комерційної культуральної суміші Pb-max (Gibco), що містить базове поживне середовище, телячу сироватку та фітогемаглютинін (ФГА). При цьому, доводили концентрацію ФГА у культуральній суміші до 3,85 %. Ця концентрація, за даними Tyce R.R. (Tice R.R., Schneider E.L., Kram D., Thome P. Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin // J Exp Med. - 1979. - Vol. 149(5). - P. 1029-410), є оптимальною для культивування лімфоцитів периферійної крові і дозволяє отримати найбільшу кількість метафаз у досліджуваному зразку. Окрім того, підвищення концентрації стимулятора клітинного поділу з 1-2 % до 3,85 % сприятиме першопочатковій диференціації більшої кількості лімфоцитів, а отже збільшить кількість клітин у першій хвилі мітозів.

Культивування зразків крові проводили за $t + 37^{\circ}\text{C}$ впродовж 42-х годин. При цьому на 24-й годині культивування до суспензії клітин крові додавали 50 мкл 10^{-5} М метотрексату. Через 16-18 годин після додавання метотрексату (40-42 год. культивування) до культури вносили 50 мкл 10^{-3} М тимідину, після чого зразки залишали при $t + 37^{\circ}\text{C}$ ще протягом 5 год.

Додаючи метотрексат на 24-й годині культивування, здійснюють синхронізацію тільки першої хвилі мітозів. Його додавання через 48 годин (у відповідності із прототипом), синхронізує мітози 1, 2 і 3-ї хвилі. Їх кількісно більше, але якісно препарати, отримані згідно з заявленим способом, не відрізняються, тоді як отримують їх набагато швидше.

Як зазначалося вище, синхронізація культури передбачає блокування культивованих клітин на межі двох фаз клітинного циклу (G1/S). При цьому додавання блокатору синтезу ДНК (метотрексату) зупиняє процес подвоєння генетичного матеріалу клітини (S-фаза клітинного поділу), а наступне введення тимідину ліквідує негативний вплив метотрексату, активує подвоєння генетичного матеріалу (перехід до S-фази мітозу). Сенс процесу синхронізації клітин полягає у можливості накопичення великої кількості клітин у певній фазі клітинного циклу із наступним синхронним протіканням їх поділу, а отже дозволяє збільшити частку клітин, що на момент додавання мітостатиків перебуватимуть на стадії прометафази клітинного поділу.

До того ж, як відомо (Scott, Lyons Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes radiation-induced chromosome damage. - Nature, Vol. 278. - P. 756-760), на 48-й годині культивування приблизно 53 % активованих клітин можуть бути вже у другому мітозі, тобто перший мітоз пройшов у них ще раніше, що також підтверджується висновками, представленими на графіках (Tice R.R., Schneider E.L., Kram D., Thome P. Cy to kinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin // J Exp Med. - 1979. - Vol. 149(5). - P. 1029-410), у відповідності з якими на 42-й годині культивування близько 10-12 % лімфоцитів готові до поділу.

Тому призупинення процесів поділу на 42-й годині культивування, згідно із заявленим способом, є цілком виправданим і дозволяє отримати достатню для досліджень кількість клітин у цільовій фазі мітозу (прометафази) одночасно, що і доведено нижчезазначеними отриманими результатами культивування, згідно з заявленим способом.

Відтак, вже на 45-47-й годині культивування до суспензії клітин додавали мітостатики (колцемід чи колхіцин) у кінцевій концентрації 10 мкг/мл зразка. Інкубація у розчині мітостатиків

тривала від 15 до 30 хв. Така тривалість інкубації є оптимальною для зупинки клітин на різних етапах стадії метафази (короткі хромосоми) та попередження формування ниток веретена поділу для прометафазних хромосом, які і є цільовими у заявленому способі. При інкубації більш тривалий час (півгодини та більше) певна частина прометафазних хромосом встигне конденсуватися до метафазних (тобто скоротиться), що значно погіршить можливості їх дослідження.

Гіпотонічну обробку та фіксацію культури метанол-оцтовим фіксатором проводили за стандартною методикою (Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: [метод, рекомендації]. - К, 2003. - 23 с.) з інтервалами між змінами фіксатора, які проводили тричі, у 30 хвилин.

На кінцевому етапі суспензію краплями наносили на охолоджені вологі предметні скельця "Superfrost" (по 3-4 краплі суміші на одне скельце) в теплом приміщенні. Після цього препарати висушували в термостаті за $t +60^{\circ}\text{C}$ протягом 30-60 хвилин.

Такі умови, за експериментальними даними, є необхідними і достатніми для висушування отриманих довгих (прометафазних) хромосом. Прометафазні хромосоми, до того ж, є чутливішими до дії трипсину, яким обробляють препарати на стадії фарбування, а відтак повинні бути краще просушені, а ніж метафазні зразки.

Надалі препарати обробляли 0,12 % розчином трипсину, промивали у 0,9 % NaCl та поміщали у 2 % барвник Giemsa. Фарбували не більше трьох хвилин.

Використання розведеного трипсину для фарбування препаратів дозволило уникнути пошкодження чутливих до дії ферменту прометафазних хромосом.

Мікроскопіювання проводили відразу після фарбування скелець при збільшенні $\times 1000$ з використанням мікроскопа Nikon E200 (Nikon) та комп'ютерної програми "Ikaros" (Metasystems, Німеччина).

Отримані результати показали, що при застосуванні прискореного культивування (42 години), кількість метафаз на препаратах була дещо нижчою порівняно з 72-годинною культурою, отриманою за відомими методиками.

Однак частка прометафазних пластинок, що містили 550-850 сегментів на гаплоїдний набір, становила в середньому $24,2 \pm \%$ (розподіл у межах $21,5 \%$ - $27,0 \%$). Тобто, навіть за умови скорочення терміну культивування, у зразку на момент початку фіксації знаходиться достатня кількість прометафаз, придатних для аналізу, що дає змогу не менш якісно встановити каріотип пацієнта. Тоді як у культурах лімфоцитів, отриманих за стандартними методиками, даний показник знаходився на рівні $8,3 \pm 2,5 \%$.

Таким чином, застосування заявленого прискореного способу отримання препаратів прометафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові дозволяє встановити каріотип пацієнта на рівні 550-850 сегментів на гаплоїдний набір протягом 50-52 годин з моменту забору його венозної крові. Тоді як у відповідності із методом-прототипом отримання аналогічних препаратів прометафазних хромосом можливе не раніше, а ніж тиждень з моменту забору венозної крові пацієнта.

Застосування заявленого способу щодо значного скорочення термінів підготовки препаратів хромосом дозволить швидше встановити каріотип новонароджених із вадами розвитку, пацієнтів із репродуктивними проблемами та батьків, що звертаються до медико-генетичних центрів для проведення пренатальної діагностики хромосомних аномалій плода.

Отримання цитогенетичного висновку у коротші строки дозволить скоректувати схему запланованого обстеження та лікування пробандів, призначити додаткові лікувальні чи діагностичні процедури (як-от, преімплантаційний генетичний скринінг ембріонів, отриманих при заплідненні in vitro).

За необхідності проведення пренатальної цитогенетичної діагностики плоду, одночасно з отриманням каріотипу дитини можливо було б встановити й хромосомний набір її батьків. При цьому наявність каріотипу батьків виступала б запорукою додаткового контролю та суттєво б полегшила проведення медико-генетичного консультування у разі виявлення хромосомної аномалії плода.

Окрім того, заявлений метод дозволить встановлювати каріотип пацієнтів, що планують проведення преімплантаційної генетичної діагностики у межах циклу запліднення in vitro навіть за умови забору крові для дослідження у день пункції фолікулів. В такому разі результат цитогенетичного дослідження батьків можна було б отримати ще до моменту вилучення матеріалу ембріона для преімплантаційного генетичного тестування і за умови виявлення хромосомної аномалії у одного з батьків, змінити скринінговий протокол преімплантаційного генетичного дослідження на таргетну діагностику виявленої у батьків перебудови.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб отримання препаратів хромосом лімфоцитів периферійної крові людини, що включає культивування гепаризованої венозної крові у культуральній суміші, яка містить
5 фітогемаглютинін; синхронізацію культивованих лімфоцитів на межі G1/S фаз клітинного циклу із використанням комбінації метатрексату та тимідину, який додають до суспензії через 16-18 годин після додавання метатрексату; інкубацію клітинної суспензії з додаванням мітостатиків впродовж не більше 15 хвилин; гіпотонічну обробку зразків та фіксацію культури; подальше висушування препаратів, обробку їх розчином трипсину і G-фарбування, та наступний аналіз
10 фарбованих препаратів хромосом при збільшенні $\times 1000$, із використанням спеціального комп'ютерного забезпечення, який **відрізняється** тим, що культивування гепаризованої венозної крові здійснюють протягом не більше 42 годин за умови концентрації фітогемаглютиніну у культуральній суміші 3-4 %, при цьому метотрексат додають до суспензії клітин крові не пізніше 24-ї години культивування, мітостатики додають не раніше ніж через 5
15 годин після додавання тимідину, а висушування препаратів здійснюють при температурі $t +60^{\circ}\text{C}$ протягом 30-60 хвилин та подальше їх фарбування протягом не більше трьох хвилин, одразу після чого проводять аналіз отриманих препаратів.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як мітостатики використовують колцемід або колхіцин.

20

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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
