

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

ZDZISŁAW SMORAĞ

Stan badań nad zamrażaniem zarodków ssaków

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasielenia Zwierząt, Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa

Od uwieńczonej powodzeniem prób zamrażania zarodków mysich (40) oraz uzyskania pierwszego cielęcia po transplantacji mrożonego zarodka (43) upłynęło już ponad 10 lat. Badania przeprowadzone w ciągu tego okresu dostarczyły szeregu nowych informacji, pogłębiających znajomość zjawisk związanych z konserwacją zarodków ssaków w niskich temperaturach, a zainteresowanie omawianymi zagadnieniami znacznie wzrosło w ciągu ostatnich lat.

Celem niniejszego przeglądu jest przedstawienie aktualnego stanu badań, osiąganych wyników oraz nowych kierunków badawczych w zakresie zamrażania zarodków ssaków. Zagadnienia te zostaną omówione głównie w oparciu o doświadczenia przeprowadzone na zarodkach bydlęcych. W przeglądzie uwzględniono również badania przeprowadzone na zarodkach lub komórkach jajowych innych gatunków zwierząt, gdy dotyczyły one zagadnień nowych z punktu widzenia kriobiologii, mogących mieć znaczenie dla rozwoju metod zamrażania zarodków zwierząt gospodarskich, a zwłaszcza bydła.

Stosunkowo szeroki zakres doświadczeń nad zamrażaniem zarodków bydlęcych, bogate już informacje wynikające ze stosowania tej metody konserwacji zarodków w praktyce doprowadziły w ostatnich latach do szeregu nowych ustaleń metodycznych, dotyczących poszczególnych ogniw zamrażania zarodków tego gatunku.

Zacznijmy od krótkiej charakterystyki zamrażanego obiektu. Istnieje zgodność, że 7-dniowe zarodki bydlęce stanowią, z punktu widzenia zamrażania, optymalne stadium rozwoju zarodka. Należy jednak podkreślić, że osiągnięte stadium rozwoju zarodka powinno odpowiadać jego wiekowi, czyli powinny to być zarodki w stadium późnej moruli lub blastocysty. Równie istotny jest dobry stan morfologiczny zamrażanych zarodków. Wiadomo jednak, że obok zarodków ocenianych jako morfologicznie normalne, przynajmniej kilkanaście procent uzyskanych zarodków wykazuje zaburzenia rozwojowe, takie jak: niewbudowane blastomery, degeneracja części blastomerów itp. Cechą wspólną tych zarodków jest mniejsza, w stosunku do zarodków normalnych, ogólna liczba komórek. Prócz tego, jak wykazały badania Theron i wsp. (38), w czasie zamraża-

nia w blastocystie bydlęcej dochodzi do uszkodzenia od 10 do 80% komórek (przeciętnie 25%). Jest więc zrozumiałe, że stopień implantacji takich zarodków jest zdecydowanie niższy w porównaniu z zarodkami mrożonymi, ale ocenianymi jako morfologicznie normalne (12, 29). Dochodzi bowiem do zbyt dużej redukcji komórek zarodka, najpierw w wyniku zaburzeń w rozwoju, a następnie w trakcie ich zamrażania i rozmrażania. Takie wyjaśnienie potwierdzają wyniki badań nad zamrażaniem zarodków o eksperymentalnie zmniejszonej liczbie komórek (w wyniku cięcia zarodka na 2 lub 4 części) (7, 13). Obserwowany spadek przeżywania dzielonych zarodków jest, podobnie jak w przypadku zarodków z deformacjami morfologicznymi, nieproporcjonalnie większy niż po transplantacji „połówek” lub „ćwiartek” zarodków świeżych.

Pierwszym etapem postępowania zmierzającego do zamrożenia zarodka jest umieszczenie go w płynie zawierającym odpowiednią koncentrację związku osłaniającego. Potem dotychczasowe postępowanie polegało na stopniowym zwiększaniu koncentracji krioprotektora. Ostatnie obserwacje wykazały jednak, że dopuszczalne jest bezpośrednio umieszczenie zarodka w płynie zawierającym związek osłaniający w ilości wymaganej dla skutecznego zamrożenia (4, 13). Czas ekwilibracji w temperaturze pokojowej określony został dla glicerolu na 10 do 30 minut.

Przez szereg lat najczęściej stosowanym do zamrożenia zarodków ssaków związkiem osłaniającym był dwumetylosulfotlenek (DMSO). Ostatnio natomiast obserwuje się coraz powszechniejsze użycie glicerolu. Glicerol okazał się lepszym związkiem osłaniającym przy zamrożeniu 8-blastomerowych zarodków mysich (31), a kriomikroskopowe obserwacje Ralla i Polga (21) potwierdziły jego dobre właściwości osłaniające. Do zamrażania zarodków bydlęcych używa się glicerolu w stężeniu od 1 do 2 M, najczęściej 1,4 lub 1,5 M.

Choć glicerol jest obecnie coraz częściej stosowanym związkiem osłaniającym, należy podkreślić, że np. glikol etylenowy (w porównaniu z DMSO i glicerolem) okazał się zdecydowanie lepszym związkiem osłaniającym przy zamrażaniu zarodków owczych (37). Ze względu na potwierdzoną wielokrotnie niewrażliwość moruli i blastocyst bydlęcych na zmiany

termiczne w zakresie od temperatury pokojowej do kilku stopni poniżej 0°C, praktykuje się obecnie bezpośrednio przekładanie poddanych ekwilibracji zarodków z temperatury pokojowej do temperatury posiewania, czyli ok. -8°C (cyt. 13). Ten szczególony metodyczny, podobnie jak jednostopniowe dodawanie związku osłaniającego, wnoszą znaczne uproszczenia do procedury zamrażania. Jeszcze większe uproszczenie tego procesu wynikało z możliwości znacznego podwyższenia końcowej temperatury zamrażania z ok. -70°C do ok. -30°, -40°C. Badania przeprowadzone przez Willadsena (42) na zarodkach owczych wykazały bowiem, że możliwe jest ich zamrażanie do temperatur leżących w wym. zakresie, jeżeli zastosowane zostanie szybkie rozmrażanie. W kolejnych badaniach stwierdzono możliwość takiego zamrażania również dla zarodków innych gatunków zwierząt, jak mysz (31, 41) i bydło (5, 13, 31). Obecnie niemal powszechnie praktykuje się zamrażanie zarodków bydłych według tego uproszczonego programu, najczęściej do temp. -30 lub -35°C. Wydaje się, że ta ostatnia jest temperaturą optymalną (2).

Najczęściej stosowaną szybkością zamrażania jest szybkość utrzymująca się w granicach ok. 0,3°C/min. Zwiększenie tej szybkości do 1,0°C/min pozwala jeszcze na uzyskanie dość wysokiej przeżywalności zamrażanych zarodków (14).

Jak już wspomniano, warunkiem uzyskania wysokiej przeżywalności zarodków zamrażanych według opisanej procedury jest ich szybkie rozmrażanie. Osiąga się to na ogół przez umieszczenie ampułki lub słomki z zamrażanymi zarodkami w łaźni wodnej o temperaturze +37°C. Po rozmrożeniu niezbędnym zabiegiem jest usunięcie związku osłaniającego z komórek zamrażanego zarodka. Dla uniknięcia szoku osmotycznego, czynność ta była wykonywana stopniowo. Praktycznie oznaczało to przeniesienie zarodka poprzez kilka roztworów o zmniejszającej się koncentracji związku osłaniającego. Ten rygorystyczny wymóg stanowił znaczne utrudnienie w praktycznym stosowaniu mrożonych zarodków, wymagającym zarówno czasu jak i sprzętu i umiejętności manipulowania zarodkami. Zmianą metodyczną o istotnych konsekwencjach praktycznych jest wprowadzenie do rozmrożenia zarodków roztworu sacharozy. Sacharoza jest związkiem, który nie przenika do wnętrza komórki i może utrzymywać wysokie ciśnienie osmotyczne na zewnątrz komórki, podczas usuwania związku osłaniającego. Związek ten został po raz pierwszy użyty do jednostopniowego usuwania glicerolu z rozmrażanych czerwonych ciałek krwi przez Rowe i wsp. (cyt. 13). Następnie Leibo i Mazur (cyt. 13) oraz Kasai i wsp. (11) użyli sacharozy do rozmrażania zarodków mysich. Podobną procedurę usuwania związku osłaniającego z rozmrożonych 7-dnio-

wych zarodków bydłych zastosowali Renard i wsp. (20) oraz Leibo (15). Wymienieni autorzy zamrazali zarodki w słomkach, zawierających obok niewielkiej ilości płynu z zarodkiem, kilkakrotnie większą objętość roztworu sacharozy, odzielonej od płynu z zarodkiem niewielką bańką powietrza. Bezpośrednio po rozmrożeniu, przez wstrząśnięcie słomką, następuje zmieszanie tych dwu płynów, a zarodek dostaje się do środowiska zawierającego sacharozę, co pozwala na bezszokowe usunięcie związku osłaniającego z komórek zarodka. Odbywa się to bez otwierania słomki i pozwala na bezpośrednią transplantację zarodka. Możliwe jest również stosowanie powyższego sposobu usuwania związku osłaniającego w przypadku zarodków zamrażanych w ampulkach. Wówczas zarodek po wyjęciu z probówki należy umieścić w kropli roztworu zawierającym od 0,5 do 1,0 M sacharozy (13). Optymalna koncentracja sacharozy w roztworze do jednostopniowego usuwania glicerolu może być w pewnym stopniu uzależniona od jego stężenia w płynie do zamrażania (15, 17). Obserwacje Mery i wsp. (17) wykazały np., że 1,0 M roztwór sacharozy jest optymalny dla zarodków mysich zamrażanych w 1,0 M glicerolu. Należy nadmienić, że roztwór sacharozy okazał się skuteczny również przy jednostopniowym usuwaniu związku osłaniającego z rozmrażanych oocytów mysich (1).

Czynnikiem rozstrzygającym o wprowadzeniu zamrażania zarodków do praktyki, zwłaszcza praktyki transplantacji zarodków bydłych, jest uzyskiwana efektywność zamrażania. Stosując powolne zamrażanie i rozmrażanie oraz DMSO jako związek osłaniający uzyskiwano po transplantacji rozwój ok. 1/3 zamrożonych zarodków. Zastąpienie DMSO glicerolem i wprowadzenie skróconego programu zamrażania oraz szybkiego rozmrażania pozwoliło na podwyższenie efektywności zamrażania. Ocenia się, że zamrażając wyselekcjonowane zarodki, można uzyskać wynik tylko o 10% niższy od tego, jaki uzyskuje się transplantując zarodki świeże (cyt. 13). Wyniki, jakie uzyskano po transplantacji zarodków mrożonych w słomkach i jednostopniowym usuwaniu glicerolu przy użyciu sacharozy, również układają się na podobnym (10, 16, 25) lub tylko nieco niższym poziomie (15, Falge; inf. ustna). Tę dość zadowalającą efektywność zamrażania zarodków bydłych uzyskuje się na ogół w warunkach doświadczalnych lub półprodukcyjnych. Informacje jakie napływają z praktyki wskazują, że uzyskiwane wyniki są często niestabilne i na ogół niższe od przedstawionych powyżej.

Zastosowanie procedury zamrażania zbliżonej do tej, jaka jest stosowana przy zamrażaniu zarodków bydłych, umożliwiło uzyskanie w ostatnich latach potomstwa względnie cięży u kolejnych gatunków ssaków: kłaczy (30, 44),

antylopy (3), a także człowieka (39). W przypadku zamrażania zarodków klaczy uzyskiwane wyniki zamrażania są porównywalne z uzyskiwanymi przy zamrażaniu zarodków bydłych pod warunkiem, że zarodki przeznaczone do zamrażania znajdują się w stadium moruli lub wczesnej blastocysty (30, 36, 44).

W związku z dużym zainteresowaniem, jakie budzi przenoszenie „połówek” zarodków uzyskanych przez dzielenie morul czy blastocyst, pojawiła się potrzeba konserwacji takich zarodków. Wyniki, jakie dotychczas uzyskano stosując rutynowe metody zamrażania są jednak stosunkowo niskie (7, 13). Powody tego stanu rzeczy były już uprzednio dyskutowane.

Rozwój badań nad dojrzewaniem oocytów oraz zapłodnieniem *in vitro* wzbudził znaczne zainteresowanie opanowaniem metod zamrażania oocytów ssaków (1, 19). Natomiast możliwość użycia jaj chemicznych do oceny zdolności zapładniającej plemników ssaków, a zwłaszcza człowieka stworzyła potrzebę konserwacji komórek jajowych tego gatunku. Obecne metody zamrażania (20) pozwalają na przeżywanie ok. 50% jaj chemicznych poddanych zamrożeniu.

Z przedstawionego przeglądu wynika, że w znacznym stopniu opanowano już metody zamrażania zarodków ssaków. Jednakże nadal podejmowane są badania mające na celu dalsze usprawnienie techniki i efektywności zamrażania. Do najważniejszych prac z tego zakresu należy zaliczyć doświadczenia nad zamrażaniem zarodków po ich częściowej dehydratacji. We wcześniejszych badaniach (32) stwierdzono korzystny wpływ częściowej dehydratacji, uzyskanej przez umieszczenie zamrożonego materiału w hipertonicznym PBS, na zamrażalność zarodków mysich. Natomiast użycie do dehydratacji zarodków niepenetrującego związku, jakim jest sacharoza, pozwoliło w ostatnim czasie opracować bardzo prostą i efektywną metodę zamrażania zarodków króliczych (26, 34). Metoda ta polega na przekładaniu odwodnionych w temperaturze pokojowej zarodków wprost z temperatury pokojowej do temperatury -25°C (34) lub -30°C (26). Po okresie przetrzymywania zarodków w wym. temperaturach przez ok. 150 minut, zarodki przekładane są do ciekłego azotu. Metoda ta nie wymaga ani użycia aparatury do zamrażania, ani rejestratora temperatur, może więc być stosowana niemal w każdych warunkach. Efektywność tej metody w przypadku 2-blastomerowych zarodków króliczych jest porównywalna z efektywnością metod konwencjonalnych. Natomiast próba zastosowania jej do zamrożenia zarodków bydłych, zarówno blastocyst (8), jak i zarodków 1 czy 2 blastomerowych (9), nie zapewnia w chwili obecnej tak dobrego przeżywania.

Możliwości dehydratacji zarodków w temperaturze pokojowej są nadspodziewanie duże

(33), a uzyskiwane zmniejszenie objętości zarodka jest porównywalne z tym, jakie osiągają zarodki po ich zamrożeniu w ciekłym azocie. Ostatnio wykazano, że istnieje możliwość zamrożenia silnie odwodnionych zarodków mysich przez przełożenie ich wprost z temperatury pokojowej do ciekłego azotu (35).

Z innych badań nad zamrażaniem zarodków na uwagę zasługują doświadczenia, w których na powodzeniem zastosowano nowe związki osłaniające. Erythrytol (18), a szczególnie 1,2 propanediol (27) okazał się bardzo efektywnym krioprotektorem przy zamrażaniu zarodków mysich. Najbardziej interesującym z nowo wprowadzonych związków osłaniających wydaje się być metanol. Okazał się on skutecznym krioprotektorem w procesie zamrażania blastocyst mysich (22). Jest związkiem bardzo łatwo penetrującym. Cecha ta sprawia, że stosując metanol można uniknąć szoku osmotycznego przy rozmrażaniu, bez konieczności stosowania stopniowego usuwania go z komórek.

Kolejnym zasługującym na uwagę badaniem są prace Schneidera i Mazura (28) oraz Fullera i Bernarda (8) dotyczące zjawisk osmotycznych w trakcie procesu zamrażania i rozmrażania. Prace Schneidera i Mazura (28) stanowią m.in. próbę określenia na podstawie równań modelowych przenikania i wycieknięcia związku osłaniającego z zamrażanych komórek. Kalkulacje te mogą być pomocne w ustaleniu warunków właściwego dodawania, a zwłaszcza usuwania krioprotektorów.

Do najważniejszych dokonań w zakresie podstawowych problemów kriobiologii zarodka ostatnich lat należą jednak badania Ralla i wsp. (23, 24). Autorzy ci stwierdzili mianowicie, że uszkodzenia komórek, jakie mają miejsce podczas powolnego rozmrażania nie są bezpośrednim skutkiem tworzenia się wewnątrzkomórkowego lodu, czyli rekrytalizacji, czy topnienia. Są one natomiast związane z bliżej nieznanymi zjawiskami zachodzącymi w temperaturze ok. -65°C . Wnioski te są więc całkowicie sprzeczne z dotychczasowymi poglądami dotyczącymi mechanizmu uszkodzeń zamrożonych komórek.

Piśmiennictwo

1. Bernard A., Fuller B.: Mat. Symp. Cryobiology. Cambridge, 1983.
2. Bielański A., Johnson W., Schneider U., Mapletoft R. J.: Theorlogenology 21, 2221, 1984.
3. Dresser B. L., Krawer L., Dahlhausen R. D.: 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I, Urbana 2, 191, 1984.
4. Chapin O., Procuer R.: Theorlogenology 21, 230, 1984.
5. Falge R., Rommel P., Rehbeck F., Österreich D.: Mh. Vet. Med. 38, 867, 1983.
6. Fuller B., Bernard A.: Mat. Symp. Cryobiology, Lyon, 1, 5, 1984.
7. Heyman Y., Chesné P.: Theorlogenology 21, 240, 1984.
8. Heyman Y., Nguyen E. X., Renard J. P.: Mat. Symp. Cryobiology, Lyon, 1, 7, 1984.
9. Heyman Y., Smorag Z., Renard J. P.: Mat. Symp. Cryobiology, Lyon, 1, 2, -1984.
10. Hoogenhamp H.: 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I, Urbana 2, 229, 1984.
11. Kasai M., Niwa K., Iritani A.: J. Reprod. Fert., 59, 51, 1980.
12. Kennedy L. G., Boland M. P., Gordon I.: Therlogenology 19, 135, 1983.

13. Lehn-Jensen H.: 10th Int. Congr. Reprod. A. I. 4, II-1, 1984.
14. Lehn-Jensen H.: Theriogenology 19, 138, 1983.
15. Leibe S. P.: Cryo-letters 4, 387, 1983.
16. Massip A., Van der Zwolmen P., Ectors F.: Mat. Symp. Cryobiology, Lyon 1, 6, 1984.
17. Merry D. A., Allen R. L., Krog K., Wright R. W. Jr.: Theriogenology 20, 325, 1983.
18. Miyamoto H., Ishibashi T.: J. exp. Zoology 226, 123, 1983.
19. Ostaszko F. I., Bezugly N. D., Peredera K. B.: 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Urbana 2, 210, 1984.
20. Quinn P., Barros C., Whittingham D. G.: J. Reprod. Fert. 66, 161, 1982.
21. Rall W. F., Polge C.: J. Reprod. Fert. 70, 285, 1984.
22. Rall W. F., Członkowska M., Borton S. C., Polge C.: J. Reprod. Fert. 70, 293, 1984.
23. Rall W. F., Reid D. S., Polge C.: Cryobiology 21, 106, 1984.
24. Rall W. F., Reid D. S., Farrant J.: Nature 286, 511, 1980.
25. Renard J. P., Heyman Y., Ozil J. P.: Ann. Méd. Vét. 126, 23, 1982.
26. Renard J. P., Nguyen B. X., Garnier V.: J. Reprod. Fert. (w druku), 1984.
27. Renard J. P., Babinet C.: J. exp. Zoology 230, 443, 1984.
28. Schneider U., Mazur P.: Theriogenology 2, 68, 1984.
29. Shea B. F., Janzen R. E., Mc Allister R. J., Mc Dermont D. P.: Theriogenology 20, 205, 1983.
30. Slade N. P., Takeda I., Squires E. L., Elsden R. P.: Theriogenology 21, 283, 1984.
31. Smorąg Z., Kątska L., Wierzchoś E.: Anim. Reprod. Sci. 4, 65, 1981.
32. Smorąg Z., Wierzbowski S., Kątska L.: Frezen storage laboratory animals. G. H. Zailmaker, Ed., Gustav Fischer Verlag, New York, 1981, s. 45.
33. Smorąg Z., Garnier V., Renard J. P.: Mat. Symp. Cryobiology, Lyon, 1, 3, 1984.
34. Smorąg Z., Garnier V., Renard J. P.: Mat. Symp. Cryobiology, Lyon 1, 9, 1984.
35. Takeda T., Elsden R. P., Seidel S. E. Jr.: Theriogenology 21, 266, 1984.
36. Takeda T., Elsden R. P., Squires E. L.: 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Urbana 2, 246, 1984.
37. Tervit H. R., Goold P. G.: Theriogenology 21, 268, 1984.
38. Theron M. C., Renard J. P., Crozet N.: Mat. Symp. Cryobiology, Lyon, 1, 1, 1984.
39. Trounson A., Mohr L.: Nature 305, 707, 1983.
40. Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P.: Science 178, 411, 1972.
41. Whittingham D. G., Wood M., Farrant J., Lee H., Halsey J. A.: J. Reprod. Fert. 56, 11, 1979.
42. Willadsen S. M.: The freezing of mammalian embryos. K. Elliot and J. Whelan Ed. Ciba Found. Symp. 52, Elsevier, Amsterdam, 1977, s. 75.
43. Wilmot J., Rowson L. E. A.: Vet. Rec. 92, 686, 1973.
44. Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi H.: J. Reprod. Fert. suppl. 32, 339, 1982.

Adres autora: doc. dr hab. Zdzisław Smorąg, 2-083 Balice 1 k. Krakowa

ZYGMUNT PEJSAK*, PAWEŁ S. SYSA

Badania cytogenetyczne u świń z objawami obojności

* Zakład Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
Katedra Histologii i Embriologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Nowoursynowska 166, 02-975 Warszawa

Dane dotyczące aberacji chromosomalnych, mogących wpływać na wystąpienie anomalii rozwojowych układu rozrodczego, poza nielicznymi pracami są kazuistyczne lub dotyczą niewielkiej liczby osobników obojności (11, 16, 19, 29). Biorąc pod uwagę fakt, że poszerzenie wiedzy na temat skutków oraz rodzajów aberacji chromosomalnych u zwierząt gospodarskich jest możliwe jedynie na podstawie wyników badań przeprowadzonych na coraz większej populacji zwierząt, postanowiono wykonać badania cytogenetyczne stosunkowo dużej liczby świń — obojności w celu określenia ich kariotypu; wyniki wszystkich przeprowadzonych dotychczas w kraju prac tego typu (ogółem opublikowano wyniki badań dotyczące 33 obojności), wskazywały na obecność garnituru chromosomalnego 38,XX (11, 16, 18). Ponieważ w piśmiennictwie światowym podaje się, że u świń o cechach interseksualności występować może mozaikowość (4, 19, 20, 24, 27, 30) i kariotyp XY (15), uznano za celowe poszerzenie w tym kierunku zakresu badań krajowych.

Materiał i metody

Materiał do badań cytogenetycznych uzyskano od 19 obojności. Wymienione zwierzęta pochodziły z siedmiu różnych gospodarstw sektora uspołecznionego. Świnie obojności wykazywały nieprawidłowe ukształtowanie narządów płciowych zewnętrznych, posiadały w różnym stopniu przerośniętą lechtaczkę, na szczycie lub u podstawy której znajdowało się ujście cewki moczowej. Poza tym u zwierząt tych stwierdzano najczęściej jedną (17 przypadków) lub dwie gonady (2 przypadki) umieszczone podskórnym lub w worku mosznowym.

W celu założenia hodowli limfocytów, potrzebnej kryteriami podanymi przez Hansena (12).

do przeprowadzenia badań kariotypu, pobierano od każdego zwierzęcia około 10 cm³ krwi z żyły czczej przedniej (*vena cava cranialis*). Dla zapobieżenia krzepnięciu krwi używano roztworu heparyny produkcyjnej „Polfa” w ilości 75 j.m. na 1 cm³ tej tkanki. Czas od pobrania krwi do chwili założenia hodowli limfocytów nie przekraczał 24 godzin. Samoistną sedymentację krwinek przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Proces ten trwał około 1 godziny. Uzyskane w powyższy sposób krwinki białe zawieszano w 8 cm³ płynu Parkera lub Eagle'a. Do hodowli limfocytów zastosowano metodę Moorheada (cyt. 28). Zawartość próbek hodowlanych stanowiły: 2 cm³ osocza z limfocytami, 8 cm³ podłoża hodowlanego, 0,1 cm³ fazeoliny (prod. Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Kraków), 1000 j.m. penicyliny krystalicznej i 1000 µg streptomycyny. Czas prowadzenia hodowli limfocytów wynosił 72 godziny w temperaturze 37°C. W 90 minut przed zakończeniem hodowli, w celu zablokowania podziałów mitotycznych, dodawano do niej 1 kroplę 0,025% roztworu kolchicyny. Zawartość próbek odwirowywano z szybkością 800 obr./min. przez 10 minut. Po usunięciu supernatantu, dla wywołania szoku hipotonicznego dodawano do hodowli komórek 8 cm³ roztworu hipotonicznego 0,075 N chlorku potasowego. Po zakończeniu procesu hipotonizacji, który trwał 20 minut w temperaturze 37°C, zawartość próbek ponownie wirowano. Limfocyty utrwalano mieszaniną świeżo przygotowanego, oziębionego w zamrażarce utrwalacza, będącego mieszaniną metanolu z kwasem octowym lodowatym (3:1) i zawieszano w 3 kolejnych zmianach utrwalacza. Ostatnia jego porcja wynosiła 0,5 cm³. Odwirowywanie komórek zawieszonych w utrwalaczu odbywało się przy szybkości 800 obr./min. przez 10 minut. Kroplę zawiesiny komórek w utrwalaczu наносono na szkiełko podstawowe, suszono na powietrzu i po dwóch dniach barwiono 2% wodnym roztworem barwnika Giemzy. Analizę chromosomów przeprowadzono pod mikroskopem i na mikro fotografiach, oceniając każdorazowo co najmniej 50 płytek metafazalnych. Pojedyncze mikrografie poszczególnych osobników zachowano jako dokumentację. Kariogramy sporządzono zgodnie z