

УДК: 615.015.44:611.018.46:57.086

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-295-303>

Оригинальная статья | Original article



А.О. Вернер 
Т.М. Устинова 
Н.Г. Венгерович 

Оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов при проведении метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих *in vivo*

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, ул. Лесопарковая, д. 4, Санкт-Петербург, 195043, Российская Федерация

✉ Вернер Анна Олеговна; gniiivm_5@mil.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для определения мутагенности лекарственных средств используется метафазный анализ, точность теста напрямую зависит от качества приготовленных цитогенетических препаратов. Возможная артефактная потеря хромосом, приводящая к ошибкам при трактовке результатов, длительность и трудоемкость пробоподготовки обуславливают необходимость совершенствования существующих методик подготовки цитогенетических препаратов.

ЦЕЛЬ. Оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов клеток костного мозга млекопитающих *in vivo* для метафазного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Исследования выполнены на беспородных мышам-самцах массой 18–20 г. Пробоподготовку цитогенетических препаратов костного мозга выполняли по оригинальным и адаптированным методикам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. Миронова А.Н. (2012 г.) и ГОСТ 34659-2020 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих». Для приготовления препаратов использовали раствор Хенкса, растворы цитрата натрия и хлорида калия, уксусную кислоту, метиловый спирт, среду 199, буферный раствор HEPES и краситель Гимзы.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Проведен сравнительный экспериментальный анализ характеристик цитогенетических препаратов для проведения метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих *in vivo*, подготовленных по различным методикам. Выявлено, что препараты, полученные по методике «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств», характеризовались максимальной долей доступных для анализа пластинок по сравнению с препаратами, полученными другими способами пробоподготовки. Оптимизированы условия пробоподготовки, в том числе состав гипотонического раствора (0,56% раствора KCl), время гипотонической обработки (20 мин) и фиксации (12 ч), состав культуральной среды (среда 199 жидкая с солями Хенкса с глутамином), введена стадия префиксации хромосом 6%-ным раствором уксусной кислоты, что в целом способствовало увеличению доли доступных для анализа метафазных пластинок путем снижения разброса и слипания хромосом.

ВЫВОДЫ. Предложена методика приготовления цитогенетических препаратов, позволяющая увеличить долю доступных метафазных пластинок для анализа до 56%, долю хромосом с полным набором ($n=40$) на 12% и сократить время приготовления образцов на 2–10 ч по сравнению с использовавшимися ранее методиками.

Ключевые слова: метафазный анализ; хромосомы; метафазная пластинка; цитогенетические препараты; хромосомные aberrации; клетки костного мозга; методика подготовки проб; доклинические исследования; крысы; *in vivo*; пробоподготовка

Для цитирования: Вернер А.О., Устинова Т.М., Венгерович Н.Г. Оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов при проведении метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих *in vivo*. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):295–303. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-295-303>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Anna O. Verner 
Tatiana M. Ustinova 
Nikolai G. Vengerovich 

Optimisation of a Cytogenetic Sample Preparation Procedure for *In Vivo* Metaphase Analysis of Mammalian Bone Marrow Cells

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine,
4 Lesoparkovaya St., Saint Petersburg 195043, Russian Federation

✉ Anna O. Verner; gniivm_5@mil.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Metaphase analysis is used to assess the mutagenicity of medicines, and its accuracy depends directly on the quality of cytogenetic preparations. Existing procedures for cytogenetic sample preparation require optimisation because of their time and labour intensiveness and potential for artefactual chromosome loss that leads to errors in the interpretation of analytical results.

AIM. This study aimed to optimise a cytogenetic sample preparation procedure for mammalian bone marrow cells for *in vivo* metaphase analysis.

MATERIALS AND METHODS. The study was performed in randomly bred male mice weighing 18–20 g. The authors prepared cytogenetic samples of bone marrow cells according to the procedures set forth in the Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs (A.N. Mironov (ed.), 2012), and GOST 34659-2020, Methods for Testing the Impact of Chemical Products on the Human Body. Assessment of Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Cells of Mammals, as described and with modifications. Sample preparation involved using Hanks' solution, sodium citrate and potassium chloride solutions, acetic acid, methyl alcohol, medium 199, HEPES, and Giemsa stain.

RESULTS. The authors conducted an experimental comparison of the characteristics of cytogenetic preparations of mammalian bone marrow cells for *in vivo* metaphase analysis prepared using several methods. The samples prepared in accordance with the Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs exhibited the highest percentage of analysable metaphase plates, in comparison with those obtained using the other sample preparation procedures. The authors optimised the sample preparation conditions, including the composition of the hypotonic solution (0.56% KCl), the time of hypotonic treatment (20 min), the time of fixation (12 h), and the composition of the culture medium (liquid medium 199 with Hanks' salts and glutamine). The authors introduced a step of preliminary chromosome fixation with 6% acetic acid, which generally contributed to an increase in the proportion of analysable metaphase plates by reducing the scattering and sticking of chromosomes.

CONCLUSIONS. The authors presented a modified sample preparation procedure for cytogenetic preparations that, compared with the previous procedures, offers an increase in the percentage of analysable metaphase plates to 56%, a 12% rise in the percentage of full sets of chromosomes ($n=40$), and a 2–10-hour reduction in the preparation time.

Keywords: metaphase analysis; chromosomes; metaphase plate; cytogenetic preparations; chromosomal aberrations; bone marrow cells; sample preparation procedure; preclinical studies; rats; *in vivo*; sample preparation

For citation: Verner A.O., Ustinova T.M., Vengerovich N.G. Optimisation of a cytogenetic sample preparation procedure for *in vivo* metaphase analysis of mammalian bone marrow cells. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):295–303. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-295-303>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Метафазный анализ клеток костного мозга млекопитающих широко применяется в доклинических исследованиях безопасности фармакологических субстанций и лекарственных препаратов¹ [1]. Данный метод позволяет выявить аберрации всех типов (хроматидные и хромосомные), что, в свою очередь, позволяет оценить степень мутагенности исследуемого вещества, определить зависимость «доза – эффект»². Однако метафазный анализ имеет ряд недостатков: при его применении учитываются только структурные изменения хромосом, к исполнителям теста предъявляются высокие квалификационные требования, его автоматизация отсутствует. Сложности в проведении данного теста могут возникнуть уже на этапе приготовления цитогенетического препарата костного мозга, от качества которого зависит точность дальнейшего анализа. Важно, чтобы препарат содержал достаточное количество метафазных пластинок, хромосомы были равномерно распределены по стеклу и качественно окрашены.

В Российской Федерации утвержден ряд методических документов³, регламентирующих процедуру проведения теста. Существующие методики имеют различия в части рекомендаций по пробоподготовке препаратов, в том числе в них отсутствует детальное описание этапов приготовления препаратов, вместо чего представлены ссылки на публикации и методические рекомендации 1980–1990 гг.

Цель работы – оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов клеток костного мозга млекопитающих *in vivo* для метафазного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе было выполнено информационно-аналитическое сравнительное исследование методических руководств по приготовлению цитогенетических препаратов при проведении метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих *in vivo*, изложенных в монографии «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств»⁴ (далее – Руководство) и ГОСТ 34659-2020 «Методы испытания по воздействию химической продукции

на организм человека. Оценка хромосомных аберраций в клетках костного мозга млекопитающих» (далее – ГОСТ 34659-2020). Второй этап исследования был направлен на оптимизацию пробоподготовки клеток костного мозга для проведения метафазного анализа на основе утвержденных методик с применением новых реактивов и методов.

Биологические тест-системы. В качестве тест-систем использовали беспородных мышесамцов весом 18–20 г. Животные были получены из ФГБУН НЦБМТ ФМБА России филиал «Электрогорский». Транспортировка, содержание и работа с животными проводились согласно ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур». В исследовании было использовано 60 мышей, которых распределяли на 10 групп по 6 животных случайным образом. Мышей содержали в помещении с относительной влажностью воздуха 60±10% при 12-часовом световом дне с неограниченным доступом к еде и воде⁵. Для кормления животных использовался полнорационный корм ЛБК-120 для крыс и мышей (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод»).

Исследование было одобрено заседанием локальной биоэтической комиссии ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ, протокол заседания № 15 от 17.12.2021, и соответствует гуманистическим и этическим нормам.

Реактивы. В исследовании использовали следующие реактивы: колхицин (НПП «ПанЭко»), раствор Хенкса (НПП «ПанЭко»), питательная среда 199 жидкая с солями Хенкса с глутамином (НПП «ПанЭко»); хлорид калия (АО «Ленреактив»); цитрат натрия (АО «Ленреактив»); метиловый спирт (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД»), уксусная кислота ледяная (99,80%, ООО «НеваРеактив»), буферный раствор НЕРЕС 1М (Lonza), краситель Гимзы 10–12-кратный раствор (ООО «БиолоТ»).

Подготовка предметных стекол. Предметные стекла, применяемые для цитогенетических препаратов, готовили следующим способом: стекла обрабатывали теплым мыльным раствором, ополаскивали горячей водой и промывали в течение нескольких часов в проточной воде. Вымытые стекла помещали в хромовую смесь и выдерживали

¹ Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Женева: ВОЗ; 1989.

² Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

³ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. ГОСТ 34659-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных аберраций в клетках костного мозга млекопитающих.

⁴ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

⁵ ГОСТ 34659-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных аберраций в клетках костного мозга млекопитающих.

в течение 24 ч. После этого их вновь промывали в проточной воде с последующим кипячением в дистиллированной воде в течение 30 мин. Чистые обезжиренные стекла помещали в свежую дистиллированную воду и выдерживали при температуре 4–8 °С в течение 1 сут, после чего влажные стекла использовали для приготовления цитогенетических препаратов⁶.

Приготовление цитогенетических препаратов по методике ГОСТ 34659-2020. Мышам вводили колхицин в дозе 4 мг/кг внутрибрюшинно. Через 1,5 ч животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации. Из бедренных костей вымывали красный костный мозг подогретым до 37 °С раствором Хенкса в объеме 1 мл. В пробирки с костным мозгом добавляли еще 2 мл теплого раствора Хенкса. Клетки осаждали при помощи центрифуги Eppendorf 5804R при 100 g в течение 10 мин. Полностью удаляли супернатант и добавляли 3 мл предварительно подогретого гипотонического раствора (0,9% раствор цитрата натрия), осторожно ресуспендировали и инкубировали на водяной бане при 37 °С в течение 13 мин. По завершении гипотонической обработки пробирки центрифугировали 10 мин при 160 g. Супернатант удаляли и осторожно добавляли 3 мл свежеприготовленного фиксатора Кларка, осадок не ресуспендировали. Фиксатор Кларка готовили из метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1 (по объему) и использовали в течение 12 ч. Клетки костного мозга промывали фиксатором еще 2 раза. После последней смены фиксатора осадок аккуратно ресуспендировали, снимая его со стенок пробирки. Добавляли в каждую пробирку по каплям еще 4 мл фиксатора и оставляли на 12 ч при 4 °С. После выдержки центрифугировали пробирки при 160 g в течение 10 мин. Удаляли надосадочную жидкость и в пробирку к осадку добавляли по каплям 0,5 мл свежеприготовленного фиксатора при комнатной температуре, ресуспендировали. На охлажденные влажные предметные стекла наносили по 1–2 капли клеточной суспензии, держа пипетку перпендикулярно стеклу на высоте 15–20 см. Препараты высушивали на воздухе. Окраску проводили 10% раствором Гимзы в течение 10 мин при комнатной температуре.

Приготовление цитогенетических препаратов по методике «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств». За 1,5 ч до эвтаназии мышам вводили

внутрибрюшинно колхицин в дозе 4 мг/кг. Затем из бедренных костей 1 мл раствора Хенкса, подогретым до 37 °С, вымывали красный костный мозг. В пробирки с суспензией костного мозга добавляли еще 2 мл теплого раствора Хенкса. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 100 g, надосадочную жидкость полностью удаляли и медленно добавляли гипотонический раствор, встряхивая при этом пробирку для диспергирования осадка. В качестве гипотонического раствора применяли 1% раствор цитрата натрия либо 0,56% раствор KCl. Длительность гипотонической обработки применяемых растворов составляла 15 и 20 мин при комнатной температуре и при 37 °С соответственно. По окончании гипотонической обработки клетки центрифугировали, фиксировали путем добавления (по каплям) 3 мл свежеприготовленного фиксатора Кларка. Фиксацию проводили трехкратно. После последней фиксации пробирки центрифугировали, удаляли супернатант и к осадку добавляли 0,5 мл фиксатора, ресуспендировали. По 1–2 капли клеточной суспензии наносили на охлажденные влажные стекла с высоты 15–20 см и высушивали на воздухе. Препараты окрашивали 10% раствором красителя Гимзы 10 мин и промывали в дистиллированной воде с последующим высушиванием на воздухе.

Модифицированная методика пробоподготовки. С целью повышения эффективности пробоподготовки в методику были внесены следующие изменения:

- 1) клеточную взвесь после фиксации раскапывали на предметные стекла и помещали во влажную камеру на 2 ч⁷ [2];
- 2) эффективность культивирования клеток повышали путем смены питательной среды – вместо раствора Хенкса использовали питательную среду 199 жидкую с солями Хенкса с глутамином (далее – среда 199). Для вымывания клеток костного мозга использовали среду 199, нагретую до 37 °С. В пробирки с клеточной взвесью добавляли среду 199 до 5 мл и культивировали в термостате при температуре 37 °С в течение 2 ч [3–5];
- 3) для двухступенчатой фиксации использовали два фиксатора: 6% раствор уксусной кислоты и фиксатор Кларка. Клетки, прошедшие гипотоническую обработку, фиксировали 3 мл 6% раствора уксусной кислоты в течение 2 мин при комнатной температуре без центрифугирования и в течение 5 мин при центрифугировании

⁶ Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Женева: ВОЗ; 1989.

⁷ Плагина КЛ. Разработка методики цитогенетического анализа ооцитов для генотоксикологической оценки лекарственных средств: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: 2018.

при 100 г. После удаления надосадочной жидкости проводили фиксацию клеток стандартным способом по методике⁸ [6];

4) для улучшения разброса хромосом в метафазной пластинке применяли обработку буферным гипотоническим раствором (0,4% KCl с NEPEs) в течение 15–20 мин [3–5].

Хромосомный анализ проводили с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ci H550S (Япония) при увеличении объектива $\times 20$ и $\times 100$ с применением иммерсионного масла. Фоторегистрацию осуществляли при помощи цифровой фотокамеры Nikon DS-Fi3 с базовым программным обеспечением.

Основным критерием оценки цитогенетических препаратов, приготовленных по рекомендованным методикам, являлась доля метафазных пластинок, пригодных для анализа. Оценка хромосомных нарушений в клетках костного мозга выполняют путем анализа метафазных пластинок с модальным числом $n=40$ (39–41), поэтому среди проанализированных метафаз отдельно учитывали долю метафаз с полным набором хромосом ($n=40$) и метафаз с анеуплоидией ($n<40$; $n>40$). Также учитывали долю метафаз со слипшимися и разлетевшимися хромосомами среди непригодных для анализа метафазных пластинок.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10. При статистическом анализе для всех вариантов приготовления цитогенетических препаратов рассчитывали долю метафаз, доступных для анализа (P), и стандартную ошибку доли ($P-\Delta$; $P+\Delta$). Для оценки результата использовали многофакторный дисперсный анализ. Результат между группами считали статистически значимым при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На качество препаратов влияют два основных фактора: гипотоническая обработка и фиксация материала. Целью гипотонической обработки является разрыв ядерной оболочки и связей между хромосомами, что позволяет им свободно распределяться по цитоплазме. От качества фиксации зависит количество хромосом в метафазной пластинке. Артефактная потеря хромосом в результате некачественной фиксации также приводит к уменьшению метафаз, пригодных для анализа.

Сравнимые методики в большей мере отличаются вариантами гипотонической обработки

и временем выдержки клеток костного мозга в растворе. В качестве фиксатора в обеих методиках используется фиксатор Кларка с разницей по времени воздействия. По методике ГОСТ 34659-2020 рекомендовано фиксировать клеточную взвесь в течение 12 ч, по методике Руководства – в пределах 2–3 ч. Результаты сравнения цитогенетических препаратов, приготовленных по разным методикам, представлены в *таблице 1*.

При сравнении методик приготовления цитогенетических препаратов выявлено статистически значимое снижение доли слипшихся метафазных пластинок при приготовлении препаратов с гипотонической обработкой 0,56% раствором KCl в течение 20 мин в соответствии с Руководством относительно образцов, подготовленных по методике ГОСТ 34659-2020. Препараты, приготовленные по методике ГОСТ 34659-2020, содержали малую долю доступных для анализа метафаз (39%). Слипанию хромосом могла способствовать гипотоническая обработка при 37 °С. При повышении температуры эффективность гипотонической обработки увеличивается, однако одновременно усиливается и слипание клеток из-за присутствия в костном мозге коллагена и жира. Кроме того, фиксатор Кларка может вызывать значительное сжатие клеток [7], а в данном случае фиксация проходила в течение длительного времени (12 ч). В результате несбалансированной комбинации гипотонической обработки и времени фиксации образуется малое количество доступных для анализа метафаз.

Фиксация препаратов, выполненных по Руководству, осуществлялась в течение 2–3 ч. Из рассмотренных вариантов гипотонической обработки наиболее эффективной является обработка 0,56% раствором KCl в течение 20 мин при комнатной температуре. Доля доступных метафазных пластинок в этом случае составила 51%. Существенным недостатком данной методики является ресуспендирование клеточного осадка на стадии первой фиксации, в момент, когда клетки уже прошли гипотоническую обработку, но еще не были зафиксированы, поэтому механическое перемешивание способствовало повышению доли разлетевшихся хромосом, а также повреждению их структуры.

Оптимальным вариантом гипотонической обработки, при которой регистрировали наибольшую долю доступных для анализа метафазных пластинок, является обработка 0,56% раствором

⁸ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

Таблица 1. Сравнение качества цитогенетических препаратов костного мозга мышей-самцов, приготовленных при разных вариантах гипотонической обработки**Table 1.** Comparison of the quality of cytogenetic samples of bone marrow cells of male mice prepared using different hypotonic treatments

Методика Procedure	Условия гипотонической обработки Hypotonic treatment conditions	Критерии оценки качества цитогенетических препаратов Quality assessment criteria for cytogenetic preparations					Время пробо- подготовки, ч Sample preparation time, h
		Доля метафазных пластинок Percentage of metaphase plates n=100, P (P-Δ; P+Δ), %			Доля набора хромосом в проанализированных метафазах Percentage of chromosome sets in the analysed metaphases P (P-Δ; P+Δ), %		
		Доступных для анализа Analysable	Недоступных для анализа Non-analysable		(n=40)	(n<40; n>40)	
			Слипшиеся хромосомы Sticky chromosomes	Разлетевшиеся хромосомы Scattered chromosomes			
ГОСТ 34659-2020* GOST 34659-2020	0,9% цитрат натрия при 37 °С, 13 мин 0.9% sodium citrate, 37 °C, 13 min	39 (0,295; 0,485)	46 (0,463; 0,657)	15 (0,08; 0,22)	69 (0,60; 0,78)	31 (0,22; 0,40)	~14
Руководство** Guidelines**	1% цитрат натрия 37 °С, 15 мин 1% sodium citrate, 37 °C, 15 min	41 (0,314; 0,506)	48 (0,382; 0,578)	11 (0,049; 0,171)	65 (0,557; 0,743)	35 (0,257; 0,443)	~6
	1% цитрат натрия, 20 мин 1% sodium citrate, 20 min	45 (0,354; 0,546)	42 (0,323; 0,517)	13 (0,064; 0,196)	68 (0,589; 0,771)	32 (0,229; 0,411)	
	0,56% KCl 37 °С, 15 мин 0.56% KCl, 37 °C, 15 min	44 (0,343; 0,537)	55 (0,453; 0,647)	11 (0,049; 0,171)	71 (0,621; 0,799)	29 (0,201; 0,379)	
	0,56% KCl, 20 мин 0.56% KCl, 20 min	51 (0,426; 0,594)	36*** (0,266; 0,454)	13 (0,064; 0,196)	76 (0,676; 0,844)	24 (0,156; 0,324)	
Модифицированная методика Modified procedure	Среда 199, префиксация Medium 199, preliminary fixation	56*** (0,468; 0,652)	35*** (0,257; 0,443)	9 (0,037; 0,143)	88**** (0,818; 0,944)	12*** (0,056; 0,184)	~4

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. P – доля; Δ – стандартная ошибка доли; n – модальное число.

* – ГОСТ 34659-2020 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих.

** – Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

*** – данные имеют статистически значимые отличия в сравнении со значениями, полученными при выполнении цитогенетических препаратов по методике ГОСТ 34659-2020 при p<0,05.

**** – данные имеют статистически значимые отличия в сравнении со значениями, полученными при выполнении цитогенетических препаратов по методике из Руководства (гипотоническая обработка 0,56% KCl, 20 мин) при p<0,05.

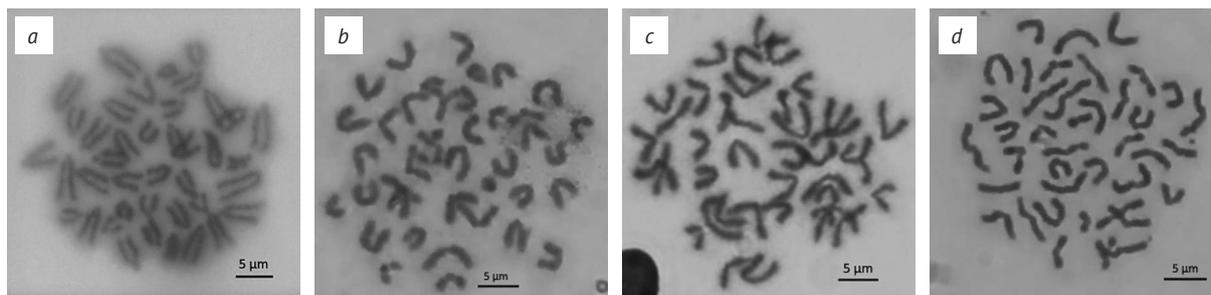
Note. P, proportion; Δ, standard error of the proportion; n, modal number.

* GOST 34659-2020. Methods for Testing the Impact of Chemical Products on the Human Body. Assessment of Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Cells of Mammals.

** A.N. Mironov (ed.), Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs. Part 1. Moscow: Grif and Co; 2012.

*** There is a statistically significant difference between these data and the data obtained for cytogenetic samples prepared according to GOST 34659-2020, with p<0.05.

**** There is a statistically significant difference between these data and the data obtained for cytogenetic samples prepared according to the Guidelines (hypotonic treatment with 0.56% KCl for 20 min), with p<0.05.



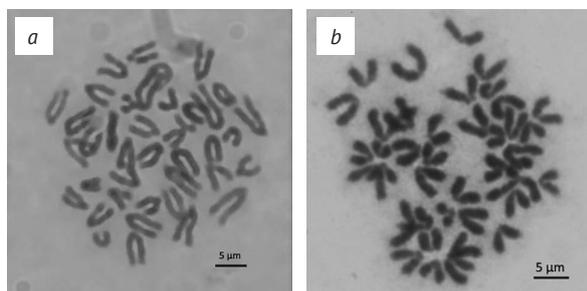
Фотографии выполнены авторами / The photos are taken by the authors

Рис. 1. Метафазные пластинки при обработке различными гипотоническими растворами: а, б – 0,56% раствор KCl; с, d – буферный гипотонический раствор (0,4% KCl с HEPES)

Fig. 1. Metaphase plates from cytogenetic preparations treated with various hypotonic solutions: a, b, 0.56% KCl; c, d, hypotonic buffer solution (0.4% KCl and HEPES)

KCl с выдержкой в течение 20 мин и последующей фиксацией смесью метанола и уксусной кислоты (3:1 об./об.) в течение 12 ч.

С целью улучшения качества цитогенетических препаратов были рассмотрены дополнительные условия пробоподготовки, такие как сушка препаратов во влажной камере, использование среды 199 и культивирование клеток костного мозга, использование буферного гипотонического раствора (0,4% KCl с HEPES), применение дополнительной фиксации клеток 6% раствором уксусной кислоты. При использовании буферного гипотонического раствора не было отмечено более выраженной диффузии хромосом по сравнению с обработкой 0,56% раствором KCl, при этом регистрировали высокую долю слипшихся хромосом, доля доступных для анализа метафаз при таких условиях обработки составила 52%. Результаты сравнения влияния гипотонической обработки на слипание хромосом в метафазных пластинках представлены на рисунке 1.



Фотографии выполнены авторами / The photos are taken by the authors

Рис. 2. Метафазные пластинки при различных условиях высушивания цитогенетических препаратов: а – сушка на воздухе при комнатной температуре; б – сушка во влажной камере

Fig. 2. Metaphase plates from cytogenetic preparations dried under various conditions: a, at room temperature and humidity; b, in a humidified chamber

Культивирование клеток в среде 199 после отбора позволило увеличить общее количество метафазных пластинок на стекле, но никак не повлияло на доступность для анализа.

Сушка препаратов во влажной камере способствовала укорачиванию плеч хромосом и более выраженной диффузии хромосом в метафазной пластинке (рис. 2). Несмотря на то что хромосомы расположены более диффузно, укорачивание плеч хромосом может негативно отразиться на качестве исследования из-за сложностей визуализации aberrаций. Доля доступных для анализа пластинок в данном случае составила 53%. Фиксация с использованием 6% раствора уксусной кислоты позволила увеличить долю доступных для анализа метафаз до 56% (табл. 1). Повышение качества цитогенетических препаратов отмечали при использовании стадии культивирования клеток костного мозга в среде 199 и стадии дополнительной фиксации 6% раствором уксусной кислоты.

Суммировать описание модифицированной методики приготовления цитогенетических препаратов можно следующим образом:

- 1) ввести мышам внутривенно раствор колхицина в дозе 4 мг/кг за 1,5 ч до эвтаназии;
- 2) извлечь бедренные кости, промыть костный мозг 1 мл среды 199, нагретой до 37 °С. В пробирки с клеточной взвесью добавить еще 4 мл среды 199, после чего выдержать пробирки 1–2 ч при 37 °С;
- 3) после инкубации пробирки центрифугировать в течение 10 мин при 160 g, удалить супернатант и добавить 3 мл 0,56% раствора KCl, перемешать и оставить при комнатной температуре на 20 мин;
- 4) после гипотонической обработки клетки снова центрифугировать, удалить супернатант и фиксировать 6% раствором уксусной кислоты 2 мин при комнатной температуре, после чего

пробирки центрифугировать в течение 5 мин при 100 g;

5) дальнейшую фиксацию проводить раствором Кларка с двумя сменами фиксатора в течение 12 ч. При первой фиксации осадок не ресуспендировать. Между сменами фиксатора пробирки центрифугировать по 10 мин при 100 g;

6) после фиксации осадок разбавить в 0,5 мл фиксатора, аккуратно ресуспендировать и по 1–2 капли нанести на чистые охлажденные влажные стекла с высоты 15–20 см, держа пипетку перпендикулярно предметному стеклу;

7) высушить препараты при комнатной температуре;

8) поместить препараты в 10% раствор красителя Гимзы на 10 мин.

Таким образом, пробоподготовка по модифицированной методике (модификация условий гипотонической обработки и фиксации материала) позволила увеличить количество доступных для анализа пластинок по сравнению с количеством качественных пластинок, полученных по методике ГОСТ 34659-2020 (с 39 до 56%), а также увеличить количество метафаз с полным набором хромосом. Предложенная модификация методики позволяет сократить время приготовления препаратов на 10 ч по сравнению со способом, описанным в ГОСТ 34659-2020, и на 2 ч по сравнению с методикой из Руковод-

ства за счет уменьшения времени на фиксацию клеточной суспензии.

Описанная выше методика оригинальна и не повторяет методики, представленные ранее в научных статьях и методических руководствах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения исследований была экспериментально обоснована необходимость модификации методики приготовления цитогенетических препаратов костного мозга млекопитающих *in vivo*. Предложенная последовательность процедур пробоподготовки образцов метафазных пластинок имеет ряд преимуществ перед методиками, описанными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» и ГОСТ 34659-2020 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих», в том числе увеличение количества пригодных для анализа метафаз на 5%, увеличение доли хромосом с полным набором ($n=40$) на 12% и сокращение времени, затрачиваемого на приготовление препаратов на 2–10 ч. Разработанная методика рекомендуется для использования в доклинических исследованиях *in vivo* для получения цитогенетических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дурнев АД, Жанатаев АК. Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(1):90–109. Durnev AD, Zhanataev AK. Relevant aspects of drug genetic toxicology. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(1):90–109 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-90-109>
2. Deng W, Tsao SW, Lucas JN. A new method for improving metaphase chromosome spreading. *Cytometry A*. 2003;51(1):46–51. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10004>
3. Moralli D, Yusuf M, Mandegar MA. An improved technique for chromosomal analysis of human ES and iPS cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(2):471–7. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9224-4>
4. Liehr T, Weise A, Person L. How to obtain high-quality metaphase spreads for molecular cytogenetics. *Curr Protoc*. 2022;2(2):e392. <https://doi.org/10.1002/cpz1.392>
5. Новгородова ИП. Сравнительный анализ гипотонических растворов для цитогенетических исследований животных. *Аграрная наука*. 2021;(6):24–6. Novgorodova IP. Comparative analysis of hypotonic solutions for cytogenetic studies of animals. *Agrarian Science*. 2021;(6):24–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-24-26>
6. Овсепян ВА, Югов ЮИ. Способ приготовления препаратов метафазных хромосом из клеток костного мозга больных гемобластозами. Патент Российской Федерации № 2200318; 2000. Ovsepyan VA, Yugov Yul. Method for obtaining preparations of metaphase chromosomes out of bone marrow cells in hemoblastose-suffering patients. Patent of the Russian Federation No. 2200318; 2000 (In Russ.). EDN: [MMDIRO](https://www.edn.ru/2200318)
7. Буданцев АЮ, Демьянов АЮ. Деформация тканей в ходе гистологического процессинга. I. Методы морфометрической оценки деформаций. *Цитология*. 2017;59(5):362–8. Budantsev AYU, Demyanov AYU. Deformations during histological tissue processing. I. Methods for morphometric analysis of deformations. *Cytology*. 2017;59(5):362–8 (In Russ.). EDN: [YQGDZP](https://www.edn.ru/2200318)
8. Коненков ВИ, Королев МА, Чуринов АА. Изучение возможных мутагенных свойств нового лекарственного средства на основе комплекса лития, оксида алюминия и полиметилсилоксана. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019;39(5):62–7. Konenkov VI, Korolev MA, Churin AA. Studying the possible mutagenic properties of new medicine on the basis of complex lithium citrate, aluminum oxide and polymethylsiloxane. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2019;39(5):62–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.15372/SSMJ20190507>
9. Долгова ЕВ, Николин ВП, Попова НА. Патологические изменения, возникающие в организме мышей,

- обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(1):129–46.
- Dolgova EV, Nicolini VP, Popova NA. Pathological changes in mice treated cyclophosphamide and exogenous DNA. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(1):129–46 (In Russ.).
EDN: [RUGRAJ](#)
10. Blumenthal AB, Dieden JD, Kapp LN, Sedat JW. Rapid isolation of metaphase chromosomes containing high molecular weight DNA. *J Cell Biol*. 1979;81(1):255–9.
<https://doi.org/10.1083/jcd.81.1.255>
 11. Fukami M, Shima H, Suzuki E, Ogata T, Matsubara K, Kamimaki T. Catastrophic cellular events leading to complex chromosomal rearrangements in the germline. *Clin Genet*. 2017;91(5):653–60.
<https://doi.org/10.1111/cge.12928>
 12. Mardin BR, Drainas AP, Waszak SM, Weischenfeldt J, Isokane M, Stütz AM, et al. A cell-based model system links chromothripsis with hyperploidy. *Mol Syst Biol*. 2015;11(9):828–40.
<https://doi.org/10.15252/msb.20156505>
 13. Pacchierotti F, Stocchi V. Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse. *Methods Mol Biol*. 2013;1044:147–63.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_7

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.О. Вернер – идея, планирование и проведение экспериментальной части исследования, подбор и анализ литературы, написание и оформление рукописи; Т.М. Устинова – подбор и анализ литературы, редактирование текста рукописи, формулировка выводов; Н.Г. Венгерович – редактирование текста рукописи и утверждение окончательного варианта статьи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Anna O. Verner* conceived the idea of the study, designed and conducted the experiments, collected and analysed literature, drafted and designed the manuscript. *Tatiana M. Ustinova* collected and analysed literature, edited the manuscript, and formulated the conclusions. *Nikolai G. Vengerovich* edited the manuscript and approved the final version for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Вернер Анна Олеговна / Anna O. Verner

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1023-6060>

Устинова Татьяна Михайловна, канд. биол. наук / **Tatiana M. Ustinova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9579-9190>

Венгерович Николай Григорьевич, д-р мед. наук, доцент / **Nikolai G. Vengerovich**, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3219-341X>

Поступила 05.02.2024

После доработки 18.04.2024

Принята к публикации 18.06.2024

Received 5 February 2024

Revised 18 April 2024

Accepted 18 June 2024