

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., Wierchoś 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 podskórnie lub w worku mosznowym.

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

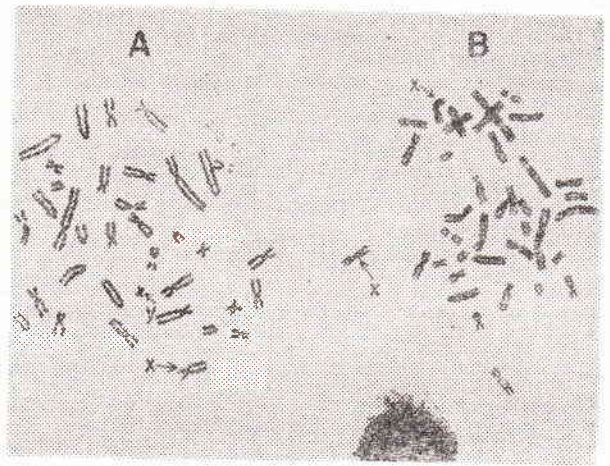
do przeprowadzenia badań kariotypu, pobierano od każdego zwierzęcia około 10 cm³ krwi z żyły czczej przedniej (*vena cava cranialis*). Dla zapobieżenia krzepnięciu krwi używano roztworu heparyny produkcyjnej „Polfa” w ilości 75 j.m. na 1 cm³ tej tkanki. Czas od pobrania krwi do chwili założenia hodowli 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

Wyniki i omówienie

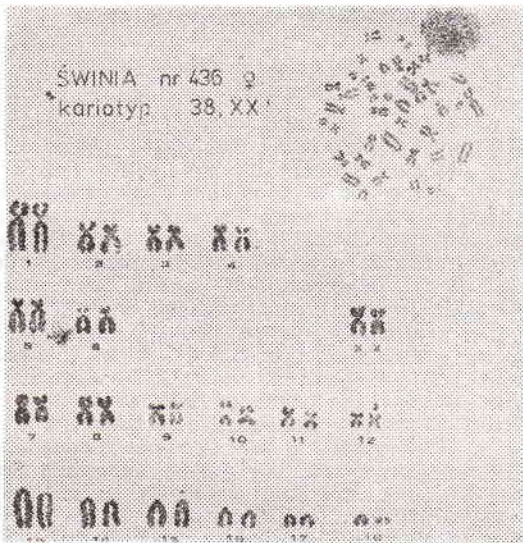
Całość wyników badań cytogenetycznych zestawiono w tab. 1. Zebrane w tej tabeli dane wskazują, że w grupie 19 osobników o obojnaczym ukształtowaniu zewnętrznych narządów płciowych zdiagnozowano: u 14 osobników (73,7%) karyotyp samiczy 38,XX (ryc. 1), u 2 zwierząt (10,5%) karyotyp samczy 38,XY (ryc. 2), a trzy interseksy (15,8%) charakteryzowały się karyotypem w formie chimeryzmu 38,XY/38,XX (ryc. 3, 4, 5). U poszczególnych świń o tym ostatnim karyotypie procentowy stosu-

Tab. 1. Karyotypy analizowanych obojnaków

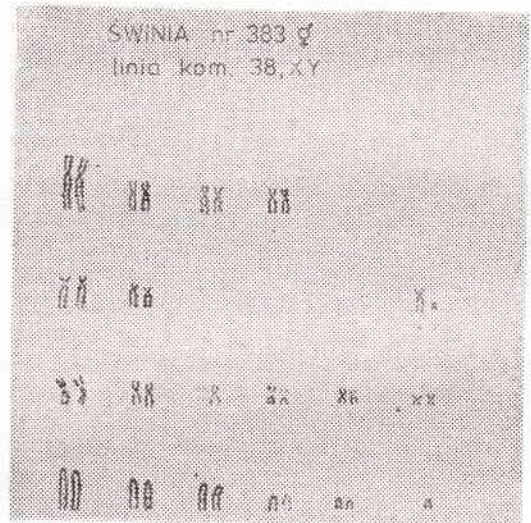
Liczba badanych zwierząt	Płeć fenotypowa	Karyotyp zwierząt		
		XX	XX/XY	XY
		liczba (%)	liczba (%)	liczba (%)
19	obojnak	14 (73,7)	3 (15,8)	2 (10,5)



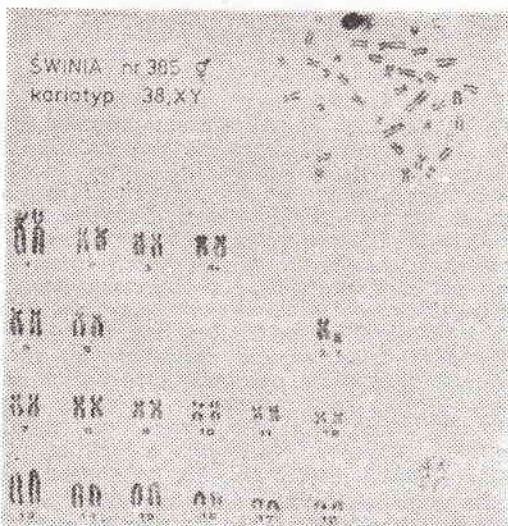
Ryc. 3. Dwie płytki metafazalne (A, B) uzyskane z hodowli limfocytów obojnaczej świni nr 383. Strzałkami oznaczono chromosomy płciowe X i Y



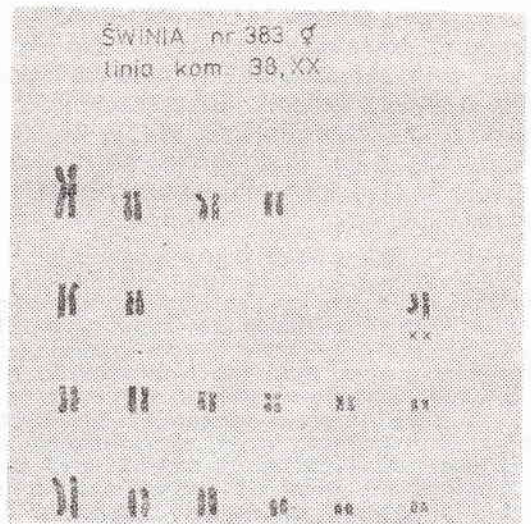
Ryc. 1. Karyotyp obojnaczej świni nr 436; 38,XX



Ryc. 4. Kariogram metafazy A z ryc. 22; 38,XY



Ryc. 2. Karyotyp obojnaczej świni nr 385; 38,XY



Ryc. 5. Kariogram metafazy B z ryc. 22; 38,XX

nek komórek o garniturze 38,XX do komórek o zestawie chromosomów 38,XY przedstawiał się jak 24:76, 6:94, 4:96.

W pracy wykazano, że u obojnaków mogą istnieć różne kariotypy: samiczy, chimeryzm i samczy. Jest to zgodne z danymi, które podaje Melander i wsp. (21) stwierdzając, że u trzody chlewnej 65% obojnaków wykazuje kariotyp 38,XX; 30% charakteryzuje się chimeryzmem 38,XX/38,XY, a 5% osobników interseksualnych posiada kariotyp 38,XY. Należy przy tym zaznaczyć, że w polskim piśmiennictwie genetycznym ukazały się dotychczas jedynie trzy prace (11, 16, 18), w których przedstawione zostały wyniki badań cytogenetycznych osobników obojnaczych świń. U wszystkich tych zwierząt wykazano obecność garnituru chromosomowego 38,XX.

W związku z rozpoznaniem różnych kariotypów u świń-obojnaków rodzi się pytanie, jaka jest ewentualna korelacja między zestawem chromosomów komórek obojnaka, a wystąpieniem u niego anomalii rozwojowej układu rozrodczego, charakteryzującej się równoczesnym ukształtowaniem się cech osobnika męskiego i żeńskiego; cechy te u badanych zwierząt to obecność — *organum penoclitidianum* oraz jąder (jądra).

Jak przedstawił to w swojej monografii Jost (14) kształtowanie się układu rozrodczego u ssaków opiera się na samiczym modelu rozwoju wymienionego układu. Autor ten wykazał, w pracy eksperymentalnej na królikach (13), że bez względu na płeć genetyczną embrionu pozbawienie go we wczesnym okresie zarodkowym gonad prowadzi do tego, że rozwój układu rozrodczego ogranicza się zawsze do wytworzenia struktur pochodnych przewodu Müllera i ukształtowania zewnętrznych narządów płciowych żeńskich. Badacz ten udowodnił ponadto, że nawet podawanie wykastrowanym w okresie zarodkowym osobnikom testosteronu nie zmieniało charakteru rozwoju układu rozrodczego na samczy. Ustalono również (22), że dla rozwoju gonady o strukturze jajnika niezbędna jest obecność dwóch chromosomów X, natomiast ukształtowanie jąder uzależnione jest od jednoczesnej obecności chromosomów XY.

Najnowsze prace dotyczące etiologii procesów powstawania i różnicowania się układu rozrodczego dotyczą immunologicznego charakteru reakcji komórkowych w zawiązku gonady. Zdaniem szeregu autorów (23, 33) obecność odpowiednio wysokiego poziomu antygeny H-Y na powierzchni komórek somatycznych zawiązku gonady powoduje, że różnicuje się ona w czasie rozwoju zarodkowego w kierunku gonady o strukturze jądra. Jak wynika z badań Wachтеля (31, 32), dla uzyskania tego efektu konieczna jest obecność genu aktywującego gen strukturalny H-Y, jak również obecność genu kodującego wystąpienie specyficznego receptora dla działania antygeny H-Y. Ten sam autor

uważa, że odpowiednio wysoki poziom antygeny H-Y i uwidocznienie się jego działania związane jest z obecnością chromosomu Y (33).

W badaniach własnych u obojnaków najczęściej stwierdzanym kariotypem był kariotyp samiczy 38,XX. Zdaniem wielu autorów (5, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 18, 21, 24, 30) jest to najczęściej występujący układ chromosomowy u obojnaków świń. Rozwój jąder w takich przypadkach rozpatrywać można jako wynik działania nie wykrytej laboratoryjnym badaniem linii komórkowej XY. Na możliwość taką wskazują badania Pottera i wsp. (24). Autorzy ci stwierdzili u osobnika obojnaczego w hodowli limfocytów wyłącznie kariotyp 38,XX. Natomiast analiza komórek nerki wykazała istnienie wyłącznie komórek XY. Oczywiście rzeczą jest, że nieprzeprowadzenie badań cytogenetycznych komórek nerki wskazałoby jednoznacznie na istnienie kariotypu 38,XX. Ze względu na niemożność przeprowadzenia w tym okresie, w naszych warunkach badań cytogenetycznych innych komórek aniżeli limfocyty — nie można wykluczyć takiej możliwości.

Drugą ewentualnością wystąpienia cech obojnaczych w obecności wyłącznie linii komórkowej XX może być defekt genowy, prowadzący do ujawnienia się antygeny H-Y i jego skutków w postaci przekształcania się nie zróżnicowanej gonady w jądro (25).

Stwierdzony w 3 przypadkach (15,8%) chimeryzm obojnaków świń 38,XX/38,XY opisany został przez nielicznych tylko autorów (4, 15, 27, 29). Zgodnie z przedstawionymi przez nich danymi, liczba komórek o kariotypie męskim wahała się od 6% (30) do 94% (15). W pracy własnej wśród osobników z omawianym defektem genetycznym stwierdzono 4% do 24% komórek o kariotypie samczym.

Mechanizm powstawania tego rodzaju anomalii genetycznej można rozpatrywać m.in. w oparciu o znane przypadki łączenia się naczyń krwionośnych między łożyskami sąsiadującymi zarodków różnopłciowych i przemieszczania się między nimi komórek XX i XY (1). Należy nadmienić, że zgodnie z tym co podaje Balbierz (2) tworzenie się anastomoz między łożyskami płodów u świń jest bardzo rzadkie, inaczej niż u bydła. Według Flooda (7) przyczyną powyższego jest fakt specyficznego ukrwienia kosmkówki omoczniowej. Jej końce około 40 dnia ciąży zostają bowiem oddzielone od centralnej części pęcherza płodowego przez pierścienie zbitę tkanki łącznej, co pozbawia je ukrwienia. W miarę rozwoju zarodków pęcherze płodowe odsuwają się od siebie i w drugim miesiącu ciąży stykają się ze sobą już tylko obsychającymi końcami. Zdaniem wymienionego wyżej autora właśnie tego typu miejsca stanowią barierę, która z reguły zapobiega zrastaniu się sąsiednich pęcherzy płodowych i powstawaniu między nimi anastomoz naczyńowych.

Z drugiej strony przy analizowaniu chimerizmu u obojnaków pod uwagę należy brać możliwość uwidaczniania się defektu spowodowanego równoczesnym zaplemnieniem komórki jajowej i jej ciała kierunkowego przez dwa plemniki: jeden niosący chromosom X oraz drugi niosący chromosom Y (6). Prawdopodobną przyczyną chimeryzmu u zwierząt może być też fuzja dwóch zapłodnionych komórek jajowych (3).

Kariotyp męski w komórkach limfocytów badanej grupy obojnaków stwierdzono 2-krotnie (10,5 przypadków). Dane o osobnikach obojnacznych o takim kariotypie są stosunkowo najrzadsze (15, 21). Największą liczbę takich osobników o kariotypie męskim opisał Lojda (15). Wykonując badania cytogenetyczne 28 obojnaków, spośród 62 prosiąt urodzonych przez jedną lochę w pięciu miotach po 4 różnych knurach wykazał on, że dotknięte tą anomalią osobniki obojnacznie miały kariotyp męski 38,XY lub przejawiały mozaikowość, przy której aż w 85—94% komórek stwierdzono heterochromosomy XY. W grupie tej tylko u jednego osobnika zdiagnozowano kariotyp 38,XX. Zdaniem tego autora wykazana została w opisanym przypadku możliwość dziedziczenia wymienionego defektu przez dominujący gen autosomalny, przy ograniczeniu do jednej płci. Tego typu obojność nazywa Lojda (15) „syndromem feminizacji jądrowej”. Charakteryzują go żeńskie narządy płciowe zewnętrzne, brak macicy oraz obecność jądra, przy dominującym typie dziedziczenia i kariotypie męskim 38,XY.

Z drugiej strony, biorąc pod uwagę stwierdzony przez Sharpa i wsp. (26) przypadek kariotypu XY u płodnej klaczy wykazującej obecność antygenu H-Y, zjawisko wystąpienia kariotypu samczego u samicy wytłumaczyć można defektem genowym, polegającym na braku aktywatora genu strukturalnego H-Y lub braku specyficznego dla niego receptora.

Konfrontując uzyskane wyniki z danymi przedstawionymi przez innych autorów należy zauważyć, że otrzymane rezultaty podważają wniosek wysunięty w roku 1970 przez Maika (16) wskazujący, że w jądrach komórek somatycznych (leukocytach) interseksów występujących u gatunku *Sus scrofa domestica* stwierdza się prawidłowy kariotyp z układem heterochromosomów XX bez względu na anatomiczne stosunki w obrębie gonad.

W ogólnej ocenie przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że wśród swni o obojnacznej budowie układu rozrodczego determinacja jego rozwoju odbywa się w obecności kariotypu 38,XX, 38,XY lub 38,XX/38,XY; nie wykryto natomiast aberracji w liczbie czy też strukturze chromosomów.

Piśmiennictwo

1. Ashdown R. R., Marable A. W.: J. Anat. 101, 269, 1967.
2. Balbierz H.: Medycyna Wet. 37, 449, 1971.
3. Bielanska-Osuchowska Z.: Embriologia, PWRiL, Warszawa 1977.

4. Broere A. N., Fielden E. D., Hutchings H.: N. Z. vet. J. 16, 31, 1968.
5. Cantwell G., Johnston E., Zeller J.: J. Hered. 49, 199, 1958.
6. Fehheimer N. S., Harper R. L.: 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. 1980.
7. Flood P. T.: J. Reprod. Fert. 32, 539, 1973.
8. Ford C. E., Pollock D. L., Gustavsson I.: Hereditas 92, 145, 1980.
9. Gerneke W. H.: J. vet. Res. 34, 219, 1967.
10. Gerneke W. H.: S. Afr. J. Sci. 34, 219, 1967.
11. Glogowski R., Sysa P. S.: Medycyna Wet. 32, 362, 1976.
12. Hansen K. M.: Annis. Genet. Sel. anim. 9, 517, 1977.
13. Jost A.: C. R. Soc. Biol. Paris 141, 126, 1947.
14. Jost A.: C. R. Soc. Biol. Paris 141, 275, 1947.
15. Lojda L.: Docum. vet. Brno 8, 71, 1975.
16. Maik H.: Pol. Arch. wet. 13, 107, 1970.
17. Makino S., Sasaki M. S., Sofuni T., Ishikawa T.: Proc. Jap. Acad. 38, 586, 1962.
18. Mazarski J., Adamska-Jarocka G., Miśniakiewicz A., Luniński M.: Medycyna Wet. 34, 301, 1978.
19. McFelly R. A., Kanagawa H.: Reproduction in farm animals. Hafez E.S.E., Lea and Febiger Press, Philadelphia 1974.
20. McFee A. F., Knight M., Banner M.: Com. J. Genet. cytol. 8, 502, 1966.
21. Melander Y., Hansen-Melander E., Holm L., Somlev B.: Hereditas. 69, 51, 1971.
22. Ohno S.: Sex chromosomes and sex linked genes. Berlin—Heidelberg—New York, Springer 1967.
23. Ohno S.: Majo sex-determining genes. Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York 1979.
24. Potter W. L., Cooper J. W., Blackstra A. W.: Australian vet. J. 56, 133, 1980.
25. Selden J. R., Wachtel S. S., Koo G. C., Haskins M. E.: Science 201, 644, 1978.
26. Sharp A. J., Wachtel S. S., Benirschke K.: J. Reprod. Fert. 58, 157, 1980.
27. Somlev B., Hansen-Melander E., Melander Y., Holm L.: Hereditas 64, 203, 1970.
28. Sysa P., Stawomirski J., Słota E.: Medycyna Wet. 35, 166, 1979.
29. Toyama Y.: Jap. J. zootech. Sci. 45, 551, 1974.
30. Vogt D. W.: J. Hered. 59, 166, 1968.
31. Wachtel S. S., Koo G. C., Ohno S., Gropp A., Dei V. G., Tantravakti R., Miller D. A., Miller O. J.: Nature 264, 639, 1975.
32. Wachtel S. S.: Science. 198, 797, 1977.
33. Wachtel S. S.: H-Y antigen and the biology sex determination. Acad. Press, London 1983.

Adres autora: dr Zygmunt Pejsak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Пейсак З., Сыса П. — Цитогенетические исследования свиней с симптомами гермафродытизма

Цитогенетическим исследованиям подвергли 19 особей. Культуры лимфоцитов провели, применяя метод Мурхеда. Анализ хромосом отдельной особи показали у: 10 особей (73,7%) женский кариотип 38, XX; у 2 свиней (10,5%) мужской кариотип 38, XY, а 3 интерсекса (15,8%) характеризовались кариотипом в форме химеризма 38, XY/38, XX.

Pejsak Z., Sysa P. — Cytogenic studies in pigs with the symptoms of hermaphroditism

Cytogenic studies have been performed on 19 animals. The culture of lymphocytes was obtained by the method of Moorhead. The analysis of chromosomes of individuals revealed in 14 (73.7%) of animals female karyotype 38, XX, in two (10.5%) of pigs male karyotype 38, XY, and three (15.8%) intersexes characterized karyotype in the form of chimerism 38, XY/38, XX.

STEPHENS K. A., MARCOM E., HOOD D. M.: Pomiar aktywności antytrombiny III w płazmie zdrowych koni. (Measurement of plasma antithrombin III activity in healthy horses). Am. J. vet. Res. 45, 351—353, 1984 (2).

Stosując metodę fluorometryczną oznaczono aktywność antytrombiny III w plazmie 15 dorosłych koni. Średnie wartości % zahamowania trombiny po rozcieńczeniu wynosiły $59,17 \pm 7,4$. Wartości te wynosiły u 6 klaczy odpowiednio $65,96 \pm 3,7$ i $112,7 \pm 8,6$, u 7 źrebniat $54,51 \pm 3,9$ i $94,8 \pm 11,6$ i u 2 ogierów $55,13 \pm 12,1$ i $101,2 \pm 15,3$.

G.