

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
6 марта 2008 г.
Регистрационный № 089-1006

**МЕТОД ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
СИНДРОМА АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ (ЛУИ-БАР)
И СИНДРОМА НИЖМЕГЕН**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.Д. Политыко, канд. мед. наук И.В. Наумчик,
О.М. Хурс, Т.М. Егорова

Минск 2008

Инструкция предназначена для специалистов НИИ, медицинских НПЦ, медико-генетических центров, занимающихся лабораторной диагностикой генетических заболеваний.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

- световой бинокулярный микроскоп лабораторного/профессионального класса с иммерсионным объективом $\times 100$, объективами $\times 20/40/60$
- стерильный бокс (ламинарный)
- инкубатор (обеспечение температуры культивируемого материала 37°C)
- центрифуга лабораторная (1000–3000 об./мин, 120 г)
- вортекс
- холодильник с морозильной камерой
- вытяжной шкаф
- водяная баня
- контейнер для транспортировки крови
- комплект автоматических микропипеток с наконечниками
- предметные стекла
- стерильная посуда для культуры клеток:
 - пробирки для культивирования объемом 15 мл или стеклянные флаконы объемом 20–30 мл
 - пипетки объемом 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл
 - эппендорф-пробирки объемом 1–2 мл для хранения реактивов
- раствор натриевой (литиевой) соли гепарина
- культуральная питательная среда (рекомендуются для использования: RPMI 1640, среда Игла (Eagle), MEM, среда 199, Ham's F10, др.)
- сыворотка крови (применяются эмбриональная телячья сыворотка, сыворотка крови крупного рогатого скота или лошади, сыворотка крови человека и др.)
 - антибиотики — стрептомицин, пенициллин, гентамицин
 - L-глутамин
 - митоген — фитогемагглютинин (ФГА), оптимальна форма М
 - блокатор митозов — колцемид или колхицин
 - соли KCl (хч или чда), NaCl (хч или чда), Na_2HPO_4 (хч или чда), KH_2PO_4 (хч или чда)
 - ледяная уксусная кислота
 - этанол или метанол (применяются спирты абсолютный или 96%) (использование метанола требует наличия специального разрешения на хранение и применение)
 - трипсин (активность 1800 BAEE ед/мг)
 - краситель Гимза
 - иммерсионное масло.

В дальнейшем приводятся наиболее часто используемые формы указанных реагентов, зарегистрированных или проходящих регистрацию на

территории Республики Беларусь и рекомендованных к применению Министерством здравоохранения.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Диагностика хромосомной нестабильности по приведенной схеме проводится пациентам:

- при клинически предполагаемом синдроме атаксии-телеангиэктазии (АТ) (ОМIM #208900),
- при клинически предполагаемом синдроме Нижмеген (СН) (ОМIM #251260),
- у sibсов пробанда с целью ранней пресимптоматической диагностики.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Нет.

ПРИНЦИПЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АТ И СН

Данные синдромы характеризуются повышением частоты спонтанных aberrаций хромосом (АХ), связанным с гиперчувствительностью хромосом к ионизирующей радиации, радиомиметикам, другим мутагенным факторам.

Главной цитогенетической характеристикой обоих заболеваний является наличие в соматических клетках больного сайт-специфических стабильных клоновых aberrаций хромосом. Являясь диагностическими цитогенетическими маркерами данных синдромов, эти хромосомные перестройки затрагивают строго определенные локусы p13 и q35 в хромосоме 7 и точки q11 q32 в хромосоме 14. С вовлечением данных сегментов происходит формирование и накопление в клетках больного реципрокных транслокаций, инверсий, делеций и др. Наиболее распространенными из них являются $inv(7)(p13q35)$, $inv(14)(q11q32)$, $t(7;7)(p13;q35)$, $t(14;14)(q11;q32)$, $t(7;14)(p13;q11)$, $t(7;14)(q35;q11)$, $t(7;14)(q35;q32)$.

Частота клеток с маркерными АХ может превышать 10% при АТ и достигать 25–30% у больных с СН. Впоследствии клетки, несущие такие маркерные АХ, формируют клоны, в которых включаются молекулярно-генетические процессы малигнизации.

Для больных с АТ и СН характерны также стабильные АХ, вовлекающие критические сегменты хромосом 7 и 14 в сочетании с другими хромосомами. Наблюдаются дицентрические хромосомы, возникающие в результате теломерных слияний.

Частота всех указанных АХ является диагностически значимой.

Для цитогенетической диагностики надо располагать значениями двух цитогенетических показателей:

- суммарная частота всех АХ в культуре первого митоза *in vitro*,
- частота маркерных сайт-специфических АХ с вовлечением хромосом 7 и 14.

Культивирование лимфоцитов периферической крови проводится по двум методическим схемам:

– 48 часов культивирования — для получения материала первого митоза и анализа частоты и спектра АХ, равномерно окрашенные хромосомы,

– 72 часа культивирования — для кариотипирования и анализа стабильных клоновых АХ, дифференциально окрашенные хромосомы GTG-методом (Гимза-трипсин-G-дифференциальная сегментация хромосом).

Приготовление растворов и реагентов

- Рабочий раствор гепарина 250 МЕ/мл в культуральной среде RPMI 1640 (для отечественного продукта, раствора гепарина 5000 МЕ/мл, необходимо разведение 1:20 соответственно). Флакон для взятия образцов крови должен содержать 0,1 мл раствора гепарина на каждый 1 мл взятой цельной крови.

Примечание. *Необходимо учитывать, что увеличение количества гепарина оказывает негативное влияние на дальнейшее культивирование и митотические деления клеток, поэтому превышение указанной концентрации недопустимо.*

- Раствор ФГА готовят в соответствии с указаниями фирмы-производителя, приготовленный раствор разливают на аликвоты по 1 мл и хранят при -20 °С.

- Рабочий раствор антибиотиков пенициллин-стрептомицин имеет следующую концентрацию: стрептомицин — 10000 мкг/мл, пенициллин — 10000 МЕ/мл. один мл рабочего раствора антибиотиков внести в 100 мл питательной культуральной среды.

- Конечная концентрация L-глутамин в культуральной смеси – 1% или 0,3 мг/мл. Форма выпуска в растворе — 200 мМ (М = 146). Приготовленный раствор разливают на аликвоты и хранят при -20 °С.

Примечание. *Раствор L-глутамин нестойк, хранится в замороженном состоянии до 1 года.*

- Рабочий раствор колцемида — 10 мкг/мл, рабочий раствор колхицина — 30 мкг/мл. Хранить при +4 °С в течение года. Более длительное хранение растворов возможно при -20 °С.

- Гипотонический раствор — 0,075 М KCl (5,6 г KCl растворить в 1000 мл дистиллированной воды).

- Фиксатор — смесь этанола (метанола) и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 соответственно.

Примечание. *Фиксатор нестойк при хранении. Необходимо использовать только свежеприготовленный и охлажденный в морозильной камере фиксатор.*

- Раствор трипсина: 0,25 г порошка трипсина растворить в 100 мл дистиллированной воды. Раствор разлить в пробирки по 10 мл и заморозить.

- Буфер для трипсина (рН 7,2–7,3): растворить в 1000 мл дистиллированной воды 8 г NaCl; 0,4 г KCl; 0,725 г Na₂HPO₄; 0,12 г KH₂PO₄;

проверить значение pH. Раствор хранится при комнатной температуре до 1 месяца.

- Буфер для краски (pH 6,8), необходимые растворы готовят заранее:

1. 0,07 М раствор KH_2PO_4 : растворить в 1000 мл дистиллированной воды 9,53 г KH_2PO_4 .

2. 0,07 М раствор Na_2HPO_4 : растворить в 1000 мл дистиллированной воды 9,94 г Na_2HPO_4 .

Для получения буфера растворы смешивают в соотношении 1:1 непосредственно перед употреблением, необходим контроль значения pH. Буфер не подлежит хранению.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Получение, хранение и транспортировка образцов крови

Периферическая венозная кровь (2–5 мл), взятая в стерильный шприц, переносится в стерильный флакон с раствором гепарина, смесь осторожно перемешивается.

Транспортировка образцов крови проводится в изолированном контейнере. При транспортировке следует избегать наклона и опрокидывания флаконов. При комнатной температуре (до 25 °С) образцы крови могут сохраняться не более суток, при температуре +4–+9 °С в изолированном контейнере — до нескольких дней.

Важно учитывать, что у пациентов с синдромами хромосомной нестабильности клетки лимфоцитов характеризуются сниженным ответом на действие ФГА, и культура, как правило, имеет низкий митотический индекс. Вследствие этого длительное хранение образцов крови не рекомендуется. Хранение и транспортировка образца гепаринизированной цельной крови при температуре ниже +4 °С не допускается.

Примечание. В случаях, когда объем взятой крови невелик (1–1,5 мл), при хранении и транспортировке есть опасность высыхания образца в посуде большого объема. Во избежание этого к имеющемуся объему необходимо добавить 0,5–1 мл стерильной культуральной питательной среды, отразить эту информацию в сопроводительных документах и в подписях на флаконе, а позже учитывать это разведение при постановке клеточной культуры.

Информация о биологическом материале, поступающем в лабораторию, должна заноситься в лабораторный регистр. Каждому образцу присваивается соответствующий номер, отражающий порядковый номер поступления и дату получения. Этот номер переносится на этикетки флаконов для культивирования образца и далее сохраняется на всех этапах обработки и анализа материала (постановка и обработка культуры лимфоцитов периферической крови, приготовление и анализ цитогенетических препаратов, хранение суспензий клеток). Маркировка культуральных флаконов и цитогенетических препаратов должна отражать время культивирования ткани (48- или 72-часовая культура), другие особенности культуры.

Процедура постановки культуры лимфоцитов (полумикрометод)

Подготовительные работы и постановка культуры клеток выполняются в стерильных условиях. Во флакон культуральной среды внести рабочий раствор L-глутамин в расчете 1 мл на 100 мл среды и подписать дату внесения.

Примечание. Срок сохранения активности L-глутамин в культуральной среде – 1 месяц, после чего этот компонент должен быть добавлен вновь.

Приготовление культуральной смеси

- 5,5 мл культуральной среды RPMI 1640 (следует контролировать последнюю дату внесения L-глутамин)
- 0,5 мл эмбриональной телячьей сыворотки
- 0,5 мл периферической крови
- ФГА (конечная концентрация рассчитывается для митогенов согласно указаниям фирмы-производителя)

Примечание. Превышение оптимальных концентраций ФГА вызывает токсический эффект и снижает митотический индекс культуры.

Клеточную культуру инкубируют при 37 °С в течение 48 или 72 ч.

Обработка культуры лимфоцитов периферической крови

1. За 45–60 мин до окончания культивирования во флакон нестерильно внести раствор блокатора митозов (колцеид — конечная концентрация 0,1 мкг/мл, колхицин — конечная концентрация 0,3 мкг/мл).

2. По окончании экспозиции колхицином/колцеидом добавить в пробирку 2 мл гипотонического раствора 0,075 М КСl (предварительно подогретого до 37 °С) и тщательно перемешать.

3. Центрифугировать смесь при 1,5 тыс. оборотов в течение 7–8 мин; осторожно удалить надосадочную жидкость, оставляя в пробирке 0,5–1 мл суспензии; тщательно ресуспендировать осадок с помощью вортекса.

4. В пробирку добавить 8 мл теплого гипотонического раствора, тщательно перемешать, поставить пробирку в термостат (37 °С) на 12–18 мин.

5. В пробирку внести 1 мл фиксатора, тщательно перемешать содержимое пробирки.

6. Центрифугировать смесь при 1,5 тыс. оборотов в течение 7–8 мин.; осторожно удалить надосадочную жидкость, оставляя 0,5–1 мл смеси; тщательно ресуспендировать осадок с помощью вортекса.

7. В пробирку добавить 10 мл фиксатора, тщательно перемешать, поместить пробирку в морозильник на 25–30 мин.

8. Центрифугировать смесь при 1,5 тыс. оборотов в течение 7–8 мин; осторожно удалить надосадочную жидкость, оставляя 0,5–1 мл смеси; тщательно ресуспендировать осадок с помощью вортекса.

9. Повторить шаги 6–8 не менее двух раз (всего не менее трех смен фиксатора) до получения бесцветной прозрачной надосадочной жидкости. На этой стадии суспензия клеток пригодна для приготовления цитогенетических препаратов или для длительного хранения.

10. Перед приготовлением препаратов из осадка, находившегося на хранении, необходимо сделать замену фиксатора, для чего повторить шаги 6, 7 и 8 (использовать 10 мл свежеприготовленного фиксатора).

11. Хранить зафиксированную клеточную суспензию следует в морозильной камере при температуре -20°C .

Окраска цитогенетических препаратов

Стандартное равномерное окрашивание хромосом

Стакан 1: 50 мл 4% раствора красителя Гимза в фосфатном буфере рН 6,8

Стакан 2: 50 мл фосфатного буфера рН 6,8

Стакан 3: 50 мл дистиллированной воды

Препараты погрузить в стакан 1 на 7–9 мин, промыть 2–3 с в стакане 2, затем промыть 2–3 с в стакане 3. Высушить препарат на воздухе в вертикальном положении.

GTG-метод

Стакан 1: рабочий раствор трипсина нагреть до 30°C (10 мл раствора трипсина смешать с 40 мл буфера для трипсина рН 7,2–7,3, поместить в водяную баню за 30 мин до использования)

Примечание. Данный объем раствора рассчитан на обработку не более 10 препаратов.

Стакан 2: фосфатный буфер для трипсина (рН 7,2–7,3) охладить в морозильнике до появления кристаллов льда

Стакан 3: 4%-й раствор красителя Гимза на буфере для краски рН 6,8

1. Вывести температуру в водяной бане до $+30$ – 33°C .

2. Препарат погрузить в стакан 1 на 6–13 с

Примечание. Время обработки раствором трипсина подбирается на пробном препарате и зависит от времени хранения препарата, вида клеточной культуры.

3. Препарат быстро перенести в стакан 2 и выдержать 10–20 с.

4. Погрузить препарат в стакан 3 на 6–8 мин.

5. Сполоснуть препарат дистиллированной водой и высушить на воздухе в вертикальном положении.

Цитогенетический анализ

Качество препаратов метафазных хромосом

Отбор метафазных пластинок для анализа должен осуществляться с учетом следующих требований:

- обособленность метафазных пластинок друг от друга
- цельность метафазной пластинки
- четкая окраска хромосом
- средняя степень конденсации хромосом
- достаточный разброс хромосом в пределах метафазной пластинки
- небольшое число (1–2) взаимных поперечных наложений хромосом.

Возможные сложности и их преодоление

• *Малое количество митозов.* Для больных анемией возможно снижение в культуре количества делящихся клеток, в связи с чем

целесообразна постановка большего количества образцов культуры лимфоцитов. В случае отсутствия роста культуры при проведении повторного культивирования рекомендуется использовать другой митоген.

- *Плохой разброс хромосом, остаточная цитоплазма в метафазах*

- недостаточная продолжительность гипотонической обработки
- допущены ошибки на первой стадии фиксации
- допущены ошибки при раскапывании суспензии клеток
- низкая влажность окружающей среды

- *Неполные метафазные пластинки*

- избыточная продолжительность гипотонической обработки
- слишком большая высота раскапывания суспензии
- высокая влажность окружающей среды

- *Неоптимальная конденсация хромосом в метафазах.* Степень конденсации хромосом зависит от времени воздействия колцемида/колхицина. Экспозиция может быть уменьшена для получения менее конденсированных хромосом. Однако сокращение времени инкубации с колцемидом/колхицином может привести к снижению количества митозов.

Требования к проведению цитогенетического анализа и оформлению результатов

1. Анализ частоты АХ в метафазах лимфоцитов выполняется в 100 клетках.

При цитогенетическом анализе равномерно окрашенных препаратов проводится учет ***следующих показателей*** (абсолютное число и %):

- частота клеток с АХ
- суммарная частота всех АХ
- частота маркерных клоновых АХ
- частота АХ хроматидного типа
- частота АХ хромосомного типа
- частота анеуплоидных, полиплоидных клеток.

2. Анализ стабильных сайт-специфических (клоновых) АХ, являющихся цитогенетическими маркерами АТ и СН, выполняется на препаратах, окрашенных GTG-методом. Необходимо анализировать 100 метафаз.

Примечание. При высокой частоте обнаружения маркерных АХ достаточен анализ 50 метафаз.

Классификация aberrаций хромосом

Спектр неспецифических АХ

АХ хроматидного типа

Хроматидная делеция (cht del, рис. 1). Одиночный фрагмент обычно лежит рядом с гомологичным участком неповрежденной хроматиды и смещен вдоль оси или под углом.

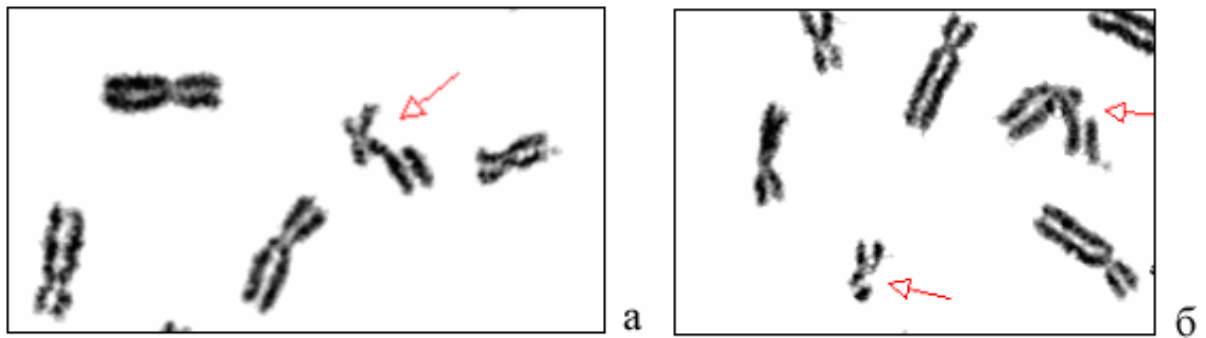


Рис. 1. Хроматидные делеции Cq (а) и А, Fq (б)

Внутрихромосомный внутривлецевой или межвлецевой обмен (e). Перестройка формируется при возникновении двух или нескольких разрывов в одной хроматиде в одном или обоих плечах хромосомы и их последующем аномальном воссоединении.

Межхромосомный хроматино-хроматидный обмен (e). Возникает в результате воссоединения разрывов хроматид нескольких хромосом. Конфигурация таких АХ может быть разнообразной в зависимости от количества вовлеченных в обмен хромосом. Как правило, в результате таких перестроек образуются характерные кресто- или звездообразные структуры.

АХ хромосомного типа

Хромосомная делеция (chr del, рис. 2а). Ацентрические образования, располагающиеся параллельно друг другу благодаря взаимодействию и гомологии сестринских хроматид и лежащие рядом с делетированной хромосомой. Размер парных фрагментов может варьировать от точечных (мин) до длинных структур.

Ацентрический свободный парный фрагмент (ас, рис. 2б). Свободно лежащие ацентрические образования, поврежденную хромосому идентифицировать не удается.

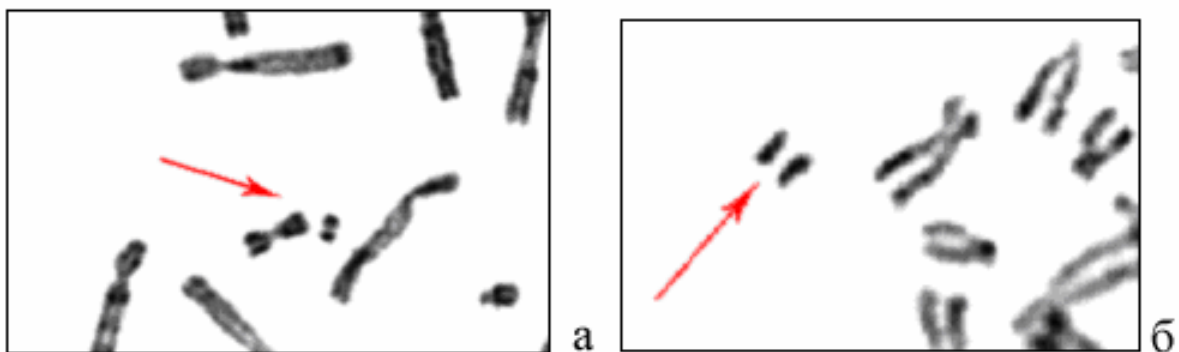


Рис. 2. Хромосомная делеция Eq (а), ацентрический свободный парный фрагмент (б)

Ацентрическое кольцо (ас r). Ацентрическая кольцевая структура, образующаяся из парного фрагмента, который возникает в результате интерстициальной делеции в пределах одного плеча хромосомы.

Инверсия (inv). Образуется при возникновении двух разрывов в одной хромосоме и повороте фрагмента на 180°. При наличии в инвертированном сегменте центromеры возникает *перичентрическая* инверсия, если разрывы произошли в одном плече — *парацентрическая* инверсия. При равномерном окрашивании хромосом могут быть распознаны лишь перичентрические инверсии, если структура хромосомы была значительно изменена.

Кольцевая хромосома (r, рис. 3а). Формируется в случае двух разрывов в обоих плечах хромосомы, центромерная часть образует кольцевую структуру, а дистальные участки — сопутствующий парный фрагмент.

Реципрокная транслокация (t). Образуется при возникновении разрывов в двух различных хромосомах и обмене дистальными ацентрическими участками. При равномерном окрашивании хромосом значительная часть транслокаций может оставаться нераспознанной.

Дицентрическая хромосома (dic, 3б). Образуется при возникновении разрывов в двух различных хромосомах и воссоединении двух центрических фрагментов. При этом, как правило, в метафазной пластинке присутствует парный фрагмент, возникший при слиянии ацентрических участков поврежденных хромосом.

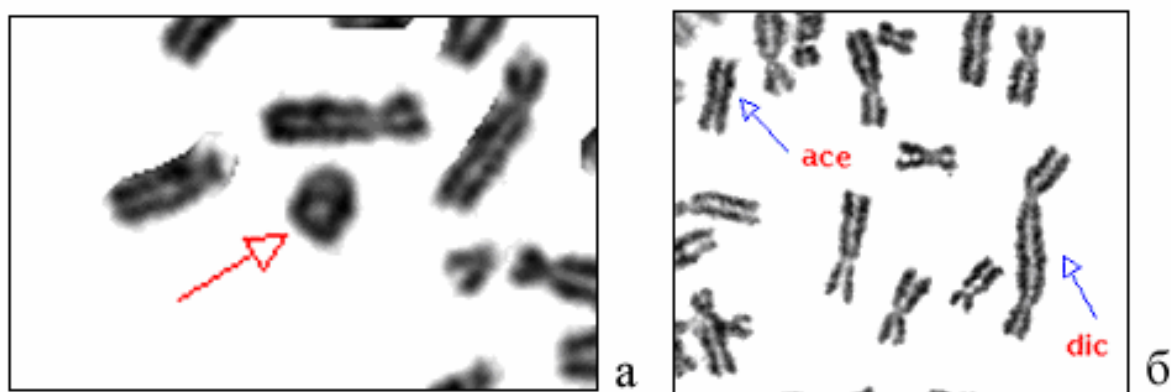


Рис. 3. Кольцевая хромосома (а); дицентрическая хромосома с ацентрическим фрагментом (б)

Диагностически значимые АХ

Помимо широкого спектра АХ, регистрируемых у пациентов с синдромами хромосомной нестабильности, главным диагностическим маркером АТ и СН являются сайт-специфические стабильные перестройки хромосом 7 и 14. На рис. 4–6 представлены варианты aberrаций хромосом, являющихся цитогенетическими маркерами синдромов АТ и СН, указаны соответствующие идеограммы, механизмы формирования аномалий и номенклатурные записи согласно ISCN, 2005.

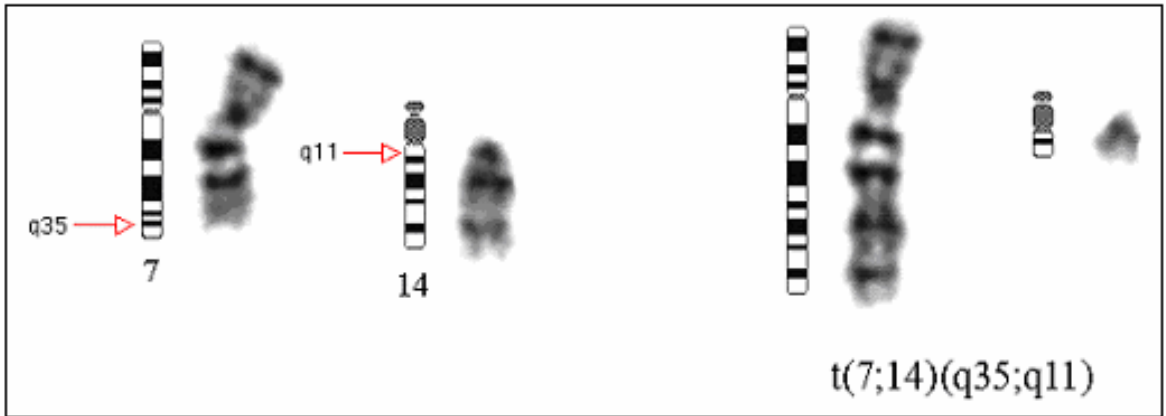
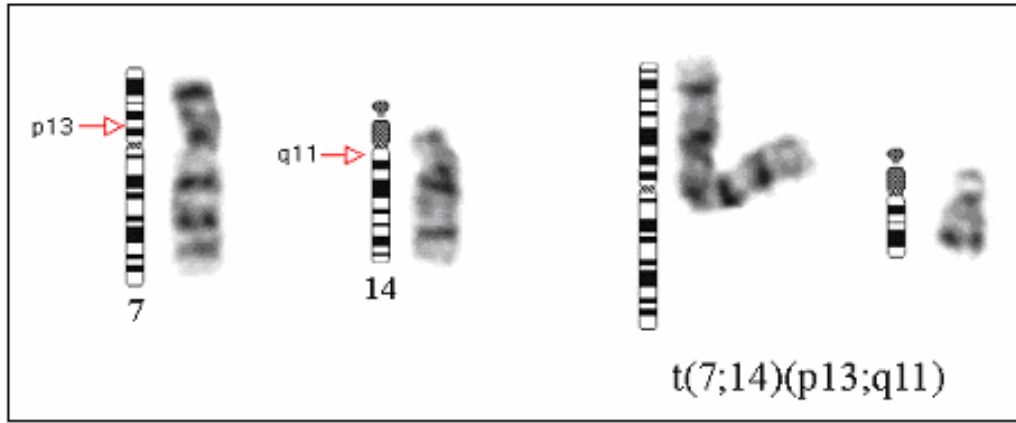


Рис. 4. Реципрокные транслокации с вовлечением специфических сегментов 7p13 и 7q35 хромосомы 7, а также 14q11 и 14q32 хромосомы 14

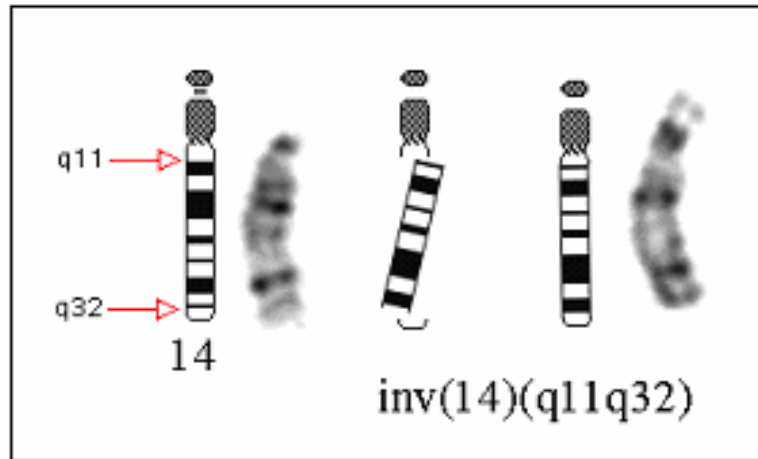


Рис. 5. Парацентрическая инверсия хромосомы 14 с точками разрывов в сегментах q11 и q32

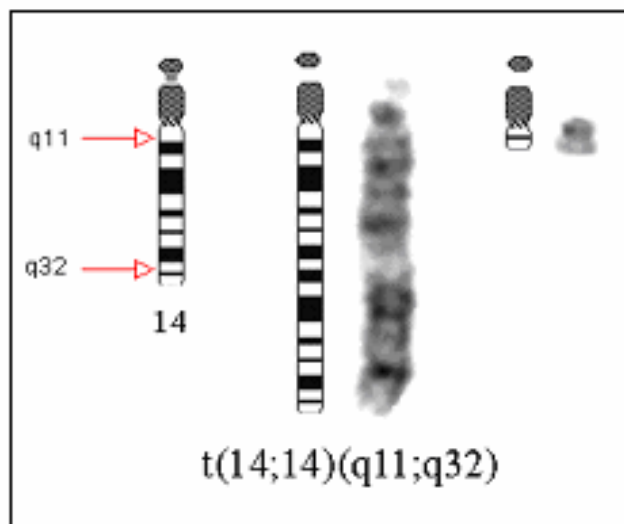


Рис. 6. Реципрокная транслокация с вовлечением обоих гомологичных хромосом 14 с точками разрывов в сегментах q32 и q11

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ неспецифической нестабильности хромосом

У пациентов с диагнозом АТ СН отмечается повышенная частота АХ. В отдельных метафазах может присутствовать несколько aberrаций, каждую из которых необходимо регистрировать независимо от остальных перестроек. Полученные результаты необходимо привести в сравнение с обобщенными данными частоты АХ у здоровых жителей Беларуси (табл. 1). Значения суммарной частоты АХ, равные или более 7–8%, следует рассматривать как повышенные.

Таблица 1

Показатели спонтанной фоновой частоты АХ у здорового населения Республики Беларусь

Число обследованных лиц	Средняя частота АХ	Интервал колебаний средних частот АХ в различных контингентах	Интервал колебаний индивидуальных частот АХ
500	3%	1,5–5,5%	0–9,5%

Данные цитогенетического анализа заносят в бланки-протоколы (приложение А). Каждый квадрат в протоколе соответствует одной проанализированной клетке, в нем отмечается число хромосом, координаты aberrантных метафаз, схематически зарисовываются АХ. Клетки без aberrаций обозначаются символом *N* (норма).

Анализ специфических АХ

Обнаружение маркерных сайт-специфических АХ в клетках больного (1 находка на 50 метафаз или 1–2 аберрации на 100 метафаз) позволяет подтвердить диагноз АТ или СН.

По завершении анализа следует оформить цитогенетическое заключение (приложение Б).

**Учреждение медико-генетической службы
Юридический адрес учреждения
Подразделение учреждения, выполнившее диагностику
Цитогенетическое заключение**

ФИО пациента _____ дата рождения _____

Адрес пациента _____

Диагноз _____

№ анализа по журналу учета _____

Кем направлен _____

Вид культуры клеток (биологический образец, время культивирования): _____

Вид окраски хромосом: _____

Кариотип (уровень разрешающей возможности анализа, сегментов/гаплоид)
_____ (ISCN, 2005)

Результаты анализа хромосомной нестабильности:

Номер цитогенетического препарата	
Количество проанализированных метафаз	
Суммарная частота АХ (абс/%)	
Частота специфических маркерных АХ (абс/%)	
Виды специфических маркерных АХ	
Примечания	

Заключение: _____

Анализ выполнил врач-лаборант (ФИО) _____

Дата _____ подпись _____