

O METODĂ SIMPLĂ CU REZULTATE CONSTANTE PENTRU EXAMINAREA CROMOZOMILOR ANIMALELOR DE EXPERIENȚĂ

F. Wiener, A. Abrahám, A. Bedő

Printre metodele folosite de citogenetica contemporană, tehnica pentru punerea în evidență a cromozomilor are o largă aplicație. Prin aplicarea acestei metode s-au putut clarifica în parte etiopatogenia unor anomalii observate în dezvoltarea sexuală și în malformații congenitale. Ea a adus o contribuție însemnată la elucidarea influenței nucleului asupra sintezei proteinelor din citoplasmă, la introducerea unor metode noi în studierea hibridării somatice și la definirea condițiilor care favorizează stabilitatea sau instabilitatea cromozomică (1).

Alegerea unei tehnici ușor de minuit care să furnizeze date constante, prezintă o serie de greutăți. Aceasta se datorește faptului că autorii aplică o serie de variante și modificări, insistând asupra avantajelor tehnicii folosite.

Tehnicile folosite de noi au fost cele preconizate de Dyer (2), Caratzali (3), Tytio (4), Jungklass (5), Fox (6). Am studiat cromozomii celulelor măduvei osoase, splinei și timusului șoarecilor aparținând liniilor „inbred” A. Balb/c și C57Bl/Gif.

Dintre metodele aplicate în experiențele noastre, tehnica descrisă de Fox și Zeiss (6) s-a dovedit a fi mai bună. Principiul metodei, cu unele modificări personale necesare, le descriem mai jos.

1. — Șoarecele (cca. 30 gr.) este injectat i. p. cu 0,3—0,5 ml colchicină 0,025% (Alkaloida Chem. Fact. Co. LTD. Bp.).

2. — După 1 oră animalul este sacrificat și femurii sunt goliți de măduvă prin spălarea lor cu 2—3 ml citrat de sodiu 0,95%. Se barbotează cu o pipetă Pasteur pentru ca celulele să se dezlipească una de alta. Celulele timice și splenice sunt separate prin tripsinizare. După tripsinizare celulele sunt spălate cu ser fiziologic și resuspendate în soluție de hipotonizare.

3. — Hipotonizarea celulelor în citrat de sodiu 0,95% la 37° C timp de 20 minute.

4. — Centrifugare 600—1000 ture/minut, timp de 5—10 minute.

5. — Supernatantul se decantează, iar sedimentul se fixează în alcool absolut și acid acetic glacial (3:1) timp de 5 minute. Soluția fixatoare se toarnă cu precauție asupra sedimentului de pe fundul tubului de centrifugă pentru ca stratul celular să nu se dezintegreze.

6. — Schimbarea soluției fixatoare și postfixare la 4° C timp de 1 oră.

7. — După îndepărtarea fixatorului adăugăm preparatului acid acetic 45% păstrându-l la 4° C timp de 18—24 ore.

8. — Inlocuirea acidului acetic 45% cu acid acetic răcit 60%, la 4° C timp de 1 oră, după care sedimentul celular se resuspendă în 2—3 ml acid acetic 60%.

9. — Etalarea a 1—3 picături din suspensie pe o lamă răcită, în momentul când pe suprafața lamei se formează un strat de condensare.

10. — Uscarea preparatului la temperatura camerei într-un curent de aer cald, sau la flacăra unui bec Bunsen, în funcție de originea celulelor.

11. — Colorarea cu o soluție de orceină 2% dizolvată în acid acetic 40—60% (7).

O cerință importantă pentru reușita tehnicii este, ca după etalarea pe lamă a celulelor, în funcție de proveniența lor, uscarca să se facă în mod diferențiat.

Astfel celulele de origine medulară sînt uscate sub acțiunea unui curent de aer cald sau pot fi lăsate să se usuce fără nici-un control, la temperatura camerei. Celulele splenice necesită o încălzire suplimentară la flacăra unui bec Bunsen.

Orceina acetică folosită pentru colorarea cromozomilor să fie de preferință sintetică. După colorare cu orceină acetică, se poate efectua o virare în apă de robinet pentru ca culoarea roșie-violetă a orceinei să se transforme în albastră.

Se recomandă ca fotografierea preparatelor să se facă cu obiectivul uscat și cu un ocular 16x sau 20x, obținindu-se astfel imagini clare care pot fi mărite în vederea alcătuirii cariogramelor cromozomice.

Sosit la redacție: 8 mai 1964.

Bibliografie

1. HAUSCHKA, T. S.: Cancer, Res. (1961), 21, 957; 2. DYER, A. T.: Stain Technology (1963), 82, 85 3; 3. CARATZALI, A., PRICATAN S.: Studii Cercet. Endocrin (1962), 13, 383, 4. TYIO J. H., WHANG J.: Stain Technology (1962), 37, 17; 5. JUNGKLASS F. K. Dtsch. Med. Wschr. (1963), 88, 102; 6. FOX M. ZEISS T. M.: Nature, (1961), 192, 1213; 7. LA COUR, L.: Stain Technology, (1941) 16, 169.