

11. Kaszubkiewicz Cz.: Medycyna Wet. 21, 668, 1965.
12. Kaszubkiewicz Cz.: Medycyna Wet. 20, 16, 1964.
13. Mach Z.: Roczn. nauk Zoot. 1, 25, 1974.
14. Michalska Z., Michalski Z.: Biuletyn V Zjazdu PTNW Olsztyn 1974, 346.
15. Stachura J.: Pat. Pol. 2, 277, 1971.
16. Stachura J., Pearse A. G. E.: Virchows Arch. 5, 173, 1970.
17. Szuperski T.: Medycyna Wet. 32, 364, 1976.

Adres autora: dr Tadeusz Rotkiewicz, ul. M. Gotowca 41/4, 10-001 Olsztyn.

Роткевич Т., Шапек Ю. — Гистохимические исследования щитовидных желез различных пород свиней.

Микроскопические исследования касались щитовидных желез свиней пород: пьетрен, крупной белой польской, польской белой длинноухой и злотницкой пестрой, весом 115 кг, кормленных одинаковыми видами корма и пребывающих в тех самых условиях содержания.

Обнаружили, что щитовидные железы свиней пород пьетрен, крупной белой польской отличаются наличием пузырьков малого объема и со средне высоким эпителием, а также наличием коллоида, богатого иодом, щитовидные же железы свиней пород

польской белой длинноухой и злотницкой пестрой обладают многочисленными пузырьками крупного объема и с коллоидом, бедным иодом.

Клетки С у свиней породы пьетрен и крупной белой польской, обнаруживаемые методом серебрения по Примелиусу, обладают многими аргирофильными грануляциями.

Rotkiewicz T., Szarek J. — Histochemical examinations of the thyroidea of pigs of different breeds.

Microscopic examinations concerned the thyroids derived from pigs of Pietrain, Large-White Polish, Polish-White and Złotnicka Spotted breeds, 115 kg of body weight, fed the same kinds of fodder and maintained under similar condition. It was found that the thyroids of Pietrain and Large-White Polish breeds possessed the vesicles of small volume, an average height of the epithelium and the colloid with a lot of iodine. Instead the thyroids of Polish-White breed and Złotnicka Spotted breed had many large vesicles with the colloid of poor concentration of iodine. C cells of Pietrain and Polish-Large-White breed had many argyrophilic granules revealed by means of Grimelius' staining technique.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Zastosowanie techniki przechowywania hodowli komórkowych i tkankowych w stanie zamrożenia

Z Zakładu Wirusologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Infekcyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

W wielu dyscyplinach biologicznych i medycznych istotne znaczenie odgrywają techniki, polegające na zastosowaniu bardzo niskich temperatur oraz przechowywaniu materiału biologicznego w stanie zamrożenia.

Zagadnieniami naukowego zastosowania niskich temperatur zajmują się:

1) kriogenika, tj. technika wytwarzania i utrzymywania bardzo niskich temperatur,

2) kriobiologia, tj. nauka zajmująca się przechowywaniem żywego materiału komórkowego w niskich temperaturach, co powstrzymuje jego starzenie się i hamuje procesy życiowe komórek, z możliwością przywrócenia im pełnej żywotności w stosunkowo krótkim czasie.

Stosowanie technik mrozeniowych posiada szczególne znaczenie w laboratoriach wirusologicznych, w których podstawowa praca oparta jest na namnażaniu wirusów w hodowlach komórkowych i tkankowych. Możliwość przypadkowych zakażeń laboratoryjnych oraz występowanie mutacji genetycznych związanych ze stałym pasażowaniem komórek *in vitro*, stwarza konieczność posiadania w laboratorium własnego banku tkanek, który umożliwia w dowolnym czasie odtworzenie utraconej hodowli.

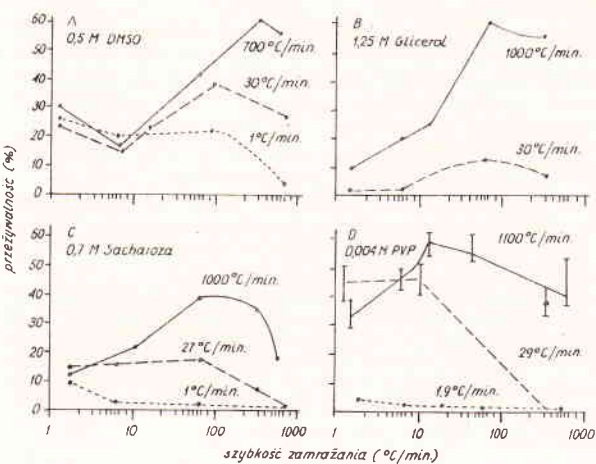
W niniejszej pracy szczególny nacisk położono na przedstawienie techniki zamrażania hodowli komórkowych i tkankowych. Opanowanie wymienionej techniki, jak również posiadanie odpowiedniej jakości pojemników do transportu i przechowywania ciekłych gazów oraz zamrażania w nich hodowli, stanowi podstawę do założenia własnego banku tkanek.

Niskie temperatury stosowane do przechowywania hodowli komórkowych i tkankowych otrzymuje się przez użycie ciekłego azotu (punkt wrzenia = $-195,8^{\circ}\text{C}$; punkt topnienia = -210°C). Ciekły azot jest płynem bezbarwnym, bezwonny, nietoksycznym i niepalnym. Należy do najczęściej stosowanych kriogenów i służy nie tylko do zamrażania hodowli, ale i innych materiałów biologicznych (1, 6, 7, 11, 12, 16).

Zamrażanie i odmrażanie hodowli komórkowych i tkankowych może doprowadzić do uszkodzeń komórek zamrażanych hodowli. Niepożądanym efektem zamrażania i odmrażania hodowli można zapobiec lub znacznie je zmniejszyć, dzięki zastosowaniu dobranych drogą doświadczalną, najlepszych dla danej hodowli czynników ochraniających komórki przed skutkami zamrożenia (10). Obniżenie temperatury powoduje podwyższenie stężenia wewnątrz — komórkowych elektrolitów, co wpływa niszczaco na RNA, DNA oraz denaturuje białka i polipeptydy.

Czynniki ochraniające obniżają stężenie elektrolitów, zmniejszają odwodnienie komórek, zapobiegając tworzeniu się kryształów lodu, jak również stabilizują makrocząsteczki, przede wszystkim w błonie komórkowej. Dzielą się one na wnikaające i nie wnikaające

do komórek. Do wnikających należą: glicerol i dwumetylosulfotlenek (DMSO). Mniejsze zastosowanie mają czynniki nie wnikające, np. poliwinylpyrolidon (PVP), poliglikol, dextran, sorbitol, mannitol, laktoza, glukoza i sacharoza.



Ryc. 1. Przeżywalność komórek chomika chińskiego jako funkcja typu czynników ochraniających oraz szybkości zamrażania i odmrażania, wg Mazura (10)

Tab. 1. Przeżywalność komórek chomika chińskiego zamrażanych powoli w buforowanym roztworze soli Hanksa, zawierającym różne czynniki ochraniające, wg Mazura (10)

Czynniki ochraniające	Procent przeżycia po zamrożeniu *	
	1,6°C/min.	8°C/min.
0,5 M glicerol	2	5
1,25 M glicerol	10	20
0,35 M sacharoza	18	25
0,5 M DMSO	30	18
0,004 M PVP	32	45

Objaśnienie: * — Procentowa zależność pomiędzy liczbą żywych komórek w zamrożonej zawieszynie a liczbą żywych komórek w niezamrożonej kontroli.

Na ryc. 1 i w tab. 1 przedstawiono przykładowo przeżywalność komórek chomika chińskiego po zamrożeniu w obecności różnych czynników ochraniających.

Dokładny schemat zamrażania i odmrażania hodowli komórkowych i tkankowych opisano poniżej.

Zamrażanie hodowli komórkowych i tkankowych:

- 1) hodowle komórek linii ciągłych trypsynować w stacjonarnej fazie wzrostu,
- 2) wirować przez 10 min. przy 1000 obr./min.,
- 3) przygotować zawieszinę komórek w płynie namnażającym tak, aby ich liczba wynosiła od 2×10⁶ do 5×10⁶ komórek w 1 ml płynu.

Liczbę komórek określić wg wzoru:

$$\frac{a \times 10\,000}{9}$$

gdzie: a = liczba komórek oznaczona w komorze Bürkera. Procent żywych komórek obliczyć barwiąc je przyżyciowo 0,5% roztworem wodnym błękitu trypanu,

- 4) przygotowaną zawieszinę komórek dokładnie wymieszać, dodać 10 do 15% jałowego glicerolu lub DMSO i ponownie dobrze wymieszać, po czym pozostawić zawieszinę przez 30 minut w temperaturze pokojowej,

- 5) zawieszinę komórek z czynnikiem ochraniającym rozlać po 2 ml pipetą lub strzykawką do 5 ml ampulek, które zamknąć przez zatopienie w płomieniu palnika górnej części ampulki,
- 6) ampułki z hodowlą przechowywać w alkoholu przez 12–18 godzin w temperaturze +4°C,
- 7) następnie hodowle w ampulkach zamrozić w łaźni lodowej w mieszaninie acetonu i suchego lodu, obniżając temperaturę w łaźni o 1°C/min.,
- 8) po osiągnięciu temperatury –25°C ampułki szybko przenieść do metalowego pojemnika umieszczonego w kontenerze z ciekłym azotem; co kilka dni sprawdzać ubytek ciekłego azotu z kontenera,
- 9) do każdej ampulki z hodowlą dołączyć numer identyfikacyjny, pozwalający odszukać w dzienniku dane charakteryzujące zamrożoną hodowlę, tj. datę zamrożenia, skład podłoża namnażającego i technikę zamrażania, jak również liczbę ampulek z zamrożoną hodowlą.

Odmrażanie hodowli komórkowych i tkankowych:

- 1) po ostrożnym wyjęciu ampulki z zamrożoną hodowlą z pojemnika (wyjmować w okularach i rękawicach ochronnych!) komórki szybko odmrozić, przenosząc ampulki na okres około 3 minut do łaźni wodnej zawierającej wodę o temperaturze +40°C,
- 2) po odmrożeniu hodowlę wyciągnąć strzykawką z tępą igłą do butelki Legroux i bardzo powoli, kroplami, wpuścić do niej płyn namnażający,
- 3) butelkę Legroux z hodowlą wstawić do termostatu o temperaturze 37°C i po 24 godzinach zmienić płyn namnażający w celu usunięcia martwych komórek i czynnika ochraniającego,
- 4) po 2–3-krotnym pasażowaniu odmrożonej hodowli odzyskuje ona w pełni swoją vitalność.

Techniki przechowywania hodowli komórkowych i tkankowych w stanie zamrożenia, jak również związane z tym problemy, zostały opisane przez licznych autorów (2, 4, 9, 13, 15). W swoich pracach poruszają oni tak istotne zagadnienia, jak przeżywalność, żywotność i stabilność genetyczną różnych hodowli komórkowych pierwotnych i ciągłych oraz wrażliwość uprzednio zamrożonych hodowli na różne wirusy.

Stwierdzono, że przechowywanie komórek linii ciągłych w stanie zamrożenia nie wpływa na zmianę ich wrażliwości na wirus, na który były wrażliwe przed



Ryc. 2. Pojemnik do transportu i przechowywania ciekłego azotu, typ LD-25-N o pojemności 25 l

zamrożeniem, co potwierdzają doświadczenia własne, jak i innych autorów (3, 14).

Wykazano również, że pierwotne hodowle posiadają wysoką wrażliwość na zamrażanie i przeżywają odmrażanie w niewielkim tylko stopniu lub całkowicie obumierają.

Zauważono, że komórki uprzednio zamrożone, degenerują szybciej pod wpływem wirusa niż komórki nie zamrożone, co może być związane z większą po-

datnością błony komórek na przenikanie wirusa do wnętrza komórki i związaną z tym wcześniejszą replikacją wirusa (3).

Zaobserwowano lepsze działanie ochronne wobec hodowli HeLa i L (fibroblasty myszy) 10% roztworu DMSO niż glicerolu, co zapewniało przeżywalność od 84–93% zamrożonych komórek (5).

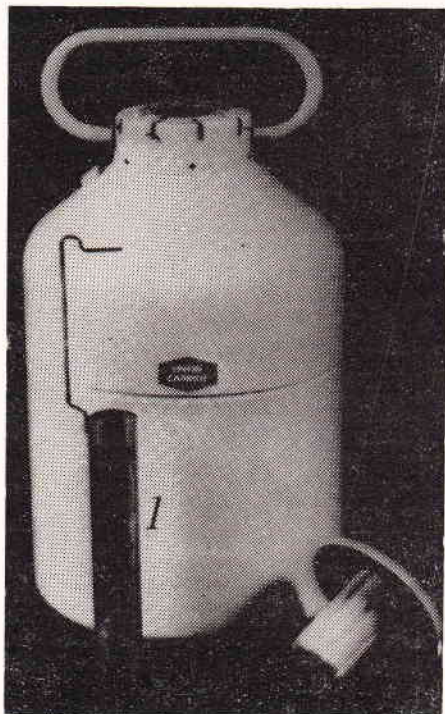
Przeprowadzenie opisanego w tekście zamrażania materiału biologicznego i związane z tym utworzenie banku tkanek możliwe jest tylko w przypadku posiadania dobrej jakości naczyń Dewara, służących do transportu i przechowywania skroplonych gazów.

W powszechnym użyciu znajdują się pojemniki produkowane przez firmę Union Carbide.

1) do transportu i przechowywania ciekłych gazów, np. LD-25-N o pojemności 25 l (ryc. 2),

2) do zamrażania w ciekłym azocie, np. LR-19 o pojemności 18,43 l (ryc. 3).

W Polsce technikami mrozeniowymi zajmuje się Zakład Niskich Temperatur Centralnego Ośrodka Techniki Medycznej w Warszawie, który wytwarza m.in. urządzenia do kontrolowanego zamrażania w ciekłym azocie materiału biologicznego, zestawy do kriochirurgii, wyposażenia banków krwi oraz mikrotomy chłodzone ciekłym azotem (8).



Ryc. 3. Pojemnik do zamrażania w ciekłym azocie, typ LR-19 o pojemności 18,45 l. 1 — metalowe naczynie do przechowywania ampulek z zamrożonym materiałem biologicznym

Pismienictwo

1. Araki T.: Cryobiology, 14, 144, 1977.
2. Ashwood-Smith M. J.: Nature, 190, 1204, 1961.
3. Chądzyński R., Polna J.: Med. dośw., 22, 179, 1970.
4. Dougherty R. M.: Nature, 193, 550, 1962.
5. Daś D., Kopeć W.: Acta microb. pol., V, 22, 272, 1973.
6. French J. E., Flor W. J., Grisson M. P., Parker J. L., Sajko G., Ewald W. G.: Cryobiology, 14, 1, 1977.
7. Greiff D., Myers M.: Biochim. biophys. Acta, 78, 45, 1963.
8. Ilnicki K.: informacje ustne, 1978.
9. Lovelock K., Yamada M., Hirokawa J.: Jap. J. med. Sci. Biol., 14, 27, 1961.
10. Mazur P.: Science, 168, 3934, 939, 1970.
11. Meryman, H. T.: Cryobiology, Academic Press, New York, 1966.
12. Poige C., Smith A. U., Parker A. S.: Nature, 164, 666, 1949.
13. Polna J., Chądzyński R.: Expl. Med. Microbiol., 20, 402, 1968.
14. Rinfert A. P.: Fedn. Proc., 22, 94, 1963.
15. Smorąg Z.: Medycyna Wet. 32, 210, 1976.

Adres autora: mgr Marek Niemiałowski, ul. Ostrobramska 82 m. 19, 04-175 Warszawa.

HOLM J.: Badania zawartości ołowiu i kadmu w próbkach mięsa i narządów drobiu. (Untersuchungen auf den Gehalt an Blei und Cadmium in Fleisch- und Organproben von Geflügel einschliesslich Wassergeflügel). Fleischwirtschaft 58, 299, 1978.

Przeprowadzono badania zawartości ołowiu i kadmu w tkance mięśniowej, nerkach i wątrobach 51 indyków, 102 kaczek, 103 gęsi i porównano z zawartością wym. metali oznaczoną w okresie wcześniejszym u kurcząt. Kurczęta pochodziły z RFN, Holandii, Francji, Belgii i Danii a indyki, kaczki i gęsi z Polski i Węgier. W tkance mięśniowej indyków, kaczek i gęsi wykazano wyższą zawartość ołowiu i kadmu niż u kurcząt. W narządach wszystkich gatunków drobiu zawartość obu pierwiastków, a szczególnie kadmu w nerkach była wyższa niż w tkance mięśniowej. Zawartość ołowiu w nerkach kurcząt przekroczyła dopuszczalną wartość graniczną 0,5 ppm o 3,5%, kaczek o 4,9% i gęsi o 1%. Zawartość ołowiu w wątrobach kurcząt była o 5% a gęsi o 1,7% wyższa od dopuszczalnej. Poziom kadmu w nerkach drobiu był dużo wyższy od zawartości ołowiu. Ilość kadmu w nerkach kurcząt przekroczyła dopuszczalny limit 0,5 ppm o ok. 39%, indyków o 69%, kaczek o 72%, gęsi o 13%. W wątrobach kurcząt wykazano poziom kadmu o 20% a u gęsi o 17% wyższy od wartości granicznej.

a.a.

HECHT H.: Pierwiastki śladowe w przyprawach. 1. Pierwiastki toksyczne — ołów, kadm i rtęć. (Spurenelemente in Gewürzen. 1. Die toxischen Elemente Blei, Cadmium und Quecksilber). Fleischwirtschaft 58, 848, 1978.

Przeprowadzono badania zawartości ołowiu, kadmu i rtęci w 36 rodzajach ziół i przypraw stosowanych w przetwórstwie mięsnym. Badania wykazały dużo wyższą zawartość ołowiu i kadmu w przyprawach niż w mięsie. Tylko niewielka ilość przypraw i ziół może być stosowana w przemyśle mięsnym bez szkody dla zdrowia człowieka. Majeranek, tymianek, anyżek i papryka należą do przypraw o najwyższej zawartości pierwiastków toksycznych. Łuszczenie pieprzu nie powoduje istotnego spadku zawartości w nim ołowiu i kadmu.

a.a.

OBERDIECK R.: Związki zapachowe ziół i przypraw. Cz. I i II. (Die Aromastoffe der Gewürze und Würzkräuter (I und II)). Fleischwirtschaft 56, 949, 1976 (cz. I) i Fleischwirtschaft 58, 801, 1978 (cz. II).

W przeglądowym, bogato udokumentowanym artykule omawia autor historyczny rozwój badań nad związkami zapachowymi, fizjologię przypraw i biogenezę aromatycznych związków roślinnych ze szczególnym uwzględnieniem składników zapachowych owoców cytrusowych, związków odpowiedzialnych za pikantny smak i zapach imbiru i ziół rodzaju Capsicum.

a.a.