

PAWEŁ SYSA, STANISŁAW RAUŁUSZKIEWICZ, JANINA MAIK-SIEMBIDA,  
HANNA GUCWIŃSKA, HENRYK HÜBNER

## Zastosowanie metody fluorescencyjnej do pośredniej analizy płci komórek interfazalnych zwierząt domowych, małp i człowieka

Wojskowa Akademia Medyczna  
w Łodzi

Ogród Zoologiczny w Łodzi  
Dyrektor: lek. wet. A. SOSNOWSKI

Ogród Zoologiczny we Wrocławiu  
Dyrektor: dr wet. A. GUCWIŃSKI

Instytut Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynarii SGGW w Warszawie  
Dyrektor: prof. dr J. MAZURCZAK

Instytut Chorób Niezakaźnych Wydziału Weterynarii WSR we Wrocławiu  
Kierownik Kliniki Położniczej: prof. dr A. SENZE

We wstępnym doniesieniu wysunęliśmy przypuszczenie, że fluorescencyjną metodę identyfikacji interfazalnego chromosomu Y u człowieka uda się zastosować przy analizie garnituru chromosomowego zwierząt domowych i wykorzystać do celów weterynaryjnych. Wyniki uzyskane w pierwszym etapie badań, choć zachęcające, nie były jednak zadowalające ze względu na trudności uniknięcia nałożenia się na komórkę artefaktów i bakterii cechujących się silną fluorescencją. Ponadto liczba badanych zwierząt była stosunkowo niewielka, z czym również mógł wiązać się błąd oceny (8).

W ostatnich miesiącach ukazały się nowe ważne doniesienia rzucające dodatkowe światło na charakter fluoryzujących struktur wewnątrz jądra interfazalnego. Przeprowadzone badania wykazały, że w pewnym odsetku komórek pochodzących od kobiet również stwierdza się fluorescencję ludzaco podobną do fluorescencji Y i udowodniono, że wiąże się ona z niektórymi regionami autosomów (1, 2, 4, 7). Ukazała się także praca Pearsona i wsp. (6), w której autorzy stwierdzili, że u badanych przez nich zwierząt domowych oraz małp nie udało się z całą pewnością zidentyfikować metodą fluorescencyjną chromosomu Y. Ich zdaniem fluorescencja chromosomu Y, poza człowiekiem, występuje jedynie u goryla.

Kontynuując nasze poprzednie badania postanowiliśmy przeanalizować taki materiał, który pozwoliłby na uniknięcie artefaktów (fluoryzujących bakterii, śluzu oraz innych ciał organicznych i nieorganicznych). Postanowiono zwiększyć liczbę osobników uprzednio badanych gatunków, analizować komórki różnych tkanek, oraz poddać ocenie materiał pochodzący od małp.

### Materiał i metody

Pierwszą grupę badanych zwierząt stanowiły samce i samice następujących gatunków zwierząt: świnia (*Sus scrofa dom.*), bydło (*Bos taurus*), koń (*Equus*

*caballus*) i pies (*Canis familiaris*). Analizowano rozmazy komórek nabłonka spojówkowego. Dla przeprowadzenia analizy komórek zróżnicowanych czynnościowo i morfologicznie oceniano komórki mięszu wątrobowego, limfocyty śledziony dorosłych świń i bydła. Badania rozszerzono o analizę komórek nerwowych z rdzeni kręgowych, komórek wątrobowych i śledziony płodów świń i bydła. Tkanki pobierano z zachowaniem warunków aseptycznych. Dodatkowo oceniano we fluorescencji rozmazy plemników buhajów i psów.

Oddzielną grupę stanowiło osiem gatunków małp: kapucynka (*Cebus apella*), koczokodan zielony (*Cercopithecus aethiops*), makak jawański (*Macaca irus*), makak lapunder (*Macaca nemestrina*), dryl (*Mandrillus leucophaeus*), sajmiri (*Saimiri sciureus*), pawian majsajski (*Papio cynocephalus*) oraz goryl (*Gorilla gorilla*).

Oceniano komórki nabłonka spojówki oka i rozmazy krwi. Od goryli pobrano tylko rozmazy nabłonków jamy ustnej.

Kontrolę stanowiły rozmazy nabłonków błony śluzowej policzków zdrowych mężczyzn i kobiet.

Preparaty utrwalano natychmiast po pobraniu, w mieszaninie alkoholu z eterem (1:1). Barwiono 0,5% roztworem dwuchlorowodoru akrychiny (atebryna) w buforze McIlvaine'a o pH = 4,2. Komórki oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss'a w świetle lampy rtęciowej HBO-200, przy zastosowaniu filtrów wzbudzającego BG-12 i barierowego OG-1/GG-9.

### Wyniki

W porównaniu z komórkami nabłonkowymi uzyskanymi od mężczyzn w komórkach pochodzących od samców świń, bydła, koni i psów nie znajdowano w jądrach komórkowych intensywnie świecącej plamki, która mogłaby odpowiadać chromosomowi Y. W niektórych jądrach obserwowano pojedyncze, drobne i silnie fluoryzujące struktury. Liczba ich wahała się w zależności od osobnika i preparatu od 0% do 20% komórek. Występowały one również w komórkach samic tych gatunków. W końcowej analizie stwierdzono, że struktury te nie były związane z płcią zwierzęcia.

W materiale pobranym z narządów wewnętrznych płodów i zwierząt dorosłych uniknięto wprawdzie występowania zanieczyszczeń,

lecz nie pozwoliło to na zidentyfikowanie płci osobnika. We wnętrzu jąder komórkowych pochodzenia płodowego obserwowano siateczkę nici chromatynowych o różnej intensywności fluorescencji. W pojedynczych komórkach tworzyły się zagęszczenia mogące imitować świecenie odpowiadające fluorescencji chromosomu Y u mężczyzn.

Plemniki buhajów i psów obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym wykazywały bardzo słabe i równomierne świecenie całej główki plemnika, jedynie u nasady witi fluorescencja była wyraźniejsza.

Analizując jądra komórkowe nabłonka spojówek oka i leukocytów krwi małej nie udało się tą drogą ustalić płci dawcy. Jedynie u samca goryla w ok. 40% jąder komórkowych obserwowano fluorescencję identyczną do spotykanej u człowieka.

W kontrolnych rozmazach u mężczyzn obserwowano fluorescencję w 60—80% jąder komórkowych. U kobiet fluorescencja występowała w 4—6% jąder.

Tab. 2. Badane gatunki rzędu *Primates* oraz uzyskane wyniki

Gatunek	Płeć	Liczba badanych osobników	Fluorescencja ciątka Y
1. Człowiek ( <i>Homo sapiens</i> )	♂ ♀	20 20	+ -
2. Goryl ( <i>Gorilla gorilla</i> )	♂ ♀	1 1	+ -
3. Kapucynka ( <i>Cebus apella</i> )	♂ ♀	4 1	- -
4. Koczkodan zielony ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	♂ ♀	12 5	- -
5. Makak jawański ( <i>Macaca irus</i> )	♂ ♀	1 4	- -
6. Makak lapundér ( <i>Macaca nemestrina</i> )	♂ ♀	2 1	- -
7. Dryl ( <i>Mandrillus leucophaeus</i> )	♂ ♀	1 2	- -
8. Sajmiri ( <i>Saimiri sciureus</i> )	♂ ♀	1 1	- -
9. Pawian masajski ( <i>Papio cynocephalus</i> )	♂	1	-

należy uważać, że stosowanie fluorescencyjnej metody wykrywania interfazalnego chromosomu Y nie daje spodziewanych wyników u badanych gatunków zwierząt. Obserwowane w

Tab. 1. Zestawienie badanych zwierząt domowych i ocenianych tkanek

Gatunek	Wiek	Płeć	Liczba badanych zwierząt	Badane tkanki				
				nabłonki spojówki oka	komórki wątrobowe	limfocyty śledziony	komórki nerwowe rdzeni kręgowych	plemniki
Świnia ( <i>Sus scrofa dom.</i> )	doroste	♂ ♀	25 15	X X	X X	X X		
	ptody	♂ ♀	35 10		X X	X X	X X	
Bydło ( <i>Bos taurus</i> )	doroste	♂ ♀	14 10	X X	X X	X X		X
	ptody	♂ ♀	26 12	X	X X	X X	X X	
Konia ( <i>Equus caballus</i> )	doroste	♂ ♀	14 6	X X				
	Pies ( <i>Canis familiaris</i> )	doroste	♂ ♀	8 4	X X			

#### Omówienie wyników

W badanych jądrach komórkowych pochodzących od zwierząt przy barwieniu preparatów dwuchlorowodorkiem akrychiny (atebryna), nie udało się zidentyfikować płci dawcy. Obserwowana fluorescencja w jądrach komórkowych u zwierząt była zasadniczo jednakowa u samców i samic.

Obecne badania, w porównaniu z poprzednim doniesieniem (8), zostały rozszerzone o dalsze gatunki zwierząt oraz zwiększono liczbę przebadanych osobników. Analizowano komórki różnych tkanek zwierząt dorosłych i płodów.

Biorąc pod uwagę przedstawione tutaj wyniki oraz doniesienia Pearsona i wsp. (5, 6),

jądrach komórkowych świecące struktury mogą powstać z przypadkowego nałożenia się nici chromatynowych lub też w wyniku silnej spiralizacji niektórych odcinków autosomów. Przykładem takiej silnej fluorescencji są niektóre odcinki autosomów człowieka.

Szczególne znaczenie ze względów hodowlanych i regulacji płci potomstwa wiąże się z poszukiwaniami metody określenia płci plemnika, tj. czy niesie on chromosom Y czy X. Z naszych obserwacji dotyczących fluorescencji plemników buhajów i psów wynika, że chromosom Y tych gatunków zachowuje się w plemnikach zabarwionych atebryną podobnie jak w pozostałych analizowanych tkankach ciała i jest niewykrywalny.

U badanej pary goryli możliwe było to metodą odróżnienie płci męskiej, co jest zgodne z doniesieniem Pearsona i wsp. dotyczącym analizy płytek metafazalnych (6). Podobieństwo fluorescencji chromosomu Y u człowieka i goryla może wynikać z bliskiego pokrewieństwa ewolucyjnego tych gatunków.

Tak więc nie spełniły się, jak dotychczas, nadzieje na uzyskanie stosunkowo prostej, uzupełniającej metodę Barra, techniki diagnozowania populacji zwierząt dla wykrywania osobników podejrzanych o zaburzenia układu chromosomów płciowych.

Pełną wartość posiada jedynie analiza chromosomu płciowego Y w komórkach interfazalnych człowieka, w oparciu o metodę fluorescencyjną. Dzięki tej technice potwierdzono obecność w komórkach interfazalnych nieprawidłowej liczby chromosomów płciowych; u zdrowych mężczyzn wykryto plemniki z dwoma chromosomami Y (9), natomiast u mężczyzn posiadających chromosomy płciowe XYY wykazano obecność w komórkach dwóch świecących punktów będących chromosomami Y (3).

#### Piśmiennictwo

1. Caspersson T., Zech L., Johansson C., Lindsten J., Hultén M.: *Exp. Cell Res.*, 61, 472, 1970.
2. Conen P. E., Lewin P., Vakil D.: *Amer. J. hum. Genet.* 22 abstr. 22a, 1970.
3. Hultén M., Pearson P. L.: *Ann. Hum. Genet. Lond.* 34, 273, 1971.
4. Pearson P. L., Bobrow M.: *J. Reprod. Fert.* 22, 177, 1970.
5. Pearson P. L., Bobrow M., Vosa C. G.: *Nature* 226, 73, 1970.
6. Pearson P. L., Bobrow M., Vosa C. G.: *Barlow P. W.: Nature* 2131, 326, 1971.
7. Philip J., Nielsen H., Skalkbæk N. E., Boczkowski K.: *Lancet* I, 293, 1971.
8. Rautuszkiewicz S., Haraźna J., Sysa P., Hübner H.: *Medycyna Wet.* 27, 516, 1971.
9. Sumner A. T., Robinson J. A., Evans H. J.: *Nature New Biol.* 229, 231, 1971.

Adres autora: lek. wet. Paweł Sysa, Warszawa, ul. Polna 50 m. 47.

Сыса П., Раулушкевич С., Маик-Сембида Я., Гуцвиньска Х., Хибнер Х. — **Применение флуоресцентного метода для косвенного анализа пола интерфазальных клеток домашних животных, обезьян и человека.**

Исследованиями были подвергнуты многочисленные группы домашних животных: свиньи, крупный рогатый скот, лошади и собаки, восемь видов обезьян и человек. У лошадей и собак исследовали эпителий конъюнктивы глаз, у крупного рогатого скота дополнительно клетки селезенки (лимфоциты) и печени, а также асептически взятые плодовые ткани. Анализировали мазки спермы быков и собак, у обезьян эпителия слизистой ткани щек. Все мазки окрашивали 0,5% раствором атебрина (двухлористоводородная соль акрихина) в буферной смеси по Mc Ilvaine pH = 4,2.

Характерную для телца у Флуоресценцию установили в мазках клеток мужчин и самца гориллы. У остальных исследованных видов животных наблюдали иногда в ядрах клеток флуоризирующие структуры но присутствие их не было связано с полом исследованного индивидуума. Авторы приходят к выводу, что флуоресцентный метод, высокоэффективный в диагностике interfazальных клеток человека не годится для анализа interfazальных хромосомов животных (с исключением вида Gorilla gorilla).

Sysa P., Rautuszkiewicz S., Maik-Siembida J., Gućwinńska H., Hübner H. — **Application of fluorescent test to indirect analysis of sex of interphasal cells in domestic animals, monkeys and man.**

The investigations have been carried out on pigs, cattle, horses, dogs, 8 species of monkeys and man. In the horses and dogs there was investigated epithelium of conjunctival sac, besides in cattle and pigs spleen (limphocytes) and liver cells, and also aseptically obtained embryonic tissues. There were also analysed smears of spermatozoa of bulls and dogs. In the monkeys there were examined smears of buccal epithelium. The smears were stained with 0.5% atebrine in McIlvaine's buffer (pH 4.2). Typical for Y bodies fluorescence was observed in the cells of men and Gorilla gorilla. In the rest of animals under study, there were sometimes observed some fluorescent structures in the nuclei, but they appeared regardless of the sex of animals. On the strength of the above analysis the authors stated that fluorescent method, very useful in diagnosis of interphasal cells in men, is not valuable for analysis on interphasal chromosomes of all but one animal, i.e. Gorilla gorilla.

**NARUCKA U., WESTENDORP J. F.: Corynebacterium suis u prosiat. (Corynebacterium suis in pigs).** *Neth. J. vet. Sci.*, 4, 86—91, 1972 (4).

Corynebacterium suis wyizolowano od 8 z grupy 11 macior u których stwierdzono zapalenie pęcherza moczowego i odmiedniczkowe ropne zapalenie nerek. C. suis izolowano z nerek, pęcherza moczowego oraz z jąder hermafrodytów macior. Izolowano go również z moczu i śluzówki pęcherza moczowego hermafrodytów klinicznie zdrowych. C. suis wyosobniono również z napletka dwóch zdrowych knurów, nie wyosobniono go natomiast z jąder zdrowych knurów. Autorzy nie potwierdzili poglądów Sołtysa który twierdzi że zakażenia C. suis występują jedynie u macior ciężarnych ponieważ jedynie 3 z 8 badanych macior od których izolowano C. suis były w ciąży. Nie udało się również określić role knurów w przenoszeniu choroby. Do izolacji C. suis stosowano agar z dodatkiem 10% kwi hvdlecei inkubowany w warunkach beztlenowych. W identyfikacji biochemicznej zastosowano próbny na indol, mocznik, salicyne, glukoze, sacharozę, laktozę, ramnozę, mannozę, maltozę, trehalozę i mannitol.

Z.

**GOUDSWAARD J., TERPORTEN-PASTOARS W. W. M.: Choroba Johnego u kóz: porównanie testów serologicznych. (Johne's disease in goats: comparison of serological tests).** *Neth. J. vet. Sci.*, 4, 93—112, 1972 (2).

Autorzy porównali stosowanie odczynu precipitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym, odczyn wiązania dopełniacza i odczyn immunofluorescencji w rozpoznawaniu choroby Johnego u kóz. Przy użyciu tych metod przebadano surowice od 50 klinicznie zdrowych kóz, surowice od 35 kóz zakażonych doświadczalnie M. johni i surowice 30 naturalnie zakażonych kóz. Badania wstępne wykazały, że precipityny i przeciwciała biorące udział w odczynie immunofluorescencji pojawiają się znacznie wcześniej niżeli przeciwciała wiążące dopełniacz. Odczyn precipitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym jest odczynem wysoce swoistym w przypadku stosowania surowicy rozcieńczonej 1:100 fizjologicznym w stosunku 1:1. Z surowicami chorego hvdla uzyskiwano natomiast w tym odczynie duży odsetek wyników wątpliwych. Wprowadzenie do badań rozpoznawczych odczynu immunofluorescencji i odczynu precipitacji dyfuzyjnej w żelu umożliwia wykluczenie reakcji nieswoistych spotykanych często w odczynie wiązania dopełniacza.

Z.