

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

PAWEL S. SYSA

Ustalenie międzynarodowych wzorów kariotypów zwierzęcych na konferencji w Reading (Wielka Brytania)

Z Instytutu Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

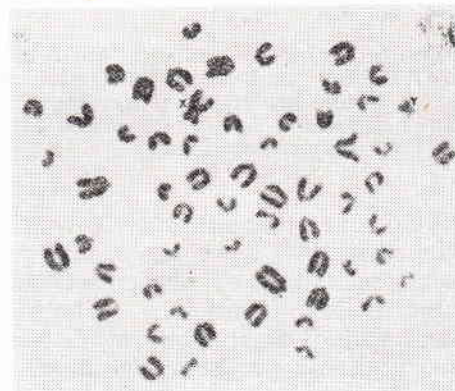
Badania cytogenetyczne są jedną z dynamicznie rozwijających się dyscyplin nauk biologicznych. W związku z tym szybko zwiększa się ilość nowych informacji. Stwarza to potrzebę takiego prezentowania rezultatów, aby były one jednoznacznie odczytywane przez wszystkich zainteresowanych. Dotychczas jednak w cytogenetyce zwierząt, koncentrującej się na poznawaniu tajemnic chromosomów — nosicieli informacji genetycznej, istniała nieomal całkowita dowolność w sposobie prezentowania wyników, który bardzo ściśle wiąże się z przedstawioną treścią.

Cytogenetyka kliniczna jest właściwie młodą gałęzią genetyki. Na początku lat 60-tych bowiem zweryfikowano ostatecznie dane na temat liczby chromosomów w komórkach somatycznych u wszystkich podstawowych gatunków zwierząt domowych. Już w przeciągu pierwszego 10-lecia badań korzystających z hodowli komórkowych wykryto szereg rodzajów nieprawidłowości rozwojowych i zaburzeń płodności, których wyjaśnienie stało się możliwe jedynie poprzez analizę chromosomów. Dla przykładu można wymienić takie aberracje jak: translokację 1/29 u bydła; translokacje chromosomowe u świń (13q—, 14q+; 11p+, 15q—); monosomie X, zespoły XXY oraz XXX u różnych gatunków zwierząt; chimeryzm — częsty zwłaszcza u bydła (freemartinizm) itp.

W komórce przechodzącej z okresu interfazy, poprzez profazę, w metafazę chromosomy zmniejszają swoją długość w miarę postępowania ich spiralizacji i skręcania się. Skracanie się wszystkich chromosomów odbywa się zasadniczo równomiernie, tak że najdłuższe chromosomy nadal pozostają względnie największe. Jednocześnie uwidacznia się lokalizacja centromeru, w którym do końca metafazy utrzymywane są połączone obydwie chromatydy chromosomu. Położenie centromeru pozwala na zaklasyfikowanie chromosomów do jednego z czterech głównych typów: meta-, submeta-, akro- względnie telocentrycznych struktur. Dotychczas przy identyfikowaniu chromosomów metafazalnych oceniano ich wygląd w preparatach mikroskopowych, w których te struktury komórkowe były jednolicie zabarwione. Jedynie rejon centromeru barwił się słabo. Tak więc wielkość chromosomu oraz położenie jego centromeru były

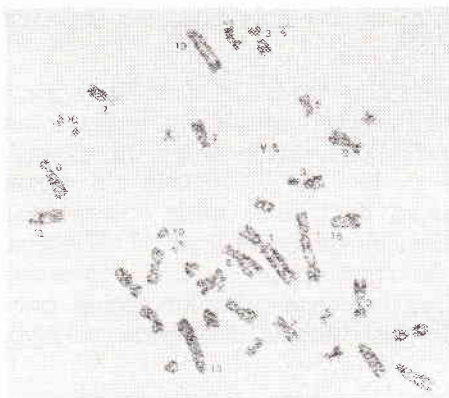
dwoma podstawowymi a praktycznie jedynymi kryteriami rozpoznawania chromosomu. Kryteria te stanowiły podstawę do odpowiedniego umiejscowienia go w kariogramie, będącym wizualną formą ukazania aparatu genetycznego komórki, czyli ilustracją kariotypu osobnika. Na tym etapie rozwoju metod cytogenetycznych i dotychczasowej precyzji identyfikowania chromosomów możliwe było jedynie wyróżnienie w kartiotypie „grup” chromosomów podobnych pod względem morfologii. U poszczególnych gatunków zwierząt tylko niektóre chromosomy dawały się bezbłędnie rozpoznawać. Można tu przypomnieć, że grupy chromosomów są parzyste, ponieważ każda komórka somatyczna zawiera w sobie dwa haploidalne garnitury wywodzące się z gamet, które poprzez akt zapłodnienia i zygotę dały początek danemu organizmowi.

Na szczególne trudności natrafiono przy identyfikowaniu chromosomów np. bydła domowego, gdyż wszystkie chromosomy autosomalne w komórce (a jest ich 58) różnią się nieznacznie długością, a centromer mają zawsze położony przy końcu chromatydy (ryc. 1). Większe różnicowanie występuje pośród chromosomów świni, lecz i u tego gatunku szereg par chromosomów jest nieomal identycznych (ryc. 2).



Ryc. 1. Chromosomy metafazalne limfocyta buhaja (60, XY). Preparat barwiono tradycyjnie barwnikiem Giemsy. Chromosomy płciowe oznaczono literami — Z (żeński), Y (męski).

Do niedawna ze względu na obiektywne trudności w prowadzeniu badań laboratoryjnych nad chromosomami zwierzęcymi stosunkowo niewielkie pracownie zajmowały się diagnostyką cytogenetyczną na użytek kliniczny. Wykazane powiązania między płodnością a obrazem chromosomów komórki spowodowały wzrost zainteresowania badaniami cytogenetycznymi na świecie, w tym również i w Polsce. Jednak dotychczas przy ustalaniu kariogramu zwierzęcia każdy z ośrodków posługiwał się własnym schematem prezentowania i numerowania chromosomów, bądź korzystał z wzorca wcześniej opublikowanego przez jedną z bardziej zaawansowanych w tym kierunku pracowni. Przykładowo kariotyp świni (*Sus scrofa dom.*, L.) układany był na szesnaście różnych sposobów, które posiadały jeszcze dodatkowo pewne mniej istotne warianty. W przypadku rozpoznania aberracji natrafiano na poważne komplikacje w porównywaniu wyników, gdyż ten sam chromosom, czyli niosący określoną informację genetyczną, zajmował różną pozycję a więc inną numerację w różnych opisach podawanych przez poszczególne pracownie. Stąd wynikały trudności w interpretacji wyników. Dlatego zawsze potrzebna była dokumentacja zdjęciowa a nieprecyzyjny i mało przydatny był słowny opis danej nieprawidłowości chromosomów.



Ryc. 2. Chromosomy metafazalne z komórki nerki knura (38, XY). Przy niektórych autosomach podano numerację wg ustaleń konferencji w Reading. Chromosomy płciowe oznaczono X i Y. Barwienie rutynowe barwnikiem Giemsy

Wprowadzenie z początkiem lat 70-tych w cytogenetyce zwierząt domowych metod prowadzących do prążkowego zabarwienia chromosomów umożliwiło pewniejszą identyfikację prawie wszystkich chromosomów. Łatwe jest obecnie rozpoznanie par homologicznych, gdyż dzięki jednokowej strukturze wykazują one — po odpowiedniej obróbce chemicznej — jednakowe powinowactwo do barwników fluorescencyjnych i barwnika Giemsy. Chromosomy niehomologiczne z reguły różnią się układem pasm

barwnych. Jednocześnie z rozwojem cytogenetyki człowieka wprowadzono uznane przez międzynarodowe gremia symbole i znaki, umożliwiające w sposób krótki zarejestrowanie rodzaju nieprawidłowości, a nawet precyzyjne określenie miejsca w chromosomie, które uległo uszkodzeniu. Ścisłe rozpoznanie zmienionego chromosomu, sprecyzowanie rejonu mutacji i powiązanie jej ze skutkami funkcjonalnymi i strukturalnymi w komórce, narządzie i organizmie ma ważne znaczenie w diagnostyce klinicznej a także ma pomóc przy opracowaniu mapy genów poszczególnych chromosomów. Takie mapy genowe, dla potrzeb biologii i medycyny, opracowywane są dla chromosomów człowieka, szeregu gatunków roślin i zwierząt.

Przedstawione tutaj zagadnienia legły u podstaw inicjatywy pracowni cytogenetycznych z Wielkiej Brytanii, aby na obecnym etapie badań i w związku z obserwowanym przyspieszeniem podejmowania prac z zakresu cytogenetyki zwierząt domowych zorganizować międzynarodową konferencję, na której przedstawiciele najbardziej zaawansowanych pracowni ustaliliby ujednolicone wzorce kariotypów. Wzorce te miały być opracowane z uwzględnieniem charakterystyki poszczególnych chromosomów pod względem układu fluoryzujących prążków Q (nazwa wywodzi się od zastosowanego fluorochromu — Quinarine Mustard) oraz prążków G (rejonów silnie barwiących się barwnikiem Giemsy). Pamiętać jednak należy, że w zależności od tego czy analizę wykonuje się na bardzo długim chromosomie z okresu wczesnej profazy, krótszym z późnej profazy, czy też znacznie skróconym z końca metafazy, uzyskuje się mniejszą lub większą liczbę czytelnych prążków. Oczywiście bardziej wydłużone chromosomy stwarzają szansę uzyskania lepszego rozdziału chromatyd na poszczególne prążki. Stąd też wynikały główne różnice w dotychczasowych opisach prążków publikowanych przez różnych autorów.

Konferencja poświęcona standaryzacji została zwołana w dniach 2—6 sierpnia 1976 r. na Uniwersytecie w Reading pod Londynem. Dlatego w światowym piśmiennictwie określana będzie ona w skrócony sposób jako Reading Karyotype Conference 1976. Wzięło w niej udział 37 cytogenetyków z następujących krajów: Australia (1), Dania (2), Francja (6), Kanada (4), Nowa Zelandia (1), Polska (1), RFN (5), Szwajcaria (1), Szwecja (4), USA (3), Wielka Brytania (7) i Włochy (2). Przewodnictwo naukowe nad całością obrad objął jeden z pionierów badań cytogenetyki klinicznej prof. dr Charles E. Ford (Oxford, W. B.). Dyskusja prowadzona była w formie sesji plenarnej poświęconej omówieniu kolejnego gatunku zwierząt. Kierowali nią wówczas dosygnowani wcześniej koordynatorzy. Sesję dotyczącą chromosomów byłą prowadził prof. dr I. Gustavsson (Szwecja); owiec — dr R. Buckland (W. B.); kóz — dr C. P. Popescu (Francja); świń — dr M. Harvey (W. B.); koni — dr D. Hare (Kanada); królików — dr G. Stran-

zinger (RFN); kotów — dr P. K. Basrur (Kanada).

Przed zebraniem na konferencji cytogenetykami postawione zostały następujące zadania:

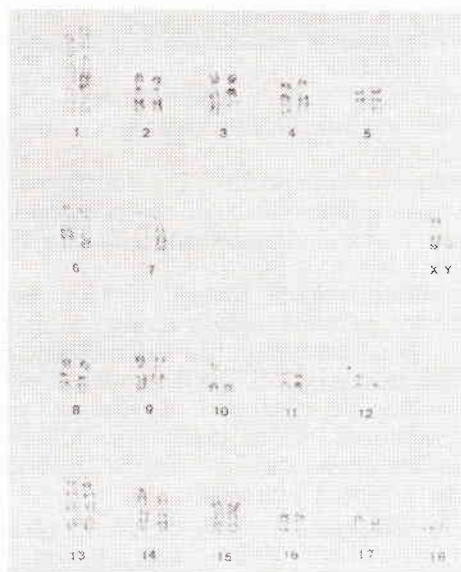
a) ustalenia liczby grup chromosomów w kariotypach poszczególnych gatunków zwierząt, liczebności autosomów w grupach oraz czytelnego przestrzennego ich prezentowania w kariogramach;

b) określenia sekwencji prążków na poszczególnych chromosomach u danego gatunku zwierzęcia i stwierdzenia, które z nich są najbardziej typowe i widoczne na chromosomach płytki metafazalnej średnie długości;

c) określenia w dotychczas opublikowanych kariotypach, wykorzystujących metody prążkowe, numeracji chromosomów w stosunku do przyjmowanego w Reading wzorca.



Ryc. 3. Kariogram buhaja ułożony wg wzoru z Reading. Chromosomy wykazują obecność prążków G wywołanych działaniem trypsyny



Ryc. 4. Kariogram knura ułożony wg wzoru z Reading. Na chromosomach widoczne są prążki po działaniu trypsyny

Założone cele zostały zasadniczo osiągnięte. Przyjęto jednolite wzorce graficzne kariotypów dyskutowanych gatunków zwierząt (ryc. 3 i 4). Zaproponowano również krótkie charakterystyki układu prążków G i Q dla poszczególnych chromosomów. W czasie dyskusji zarysowały się jednakże wyraźnie sprzeczne poglądy dotyczące m.in. próby podjęcia ujednoczenia schematów kariotypów: bydła domowego, owcy oraz kozy i opracowania dla nich jednego wzorca przy wyszczególnieniu różnic gatunkowych. Zdecydowano ostatecznie, aby kariotypy tych gatunków zwierząt rozpatrywać zupełnie niezależnie mimo daleko idących podobieństw w obrazie morfologii i układu prążków na chromosomach. Nie ustalono prócz tego jednoznacznej charakterystyki chromosomu X u świni, ze względu na duże podobieństwo do autosomu Nr 9 wg konwencji z Reading. W szeregu wypadkach przyjmowano kompromisowe sformułowania, jeżeli chodziło o przedstawienie mniej wyraźnych prążków na danym ramieniu chromosomu. Jest to bowiem cecha zależna od jakości chromosomów uzyskiwanych rutynowo w określonej pracowni oraz również od precyzji przeprowadzenia wstępnej obróbki chromosomów i jakości zdjęć mikroskopowych. Przy znacznym skróceniu chromosomów dochodzi do połączenia sąsiednich prążków w jedno pasmo. W związku z tym nie podjęto się opracowania podziału chromatyd na strefy obejmujące mniejsze obszary, zawierające określoną liczbę najmniejszych prążków o ustalonej numeracji i stwarzając podstawę do wykrywania nowych oraz rozdzielonych prążków. Tak uczyniono już w stosunku do chromosomów człowieka. Cytogenetyka zwierząt nie osiągnęła jeszcze tego etapu precyzji.

Wyłoniony międzynarodowy komitet redakcyjny przygotowuje do opublikowania i szerokiego rozkolportowania szczegółowe teksty charakterystyk chromosomów i wzorów kariotypów wg wersji przyjętych na konferencji w Reading. Umożliwi to przejście wszystkich pracowni na jednolity system. W przyszłości zorganizowane będą dalsze konferencje, pracujące już na bazie przyjętych głównych ustaleń, celem dalszego uszczegółowienia i uprecyzjowania identyfikacji chromosomów zwierzęcych. Z biegiem czasu coraz większa liczba zwierząt będzie przebadana cytogenetycznie. Skorygowane zostaną wówczas różnice wynikające z zastosowanych diagnostycznych metod laboratoryjnych oraz wychwycone zostaną zmienności chromosomów istniejące między liniami hodowlanymi czy rasami. Jednakże dyskusje toczyć się będą w oparciu o wspólne kryteria jednolitych wzorców ustalonych na „Reading Karyotype Conference 1976”, którą dzięki temu można określić jako przełomowe wydarzenie w rozwoju cytogenetyki zwierząt domowych.

Adres autora: dr Paweł S. Sysa, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.