

MAGDALENA ŚWIDERSKA, WŁODZIMIERZ M. STALZMANN

## Adaptacja metody hodowli leukocytów krwi obwodowej do oceny kariotypu kury

Z Zakładu Biologii Hodowlanej Centralnego Ośrodka Badawczo-Rozwojowego Drobniarstwa w Poznaniu

Z Zakładu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Prace nad ustaleniem kariotypów ptaków stały się podstawą do cytogenetycznej charakterystyki każdego ich gatunku i określenia polimorfizmu wewnątrzgatunkowego, jak również do identyfikowania odmian mieszańcowych nieznanego pochodzenia (1, 2, 5, 9, 11, 14).

Badania cytogenetyczne pozwalają ponadto na wykrycie aberracji chromosomowych, wiążących się z występowaniem zaburzeń rozwoju i niektórych wad wrodzonych oraz ze zmianą podatności lub odporności na różne choroby (2, 3). Szczególnie przydatnymi okazują się badania cytogenetyczne w wyjaśnianiu przyczyn śmiertelności zarodków we wczesnych okresach rozwoju embrionalnego, zamierania piskląt w pierwszych dniach po wylęgu (1, 2, 3, 6) oraz zaburzeń różnicowania płci osobników, prowadzących do powstania różnych stopni interseksualizmu, warunkującego nie tylko zdolność reprodukcyjną osobników, ale również występowanie korzystnych lub niekorzystnych cech użytkowych.

Na etapie obecnie prowadzonych prac hodowlanych badania cytogenetyczne mogą mieć praktyczne zastosowanie przy udoskonalaniu, a nawet tworzeniu nowych odmian o pożądanych dla produkcji cechach reprodukcyjnych i użytkowych.

### Technika hodowli

Jako wstępny etap do właściwych badań cytogenetycznych opracowano metodę hodowli leukocytów w oparciu o doniesienia wielu autorów (4, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 16).

Krew do hodowli pobierano z żyły skrzydłowej kurcząt w wieku 8 tygodni. Ogółem wykonano 32 doświadczenia i założono około 200 hodowli leukocytów.

W oparciu o przeprowadzone badania opracowano następujący optymalny schemat hodowli leukocytów kur *in vitro*:

1. Pobranie od jednego osobnika 10 ml krwi do heparynizowanej strzykawki (0,2 ml heparyny bez dodatków konserwujących 500 j/ml).

2. Przeniesienie krwi do jałowych naczyń zawierających po 0,2 ml PHA-M.

3. Dokładne wymieszanie i pozostawienie próby z krwią przez 10—15 min. w celu przyspieszenia aglutynacji erytrocytów.

4. Wirowanie krwi przy 300—500 rpm przez 10—20 min.

5. Zebranie osocza zawierającego leukocyty (liczba leukocytów w 1 ml powinna wynosić 1,5—2 milionów).

6. Dowirowanie prób z krwią przy 1000 rpm przez 5 min. w celu uzyskania surowicy własnej.

7. Przeniesienie leukocytów do medium o następującym składzie:

osocze antologiczne	15%
surowica własna	15%
L-Glutamina	10%
płyn Parkera	60%
kanamycyna	0,03 ml na ml medium
PHA-P	0,01 ml na ml medium

8. Doprowadzenie pH medium do 6,8—7,2 używając roztworu 1N HCl lub 5% mieszaniny CO<sub>2</sub> z powietrzem.

9. Przyniesienie 10 ml medium hodowlanego do jałowych naczyń o pojemności 25 ml i szczelne zamknięcie korkami gumowymi.

10. Inkubowanie założonych hodowli przez 48 do 72 godz. w cieplarni, w temperaturze 38°C (±1°C).

11. Dodanie 10—50 µg kolcemidu w objętości 0,2—0,5 ml/4 ml medium na 3 godz. przed zakończeniem okresu inkubacji.

12. Przeniesienie hodowli leukocytów do probówek wirówkowych i zwirowanie przy 1000 rpm przez 5 min.

13. Odrzucenie supernatantu.

14. Dodanie 0,45% roztworu cytrynianu sodu (5—7 ml) i inkubowanie przez 15 min. w cieplarni, w temperaturze 37°C.

15. Wirowanie prób przy 1000 rpm przez 5 min.

16. Utrwalenie komórek mieszaniną kwasu octowego lodowatego i metanolu 1:3 przez okres 30 min. w temperaturze 4°C (utrwalenie powtórzyć 2—3-krotnie).

17. Zwirowanie próby przy 1000 rpm przez 5 min.

18. Odrzucenie supernatantu.

19. Dodanie 1—5 kropli świeżego utrwalacza i dobre wymieszanie osadu.

20. Rozłożenie zawiesiny komórek na odtłuszczone szkiełka podstawowe i suszenie na powietrzu.

21. Wstępna ocena preparatów przy użyciu fazokontrastu.

22. Barwienie preparatów z dużą ilością dobrze rozproszonych mitoz barwnikiem Giemzy, kwaśną orceiną, hematoksyliną żelazistą lub fuksyną karbolową.

23. Przykrycie szkiełkami nakrywkowymi preparatów przeznaczonych do fotografowania, montując je balsamem kanadyjskim.

Stosując opisaną metodę uzyskano w połowie założonych hodowli preparaty nadające się do oceny kariotypu *Gallus domesticus*. Chromosomy sklasyfikowano oceniając ich całkowitą długość i lokalizację centromerów (ryc. 1 i 2).

Przy ocenie kariotypów przyjęto system klasyfikacji według Schoffnera (13).

W płytkach metafazalnych łatwo wyróżnia się 9 par makrochromosomów, w tym 8 par autosomów i 1 parę chromosomów płciowych.

Grupa A — 1 i 2 para, duże chromosomy metacentryczne.

Grupa B — 3 para, średnie chromosomy akrocentryczne.

Grupa C — 4 para, średnie chromosomy submetacentryczne.

Grupa D — 5 para, chromosomy płci ZZ i ZW, średnie chromosomy metacentryczne.

Grupa E — 6 i 7 para, małe chromosomy akrocentryczne.

Grupa F — 8 i 9 para, chromosomy metacentryczne, trudne do rozróżnienia.

Grupa G — 10—39 para, mikrochromosomy (ze względu na wielkość trudno je sklasyfikować).

W przeprowadzonych doświadczeniach przebadano szereg odczynników i pożywek, badając ich przydatność w badaniach cytogenetycznych u kur.

Heparyna — stosowano heparynę „Polfa” (przygotowaną w pracowni przez rozpuszczenie heparyny *in substantia* w jałowym 0,9% chlorku sodowym, następnie sterylizowaną drogą sączenia przez filtry Seitz) w stężeniu 100 j./ml krwi. Wyższe stężenia powodowały zaburzenia wzrostu komórek aż do całkowitego zahamowania proliferacji i wystąpienia toksycznych zmian w komórkach.

Jako medium hodowlane stosowano płyn Parkera (medium 199) produkcji Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek. Płyn Parkera wzbogacano autologiczną surowicą kurzą, bądź też autologicznym osoczem kurzym w ilości 25—30% oraz L-glutaminą 0,3 mg/ml. Medium to stanowiło najodpowiedniejszą pożywkę, w której uzyskiwano najwyższe indeksy mitotyczne hodowanych leukocytów (1,6—2%/godz. kolcemidu). Stosując płyn Hanksa lub płyn Parkera bez glutaminy uzyskiwano hodowle o niższym indeksie mitotycznych, wskutek tego trudniejsze do oceny kariotypu.

Jako osłonę antybiotykową stosowano kanamycynę w dawce 30 µg/ml hodowli. Dobre wyniki uzyskiwano również stosując penicylinę 100 j./ml i streptomycynę 1 µg/ml. Przy tej osłonie antybiotykowej zakażenia hodowli zdarzały się sporadycznie i nie przekraczały 1%.

Stymulacji mitoz dokonywano następującymi preparatami mitogennymi:

- fazeoliną (otrzymywaną w Zakładzie według metody podanej przez Razavi'ego (12),
- PH-P (Difco),
- PHA (Wellcome).

Z wymienionych stymulatorów najlepsze wyniki w przeliczeniu na godzinę inkubacji z kolcemidem uzyskiwano przy użyciu PHA-P (2,3%) oraz PHA „Wellcome” (1,28%). Hodowle stymulowane fazeoliną wykazywały bardzo niskie indeksy mitotyczne (0,35—0,5%/godz. kolcemidu). We wszystkich doświadczeniach stosowano kolcemid (Ciba) w stężeniu 0,2—5,0 µg/ml. Kolcemid stosowano w różnych okresach czasu, w przedziale od 1—4 godz. Z naszych obserwacji wynika, że wystarczającą liczbę podziałów uzyskuje się już po 2 godz. działania preparatu. Średnie wartości indeksów mitotycznych zamykały się w granicach 1,6—2,3%/godz. kolcemidu. Indeksy mitotyczne po upływie 4 godz. były o 54% niższe i wynosiły średnio 0,41%/godz. kolcemidu. Stosowanie dłuższych okresów inkubacji powodowało zle rozproszenie i brak wyrazistości figur podziałowych. Podobny efekt zle rozproszenia chromosomów jak również znacznego ich obkurczenia występował pod wpływem zwiększonego stężenia kolcemidu (5 µg/ml).

Wprowadzono również szereg odmian kończenia hodowli zmieniając roztwory hipotoniczne i utrwalacze. Przetestowano następujące roztwory hipotoniczne: chlorek potasu 0,075 M, cytrynian sodu 0,45%, surowicę własną z wodą destylowaną w stosunku 1:7 oraz medium hodowlane również rozcieńczone wodą destylowaną w stosunku 1:7. Najlepsze efekty rozproszenia chromosomów uzyskano stosując 0,45% cytrynian sodu. W wyniku stosowania pozostałych roztworów hipotonicznych obserwowano gorsze rozproszenie chromosomów. Jest to zgodne z poprzednimi doniesieniami stosowania roztworów hipotonicznych w hodowlach limfocytów drobiu (9, 10, 13, 14).

#### Ocena przydatności hodowli leukocytów do badań chromosomów ptasich

Hodowlę można uznać za przydatną do analizy garnituru chromosomowego, jeżeli w preparatach można znaleźć około 50 dobrze rozproszonych figur podziałowych, w których

szczegóły budowy chromosomów są wystarczająco wyraźne (15, 16).

Wartości indeksów mitotycznych uzyskiwane w przeprowadzonych doświadczeniach wahały się w granicach 1,6—2,3%/godz. kolcemidu, co odpowiada średnim wartościom indeksu mitotycznego leukocytów w hodowlach krwi człowieka (15). Wartości te odpowiadają wyżej wymienionym wymogom i są wystarczające do przeprowadzenia analizy chromosomów.

W hodowlach, w których indeks mitotyczny jest niższy niż 1%/godz. kolcemidu, występuje bardzo mało mitoz i są one z reguły słabo rozproszone, tak, że ocena kariotypu jest utrudniona lub wręcz niemożliwa. Należy w takim przypadku hodowlę powtórzyć.

Stwierdzono również, że mimo stosowania standardowych warunków doświadczalnych uzyskuje się zmienne wartości indeksów mitotycznych dla hodowli kończonych w tym samym czasie. Spowodowane jest to szeregiem czynników związanych z przeprowadzeniem hodowli, jak i osobniczo zmienną kinetyką oddziaływania komórek na PHA. Szczyt mitotyczny przypada w hodowlach leukocytów kur między 48—72 godz. hodowli (10, 14, 16). W większości przypadków najlepsze wyniki uzyskiwano kończąc hodowlę w 48 godz. Niemniej jednak w niektórych wypadkach wskazane jest kończenie hodowli zarówno w 48 jak i 72 godz., celem uchwycenia opóźnionego szczytu mitotycznego. W szeroko zakrojonych badaniach cytogenetycznych można jako regułę sugerować kończenie hodowli w tych dwóch terminach, co z jednej strony pozwala na uzyskanie odpowiednich wartości indeksów mitotycznych dla hodowli w wypadku przesunięcia się szczytu mitotycznego, z drugiej zaś strony stanowi dodatkowe zabezpieczenie w przypadku niepowodzenia hodowli kończonej w pierwszym terminie.

#### Piśmiennictwo

- Bloom S. E.: Chromosoma 28, 357, 1969.
- Bloom S. E.: Chromosoma 37, 309, 1972.
- Bolom S. E.: J. Hered. 3, 186, 1971.
- Borgaonkar D. S.: Poult. Sci. 48, 331, 1969.
- Hutt F. B.: Heredity 15, 97, 1960.
- Jaap R. G.: Proc. Abstr. XV World's Poult. Congress, New Orleans 313, 1974.
- Krishan A.: Experimentia 18, 100, 1962.
- Krishan A., Shoffner R. N.: Cytogenetics 5, 53, 1966.
- Moorhead P. S.: Exp. Cell Res. 20, 613, 1960.
- Newcomer E. H.: Stain Technol. 38, 54, 1963.
- Owen J. J.: Chromosoma 16, 601, 1965.
- Razavi L.: Proc. Exp. Biol. Med. 118, 717, 1965.
- Shoffner R. N.: Poult. Sci. 45, 333, 1966.
- Shoffner R. N.: Poult. Sci. Meeting, 1969.
- Steffen J.: Postępy Hig. Med. Dośw. 20, 485, 1966.
- Zartman D. L.: Cytogenet. Cell Genet. 12, 136, 1973.

Adres autora: mgr inż. Magdalena Swiderska, ul. Rawicka 47, 60-113 Poznań.

Autorzy wyrażają podziękowanie pani Krystynie Łabaj za pomoc techniczną przy wykonywaniu doświadczeń.

Съведърска М., Стальцманн В. М. — Адаптация метода культуры лейкоцитов периферической крови для оценки кариотипа курицы.

Установили, что метод культуры лейкоцитов периферической крови можно применять для оценки кариотипа курицы. Величины митотических индексов, установленные в проведенных исследованиях колебались в пределах 1,6—2,3%/час коллемеида,

что отвечает средним величинам митотического индекса лейкоцитов в культурах крови человека. Эти величины являются достаточными для проведения анализа хромосом и идентификации хромосомовых aberrаций.

Swiderska M., Stalzman W. M. — *Adaptation of peripheral blood leukocyte culture technique for hen karyotype analysis.*

Peripheral blood leukocyte culture technique can be fully adapted for hen karyotype analysis. The value of mitotic indices obtained in the experiments was 1.6—2.3%/hr, calcemide. These values corresponded to the mean values of mitotic indices of leukocytes in human blood cultures. The obtained values suffice for analysis of chromosomes and studies on chromosome aberrations.

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JÓZEF ROMANIUK

### Badania nad występowaniem torbielowatości jajników u krów w gospodarstwach wielkostatdnych

Z Zakładu Fizjopatologii Rozrodu i Inseminacji Instytutu Weterynarii Oddział w Bydgoszczy

Zaburzeniem reprodukcyjnym, które stanowi jedną z częstych przyczyn niepłodności krów mlecznych i którego występowanie uwarunkowane jest zarówno dyspozycją dziedziczną jak również i czynnikami zewnętrznymi są torbiele jajnikowe (1, 9, 21). Panujące u nas „warunki hodowlane” — a mianowicie intensywna selekcja zmierzająca do poprawy dzielności użytkowej krów, przy nie zawsze nadążającej poprawie warunków żywieniowych, stwarzają sytuację wzmożonej podatności na zachorowania.

W poprzednich naszych wieloletnich badaniach (20) przeprowadzonych w 6 oborach wielkostatdnych wykazaliśmy, że schorzenie to występowało średnio po 13,1% wycieleń, a w niektórych gospodarstwach wskaźnik ten był bliski 17%. Częstotliwość występowania torbielowatości jajników uwarunkowana była tylko w nieznacznym stopniu wysokością produkcji mlecznej, natomiast istotną rolę odgrywało żywienie i warunki środowiskowe. Przeprowadzone badania wykazały również, że w obserwowanym pogłowie w okresie 10 letnich obserwacji dało się zauważyć zwiększenie zachorowalności na torbielowatość jajników niewspółmierne do zwiększenia wydajności mlecznej krów. Fakt ten skłonił nas do kontynuowania badań nad występowaniem torbielowatości jajników u krów przez okres następnych 5-ciu lat. Badaniami tymi postanowiliśmy objąć znacznie większy i bardziej zróżnicowany pod względem wydajności mlecznej materiał zwierzęcy.

#### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 2198 krowach rasy nebr rozmieszczonych w 10 oborach należących do gospo-

darstw uspołecznionych. Zwierzęta te były pod nadzorem autora przez okres od 4—14 lat. Weterynaryjna opieka nad rozrodem polegała na comiesięcznej kontroli reprodukcji w oborach, w czasie której przeprowadzono badanie na ciążę, badanie narządów rozrodczych krów podejrzanych o niepłodność oraz leczenie sztuk niepłodnych. Niezależnie od tego prowadzono systematyczne leczenie zaburzeń układu rozrodczego w okresie poporodowym. Obserwacje objęły łącznie 6463 cykle rozrodcze.

Diagnozę schorzenia ustalano na podstawie badania zewnętrznego i wewnętrznego narządów rodnych oraz zachowania płciowego krowy. Za krowę dotkniętą torbielowatością uznawano taką, u której stwierdzano na jednym lub obu jajnikach obecność torbieli przy równoczesnej atonii macicy oraz zaburzeniach cyklu płciowego w postaci stałego popędu płciowego, występowanie rui w nieregularnych odstępach czasu lub całkowitym braku popędu płciowego. Zwracano także uwagę na takie objawy jak zwiotczenie więzadeł krzyżowo-kolcowo-guzowych, fajkowate odsadzenie nasady ogona oraz charakterystyczny wpływ z dróg rodnych w postaci silnie opalizującego śluzu.

W analizie wyników przeprowadzonych badań nie uwzględniano podziału torbieli na pęcherzykowe, luteinowe oraz ciała żółtego.

#### Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania wykazały, że w kontrolowanym pogłowie torbielowatość jajników była zjawiskiem dość częstym. W grupie 2198 krów poddanych wieloletniej obserwacji 667 (30,3%) sztuk wykazało to zaburzenie reprodukcyjne, z tego 533 sztuki jeden raz, 108 — dwa razy, 23 — trzy razy i 3 krowy 4-ro krotnie wykazały to schorzenie w okresie swego życia. Wskaźnik krów, u których zdiagnozowano torbielowatość jajników kształtował się różnie w poszczególnych oborach — od 15,6% w oborze A do 46,7% w oborze F. W omawianej grupie krów torbiele jajnikowe wystąpiły