

# АХБОРОТИ

АКАДЕМИЯИ ФАНҶОИ РСС ТОЧИКИСТОН

# ИЗВЕСТИЯ

АКАДЕМИИ НАУК ТАДЖИКСКОЙ ССР

ШУЪБАИ ФАНҶОИ БИОЛОГИ

ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

3(52)

ДУШАНБЕ — 1973

УДК 576.312.3

А. Н. КОНЬКОВ

### ВЫЯВЛЕНИЕ ПОПЕРЕЧНОЙ ИСЧЕРЧЕННОСТИ ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Дальнейший научный прогресс в цитогенетике лейкозов, рака и других опухолей во многом сдерживается ограниченными возможностями существующих методов идентификации метафазных хромосом, недостатком объективных критериев, позволяющих «персонально» выявлять каждую из них. Между тем такое точное, индивидуальное определение, несомненно, способствовало бы решению многих неясных вопросов, касающихся причин нарушения числа и структуры хромосом при злокачественных новообразованиях, раскрытию сущности и механизма анеуплоидии.

Разработка в последнее время методов более тонкого кариологического анализа делает возможным проведение четкой индивидуализации хромосомных пар. Большинство этих методик основано на получении характерной поперечной исчерченности хромосом, выявлении так называемой «псевдомонилиформной» структуры (Dutrillaux, Lejeune, 1971) — от латинского *monile* — ожерелье, что достигается воздействием на приготовленные, как правило, из культуры клеток периферической крови и зафиксированные препараты хромосом горячих солевых растворов с определенным уровнем pH (Summer, Evans, Buckland, 1971; Schnedl, 1971; Dutrillaux, Lejeune, 1971), или растворов протеолитических ферментов — проназы (Dutrillaux, de Grouchy, Mme Finaz, Lejeune, 1971), трипсина (Seabright, 1971) с последующей окраской по Романовскому-Гимза. При этом по длине хромосом наблюдается чередование сильно и слабо окрашенных участков, располагающихся в идентичных локусах двух хроматид каждой хромосомы. Постоянство этих структур облегчает определение хромосомных пар, так как каждая пара гомологичных хромосом характеризуется свойственным только ей расположением и размерами интенсивно и слабо окрашенных зон.

Сейчас, однако, со всей очевидностью доказано, что использование костномозгового пунктата в качестве материала для цитогенетического исследования имеет целый ряд преимуществ перед методом культуры клеток и идентификации хромосомных нарушений, в частности при лейкозах (Прокофьева—Бельговская и др., 1969).

Нами предпринята попытка получить специфическую поперечную исчерченность хромосом в препаратах, приготовленных из клеток костного мозга. Для цитогенетического исследования был использован костный мозг двух больных, не имевших контакта с мизлтоксическими факторами. Пункция подвздошной кости была произведена в одном случае для подтверждения диагноза болезни Верльгофа, в другом — гипопластической анемии. Обсуждается также вопрос о происхождении поперечной исчерченности хромосом.

#### Материал и методика

Для приготовления неокрашенных препаратов хромосом использовали «прямой» костномозговой метод Фитцджеральда (Fitzgerald et al.,

1963) с некоторыми модификациями. 1,0 мл пунктата костного мозга, полученного путем пункции подвздошной кости, помещали в центрифужную пробирку с 8 мл среды 199,2 каплями раствора колхицина (2,14 мг/100 мл дистиллированной воды), 1 каплей гепарина и инкубировали в термостате при 37°C в течение одного часа.

После центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 минут надосадочную жидкость удаляли, а осадок суспендировали в 8 мл 0,54% раствора KCl, и суспензию клеток в пробирке помещали в термостат при 37°C на 15 минут для гипотонической обработки. После повторного центрифугирования и удаления надосадочной жидкости клетки фиксировали в течение 25 минут свежеприготовленным фиксатором, состоящим из смеси трех частей метанола и одной части ледяной уксусной кислоты. Центрифугирование и добавление новых порций фиксатора производили до тех пор, пока осадок не становился белым, а фиксатор — прозрачным и чистым.

Препараты готовили путем выжигания фиксатора (Scherz and Reed, 1962), что позволяет улучшить разброс хромосом. 3—4 капли суспензии клеток в фиксаторе после их растекания на предметном стекле поджигали от пламени спиртовки. Остающиеся после сгорания фиксатора на предметном стекле капли стряхивали.

Приготовленные таким способом препараты помещали в 0,02 M раствор фосфатного буфера (pH 6,5) при 87°C на 10 минут, затем ополаскивали дистиллированной водой и окрашивали по Гимза (Dutrillaux, Lejeune, 1971). Наблюдение препаратов производили в микроскопе МБИ-6. Для идентификации хромосом использовали денверскую классификацию.

### Результаты и обсуждение

Учитывались метафазные пластинки с хорошим, но не чрезмерным разбросом хромосом. Степень выраженности поперечной исчерченности хромосом значительно варьировала от метафазы к метафазе.

Однако среди проанализированных 50 метафазных пластинок у



Рис. 1. Метафазные хромосомы клетки костного мозга (больной № 1 46 XV). Отчетливо видна неравномерная окраска хромосом.

каждого больного удавалось найти 5 таких, в которых этот рисунок был выражен особенно отчетливо (рис. 1). Количество чередующихся темных и светлых участков было более значительным в хромосомах, находящихся на стадии ранней метафазы, что следует связать, очевидно, с меньшей степенью спирализации ДНК в них. Продольная дифференциация особенно хорошо заметна в хромосомах 1, 2, 3, 4, 5 пар, а также в группах 6—X—12 и 13—15. Темные и более светлые участки локализовались в строго симметричных локусах хроматид. Специфичность рисунка поперечной исчерченности каж-

дой пары хромосом значительно облегчала процесс кариотинирования и давала возможность проведения точной внутригрупповой идентификации (рис. 2).

Вопрос о происхождении поперечной исчерченности хромосом окончательно не решен. Однако уже сейчас довольно твердо установлена причастность их гетерохроматических районов к появлению данного рисунка при условии специальной обработки (Summer, Evans, Buckland, 1971; Schnedl, 1971; Gall, Pardue, 1969).

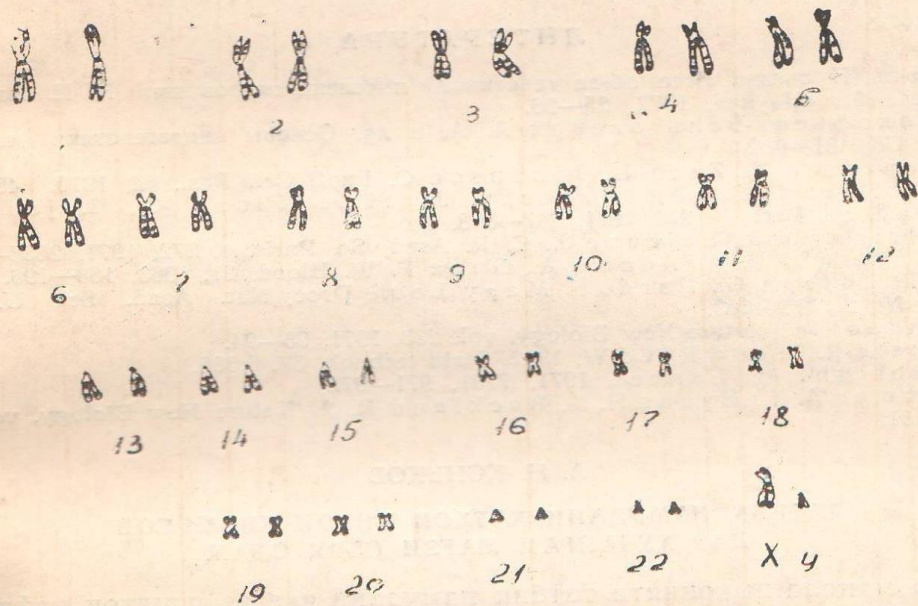


Рис. 2. Кариотип клетки костного мозга (больной № 1 46 XV). Отмечается полное соответствие рисунка неравномерной окраски хромосом-гомологов.

Оказалось, что ДНК этих районов содержит участки, состоящие из многократно повторяющейся последовательности нуклеотидов, формирующих так называемую сателлитную ДНК. Полагают, что обнаруженная сателлитная ДНК более устойчива к денатурации — это и обуславливает неравномерность окраски по длине хромосом (Мат-лы II съезда Всес. об-ва генетиков и селекционеров, 1972). Повышенная стойкость спутничной ДНК, возможно, сказывается и при воздействии на хромосомы растворов протеолитических ферментов.

Подобная картина дифференциации в окраске по длине хромосом была получена также в опытах по обработке препаратов флуоресцирующим красителем акрихин-ипритом и его аналогами, избирательно окрашивающими определенные участки хромосом (Casperson, Zech, Johanson, 1970). Авторы высказывают мысль, что эта особенность красителей обусловлена преимущественным связыванием их гуанин-цитозин основаниями в молекуле ДНК. Более того, на хромосомах *Vicia faba* и *Trillium* показано, что участки, содержащие гуанин-цитозин основания, соответствуют локализации гетерохроматических районов хромосом. Отсюда следует вывод, что флуоресцирующие красители специфически окрашивают гетерохроматические районы хромосом, а ДНК этих районов, вероятнее всего, состоит из гуанин-цитозин оснований.

Последующее изучение картины продольной дифференциации хромосом, получаемой с помощью упомянутых методов и одновременный

интенсивный поиск новых оригинальных способов, позволяющих получать стабильные результаты в проведении индивидуальной оценки каждой метафазной хромосомы, в итоге несомненно должны привести к установлению функционального значения и фенотипического эффекта хромосомных сегментов, созданию методик генетического картирования.

Таджикский государственный  
медицинский институт  
им. Абуали ибн-Сино

Поступило 8 X 1972

#### ЛИТЕРАТУРА

- Мат-лы II съезда Всес. об-ва генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова, тез. докл. М., «Наука», 1972, 25—26.  
Прокофьева-Бельговская А. А. и др. Основы цитогенетики человека. М., 1969, 475, 481—482.  
Casperson T., Zech L., Johanson C. *Exptl Cell Res.*, 62, 1970, 490—492.  
Dutrillaux B., de Grouchy J., Mme Finaz C., Lejeune J., C. R. *Asad. Sc. Paris*, t. 273, 1971, 587—588.  
Dutrillaux B., Lejeune J., C. R. *Asad. Sc. Paris*, t. 272, 1971, 2638—2640.  
Fitzgerald P. H., Adams A., Gunz F. W. *Blood*, 21, 1963, 183—196.  
Gall Joseph G., Pardue Mary Lou. *Proc. Nat. Asad. Sci. U. S. A.*, 1969, 63, № 2, 378—383.  
Schneidl W., *Nature New Biology*, vol. 233, 1971, 93—94.  
Scherz R. G. and Reed W. 1962, *Stain technol.*, 37, 6:386.  
Seabright M., *Lancet*, 1971, 7731, 971—972.  
Summer A. T., Evans H. J., Buckland R. A. *Nature New Biology*, vol. 232, 1971, p. 31.

А. Н. КОНЬКОВ

#### ТАТБИҚ НАМУДАНИ ХАТҲОИ ХИРОИ ХРОМОСОИ ДАР ҲУЧАЙРАИ МАҒЗИ САРИ ОДАМ

Дар мақола имконияти татбиқ намудани яке аз усулҳои пайдо намудани хатҳои хираи хромосоми (унсури) ҳуҷайраи устухони мағзи сари одам равшан карда мешавад.

Дорувор ҳангоми 87 дараҷа С будани ҳарорат дар давоми 10 дақиқа ба буфери фосфатдори РН 6,5 ғўтонида шуд. Аз рӯи усули эҷодкардаи рангкунии Гимза формулаи псевдомонилии сохти хромосом пайдо карда шуд. Ин барои ба таври индивидуали дарк кардани он имконият дод.

Дар мақола нақши хатҳои бари хромосом, ки аз қади радифи хромосоми ДНК ҷой гирифта аст, равшан карда мешавад (бо дараҷаи баланди такроршавии асоси гуанин-цитозин).