

# Проблемы гематологии и переливания крови



· МЕДИЦИНА ·  
МОСКВА  
1974

3



А. Н. Коньков

## ВЫЯВЛЕНИЕ РИСУНКА НЕРАВНОМЕРНОЙ ОКРАСКИ МЕТАФАЗНЫХ ХРОСОМОВ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗАМИ ПРИ ОБРАБОТКЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ РАСТВОРОМ ТРИПСИНА

Кафедра гематологии (зав. — проф. А. И. Воробьев) Центрального института усовершенствования врачей, Москва

На современном этапе цитогенетических исследований у человека отчетливо выявились ограниченные возможности существующих методов получения препаратов и идентификации метафазных хромосом, поскольку рисунок равномерной окраски их затрудняет проведение четкой внутригрупповой идентификации при кариотипировании. Между тем такое точное индивидуальное определение приобретает все более важное значение для установления причин нарушения числа и структуры хромосом при ряде заболеваний и синдромов, а также при аномалиях развития.

Ведущаяся в настоящее время разработка новых методов цитогенетического анализа уже привела к определенным успехам в проведении четкой индивидуализации хромосом — гомологов человека. Большая часть описываемых методик основана на получении характерной поперечной исчерченности метафазных хромосом, выявлении так называемой псевдомонилиформной структуры (Dutillaux и Lejeune) — от латинского *monile* — «ожерелье». Достигается это воздействием на зафиксированные препараты хромосом горячих солевых растворов с определенным рН (Dutrillaux и Lejeune; Schnedl; Sumner и соавт.), растворов протеолитических ферментов — проназы (Dutrillaux и соавт.), трипсина (Seabright, 1971, 1972) с последующей обычной окраской по Гимзе или красителем Лейшмана. В результате такой обработки по длине хромосом наблюдается чередование сильно и слабо окрашенных участков, располагающихся в идентичных локусах сестринских хроматид каждой хромосомы. Природа неравномерной окраски еще не вполне ясна, но тем не менее ее постоянство облегчает определение хромосомных пар, поскольку каждая пара гомологичных хромосом характеризуется свойственным только ей рисунком чередования интенсивно и слабо окрашенных зон.

Следует отметить, что все описанные методики индивидуальной характеристики хромосом, как правило, основаны на использовании культуры лейкоцитов периферической крови в качестве субстрата проводимых цитогенетических исследований. В то же время в литературе имеются лишь единичные и недостаточно разработанные данные (Evans и соавт.) об употреблении для этой же цели костномозгового пунктата, хотя работами прошедших лет со всей очевидностью установлено, что возможности, которые предоставляет костный мозг в плане выявления истинной картины хромосомных нарушений, гораздо шире, в частности при лейкозах (большая частота обнаружения анеуплоидных линий клеток, а также Ph'-хромосомы при хроническом миелолейкозе) (Е. К. Пяткин; Tough и соавт.; Carbone и соавт.).

Основываясь на данных о возможности индивидуальной оценки хромосом в культуре лейкоцитов периферической крови с помощью обработки цитогенетических препаратов раствором трипсина (Seabright, 1971, 1972), мы стремились выяснить возможность применения этого метода для точной идентификации хромосом костномозговых клеток и при необходимости провести его модификацию.

Объектом предпринятых исследований был костный мозг больных, характер гематологических заболеваний которых не связан с изменениями хромосомного аппарата костномозговых клеток. Одновременно с целью решения вопроса о возможности индивидуальной маркировки хромосом-гомологов костномозговых клеток при лейкозах у человека использовали костный мозг больных с различными морфологическими вариантами острого лейкоза и хроническим миелолейкозом.

Препараты метафазных хромосом готовили в два этапа. На первом этапе использовали уже давно вошедший в практику цитогенетических исследований модифицированный метод Fitzgerald и соавт. Костный мозг получали путем стерильной пункции. Костномозговой пунктат в количестве 1—1,5 мл помещали в центрифужную пробирку с 8 мл гепаринизированной среды № 199 и 2 каплями раствора колхицина (0,02 мл на 1 мл дистиллированной воды) и в течение 50 мин инкубировали в термостате при 37°. Затем после центрифугирования со скоростью 1500 об/мин в течение 5 мин надосадочную жидкость удаляли, а осадок суспендировали в 8 мл 0,54% раствора KCl, и суспензию клеток в пробирке помещали в термостат при 37° на 15 мин для гипотонической обработки. После повторного центрифугирования и удаления надосадочной жидкости клетки фиксировали в течение 25 мин в свежеприготовленном фиксаторе, состоящем из смеси 3 частей метанола и 1 части ледяной уксусной кислоты. Центрифугирование и добавление новых порций фиксатора продолжали до тех пор, пока осадок не становился белым, а фиксатор — прозрачным и чистым.

Препараты готовили путем выжигания фиксатора, что позволяет улучшить разброс хромосом: 2—3 капли суспензии клеток в фиксаторе после растекания на предметном стекле поджигали от пламени спиртовки. Капли, оставшиеся после сгорания фиксатора на предметном стекле, стряхивали.



ческих и гетерохроматических районов. Представляемая этими методами возможность точного определения хромосом-гомологов открывает перспективы для более детального изучения причин и механизмов хромосомных нарушений при злокачественных новообразованиях, в том числе при неоплазиях кроветворной системы.

## ЛИТЕРАТУРА

Пяткин Е. К. В кн.: Генетика в гематологии. Л., 1967, с. 268. — Carbone P. P., Tjio J. H., Whang J. et al. *Ann. intern. Med.*, 1963, v. 59, p. 662. — Dutrillaux B., de Grouchy J., Finaz C. et al. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1971, v. 273 D, p. 578. — Dutrillaux B., Lejeune J. *Ibid.*, v. 272, p. 2638. — Evans H. J., Buckton K. E., Sumner A. T., *Chromosoma (Berl.)*, 1971, Bd 35, S. 310. — Fitzgerald P. H., Adams A., Gunz F. W., *Blood*, 1963, v. 21, p. 183. — Schnedl W., *Nature New Biol.*, 1971, v. 233, p. 93. — Seabright M., *Lancet*, 1971, v. 2, p. 971. — *Idem.* *Chromosoma (Berl.)*, 1972, Bd 36, S. 204. — Sumner A. T., Evans H. J., Buckland R. A., *Nature New Biol.*, 1971, v. 232, p. 31. — Touch I. M., Jacobs P. A., Court Brown W. M. et al. *Lancet*, 1963, v. 1, p. 844. — Wang H. C., Fedoroff S., *Nature, New Biol.*, 1972, v. 235, p. 52.



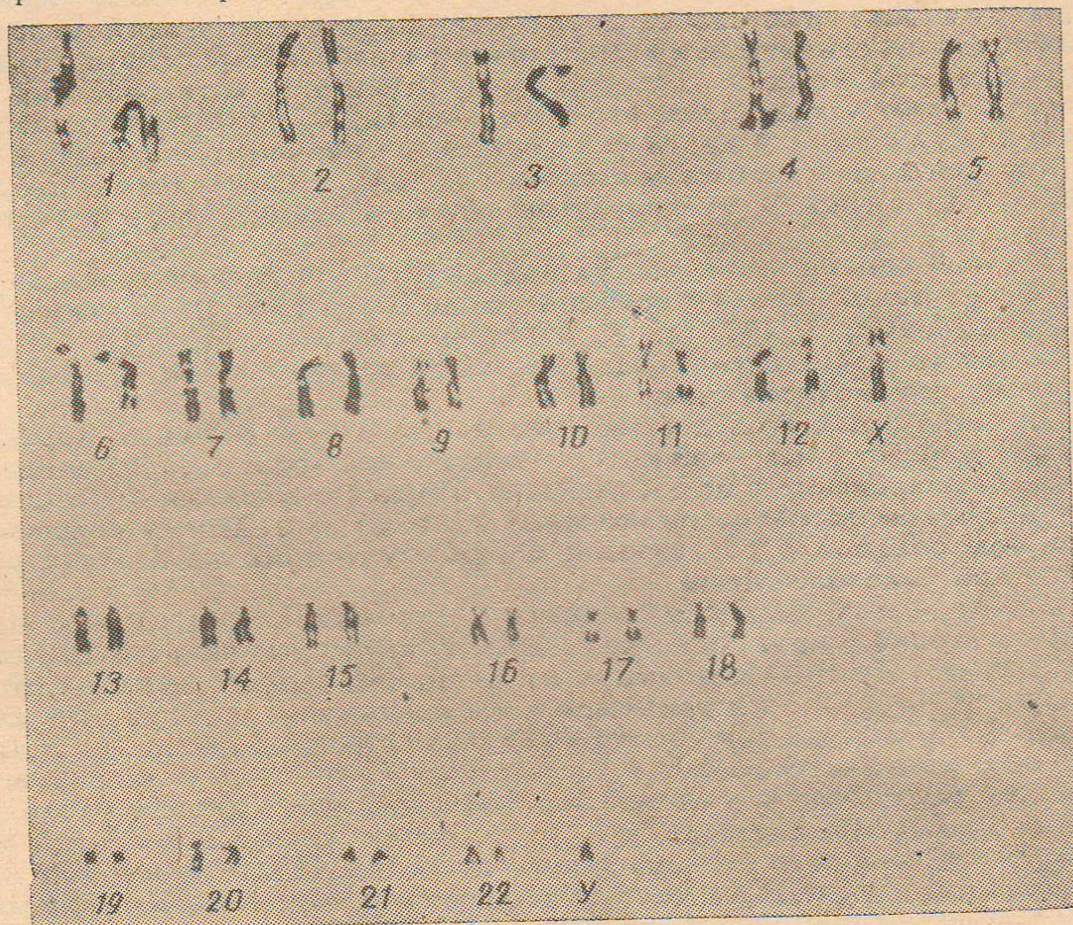


Рис. 1. Кариотип клетки костного мозга больного М-на (диагноз: острый лимфобластный лейкоз).

Отчетливо виден характер неравномерной окраски хромосом после обработки их раствором трипсина. Рисунок окраски гомологичных хромосом одинаков, в то же время каждая пара хромосом-гомологов характеризуется свойственным только ей рисунком неравномерной окраски, что и позволяет производить точную идентификацию всех хромосомных пар.



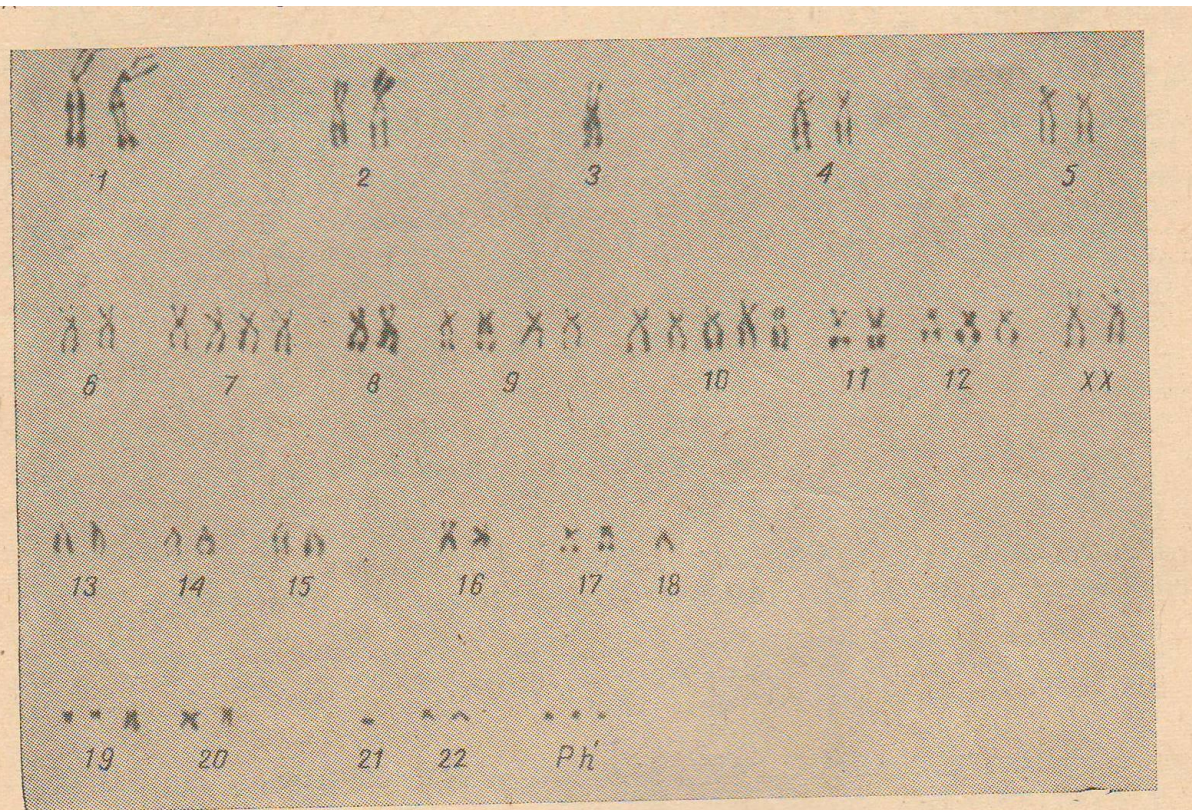


Рис. 2. Кариотип клетки костного мозга больной М-ой (диагноз: хронический миелолейкоз, бластный криз).

Добавочные хромосомы в группе С по характеру рисунка неравномерной окраски отнесены к 7, 9, 10-й и 12-й парам. Добавочная хромосома в группе F идентифицирована как хромосома 19. Рисунки окраски 3 Рh'-хромосом одинаков.