

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР  
ВСЕСОЮЗНАЯ ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ  
АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК имени В. И. ЛЕНИНА

ВСЕСОЮЗНЫЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЖИВОТНОВОДСТВА

И.Л. Гольдман, О.К. Смирнов, С.С. Бирбин

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
по цитогенетическому исследованию  
клеток крови крупного рогатого скота  
при селекции животных  
на устойчивость к лейкозу**

Москва – 1984

## Содержание

Введение.....	3
Метод приготовления кратковременных гемокультур для получения препаратов хромосом крупного рогатого скота.....	4
Анализ препаратов хромосом .....	5
Заключение.....	28
Приложение.....	33
Литература.....	34

УДК 636.2.082.12: 576.3(077)

Методические рекомендации разработали: И.Л. Гольдман, О.К. Смирнов – Всесоюзный научно-исследовательский институт животноводства, С.С. Бирбин – Саратовская научно-исследовательская ветеринарная станция. Одобрены и рекомендованы к изданию Учёным советом ВИЖа, протокол № 12 от 4 ноября 1983 г. Всесоюзный научно-исследовательский институт животноводства (ВИЖ), 1984

## ВВЕДЕНИЕ

Раннее выявление лейкоза у крупного рогатого скота является важной задачей практики животноводства. С этой целью в качестве дополнительного к гематологическому исследованию диагностического теста можно использовать патогенетический анализ клеток системы крови животных, при котором обнаруживаются: анеуплоидия (1–2), полиплоидия (3), повышение ассоциативной способности хромосом (4), единичные и клоны клеток, маркированные структурно измененными хромосомами (5).

Общепринято исследовать хромосомы крупного рогатого скота в одноклеточной культуре клеток костного мозга или трехдневной культуре лимфоцитов крови, стимулированных фито-гемагглютинином (6–8).

Использование этих систем для цитогенетической диагностики лейкозов крупного рогатого скота малоэффективно. Основная форма лейкоза крупного рогатого скота – лимфолейкоз, поэтому в костном мозгу, где преимущественно анализируются клетки миелоидного ряда (9), цитогенетические изменения, как правило, не выявляются. В длительных культурах лимфоцитов крови животных, больных лейкозом, наблюдается резкое снижение пролиферативных процессов (10–11), поскольку большинство пораженных лейкозом клеток не вступает в деление.

В наших многолетних исследованиях при использовании общепринятых цитогенетических методов из 204 обследованных коров в субклинической и даже клинической стадиях заболевания лишь у 16 животных (7,9%) были обнаружены клоны клеток, маркированные структурно измененными хромосомами, что явилось основанием для установления диагноза лейкоза (12).

При цитогенетическом исследовании подозреваемого на заболевание лейкозом крупного рогатого скота важно с максимальной степенью точности, причем быстро, получить необходимый ответ. Значимость цитогенетической экспертизы возрастает, когда дело идет о высокоценном быке-производителе

– 3 –

или о высокопродуктивной, используемой в племенной работе, корове.

Известно, что у животных, больных лейкозами, возможен выход в кровь недифференцированных, способных к митотическому делению лимфоидных клеток, которые могут быть обнаружены в кратковременных гемокультурах (13). На этом принципе основан метод прямого исследования хромосом в клетках крови крупного рогатого скота, который может быть использован для ранней диагностики лейкозов при селекции

животных на устойчивость к данному заболеванию.

Методические рекомендации рассчитаны на научных сотрудников и работников специализированных лабораторий, занимающихся вопросами ранней диагностики лейкозов.

## **МЕТОД ПРИГОТОВЛЕНИЯ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ГЕМОКУЛЬТУР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ХРОМОСОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

1. Из яремной вены животного стерильно на гепарин (250 ед.) берут 10 мл крови.

2. По 2 мл крови вносят в 4 пробирки, содержащие каждая по 10 мл раствора Хенкса (без бикарбоната) и колхицин (10–20 мкг/мл), pH доводят до 7,2 добавлением 0,5 мл раствора двузамещенного фосфата натрия (17,814 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  на 1000 мл дистиллированной воды).

3. Суспензию клеток пипетируют до равномерной взвеси и на 50 мин. помещают в термостат (38,5–39,5°), затем охлаждают до 10–15°.

4. Суспензию клеток переливают в центрифужные конические пробирки и при комнатной температуре 15 мин. центрифугируют при 1500 об/мин.

5. Надосадочную жидкость сливают. К осадку добавляют 10 мл 0,5%-ного раствора  $\text{CaCl}_2$ , клетки тщательно ресуспендируют и оставляют при комнатной температуре на 20 мин.

6. Проводят центрифугирование (15 мин., 1000 об/мин.), надосадочную жидкость сливают, к осадку осторожно каплями по стенкам пробирок добавляют 5 мл охлажденного до +4° фиксатора (3 части метанола, 1 часть ледяной уксусной кислоты). Через 10 минут пробирку извлекают из холодильника, осадок клеток тщательно ресуспендируют и на 20 мин. снова помещают в холодильник.

– 4 –

7. По окончании фиксации пробирки центрифугируют (5 мин., 1000 об/мин.). Надосадочную жидкость сливают, осадок ресуспендируют в 0,5–1,5 мл фиксатора (в зависимости от количества осадка).

8. На чистое обезжиренное предметное стекло наносят 2–3 капли суспензии клеток и после её растекания фиксатор поджигают.

9. После выгорания метанола препараты подсушивают над пламенем спиртовки.

10. Препараты окрашивают любым из общепринятых способов. Ход исследования представлен на рисунке 1.

Рис. 1. Схема получения препаратов хромосом в кратковременных гемокультурах крупного рогатого скота.

Последовательность операций	Температура (°С)	Время (мин.)
Взятие венозной крови		50
Культивирование клеток	+ (38,5-39,5)	
Первое центрифугирование		15
Гипотонизация клеток		20
Второе центрифугирование	Комнатная	15
Фиксация клеток		30
Третье центрифугирование	+4	5
Приготовление препаратов		10
Окраска хромосом		30

### Анализ препаратов хромосом

Наличие в цитологических препаратах кратковременных гемокультур митозов, отсутствующих у здорового крупного рогатого скота, является первым указанием на возможное заболевание животных лейкозом.

Анализ метафазных хромосом ведут с соблюдением современных требований, которые предъявляют к цитогенетическим исследованиям. Поскольку число митотически делящихся клеток в кратковременных гемокультурах больных лейкозом животных обычно не велико, необходимо иметь для изучения не менее 10–20 цитологических препаратов. Сначала под малым увеличением микроскопа (об. 6,3<sup>x</sup>, ок. 10 ) по координатам препаратоводителя отмечают расположение метафаз. Затем их просматривают под иммерсионным увеличением микроскопа (об. 100<sup>x</sup>, ок. 10<sup>x</sup>) и микрофотографируют.

– 5 –

В ряде случаев уже при обзорном анализе препаратов в метафазах выявляют морфологически изменённые хромосомы, что характерно для злокачественного поражения кроветворной ткани при лейкозах. При развитии патологического процесса регистрируют выраженную анеуплоидию. Подсчет числа хромосом и анализ кариотипа выполняют на микрофотографиях.

В качестве иллюстрации приводим материалы четырех цитогенетических экспертиз, на основании которых было установлено заболевание коров лейкозом.

1. Корова Любимая, 6 лет, черно-пестрой породы, обследована в свя-

зи с выделением ее в группу животных, подозрительных на заболевание лейкозом. Гематология: лейкоцитоз 24,3 тыс. в 1 мм<sup>3</sup> крови, лимфоцитоз – 89% - В кратковременной гемокультуре животного обнаружены множественные митозы (рис. 2).

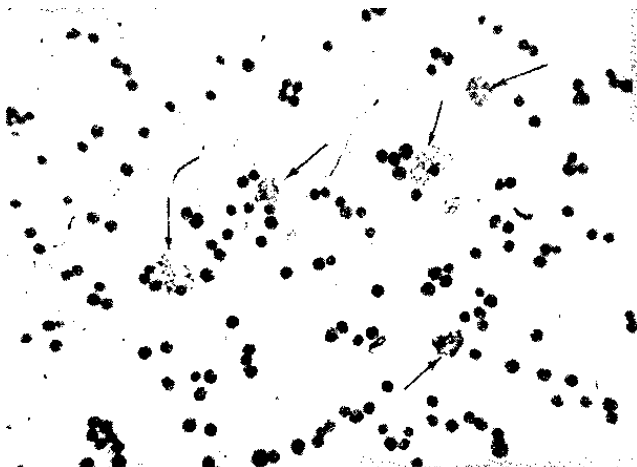


Рис. 2. Митозы (указаны стрелками) в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластомом.

I

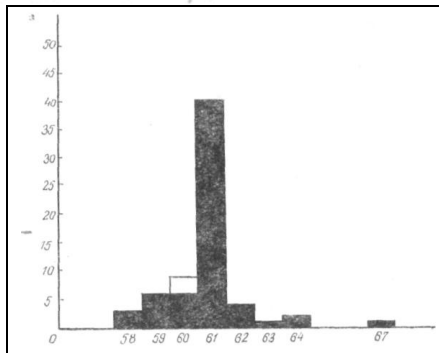
– 6 –

В совокупности были кариотипированы 66 метафаз с хорошим разбросом хромосом. В 63 из них (95,4%) присутствовала дополнительная крупная хромосома (M<sub>1</sub>) метацентрического типа.

$$\left( \bar{L}_1 : \bar{L}_{M_1} = 0,79, I_{M_1}^c = 45,6\% \right)^*$$

Модальным классом мутантного клона явились клетки, содержащие 61 хромосому (рис. 3–7).

Рис. 3. Гистограмма распределения чисел хромосом в клетках кратковременной гемокультуры коровы Любимой, больной гемоцитобластомом. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – число хромосом. Светлым контуром указаны нормальные клетки, темным – мутантные.



В пределах клеток, маркированных хромосомой  $M_1$ , выявился высокий уровень цитогенетической изменчивости (36,5%), состоящий в утере или добавлении отдельных аутосом. В 9 клетках ими были разные хромосомы (рис. 8). В 7 клетках отсутствовал один из гомологов первой пары аутосом (рис. 9–12), в 4 – пара маленьких аутосом (рис. 13 и 14), в трех клетках было зарегистрировано появление ещё одной  $(L_1 : \bar{L}_{1a} - 0,87, I_{M_1}^c - 35,3)$ , (рис. 15). хромосомы-маркера ( $M_2$ ) субметацентрического типа.

– 7 –

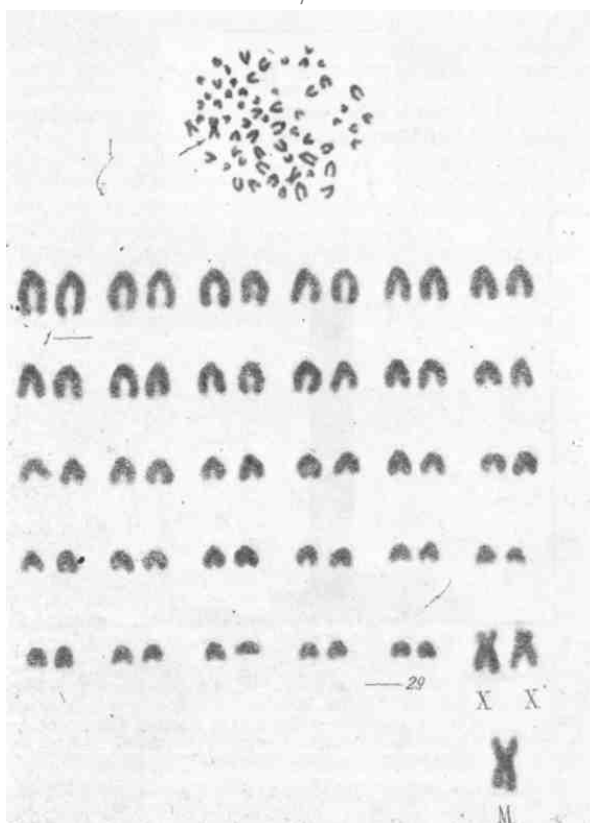


Рис. 4. Мутантная клетка, содержащая 61 хромосому, в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

– 8 –

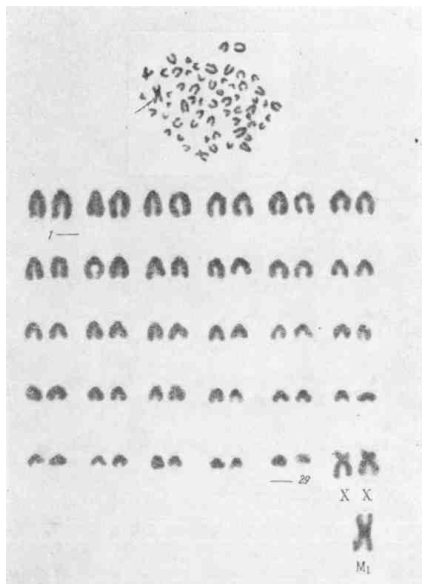


Рис. 5. Мутантная клетка, содержащая 61 хромосому, в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

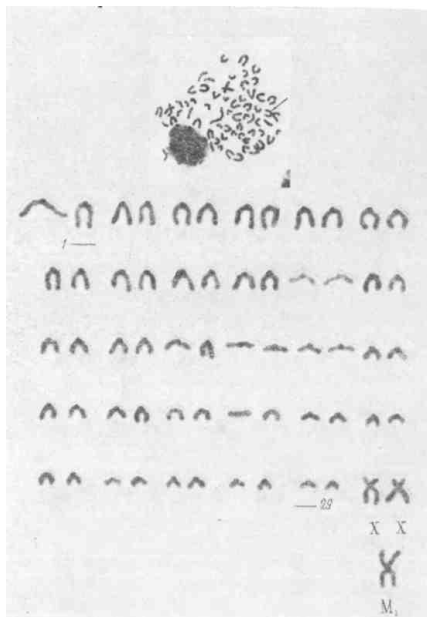


Рис. 6. Мутантная клетка, содержащая 61 хромосому и кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.



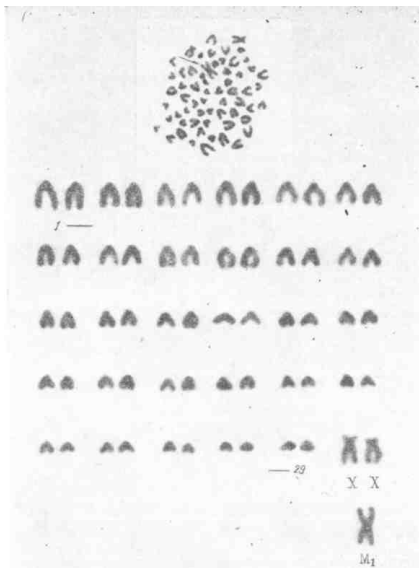


Рис. 7. Мутантная клетка, содержащая 61 хромосому, в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

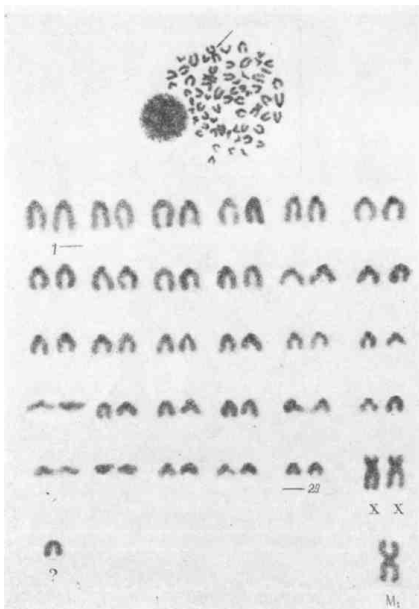


Рис. 8. Мутантная клетка, содержащая 62 хромосомы, в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

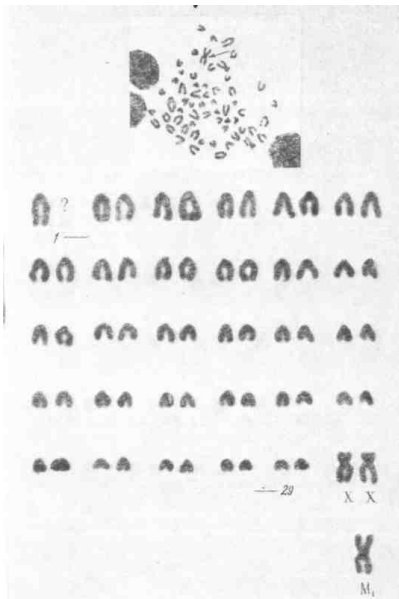


Рис. 9. Мутантная клетка, содержащая 60 хромосом в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

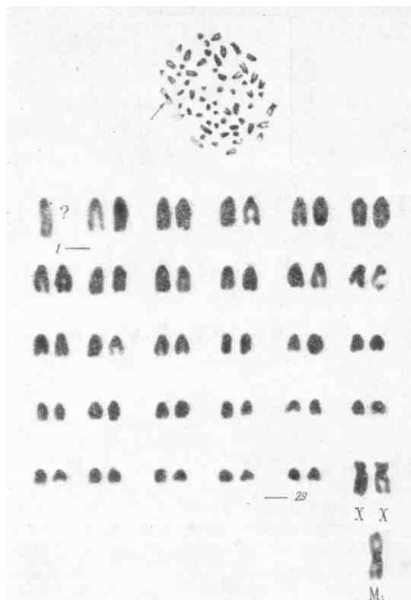


Рис. 10. Мутантная клетка, содержащая 60 хромосом в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

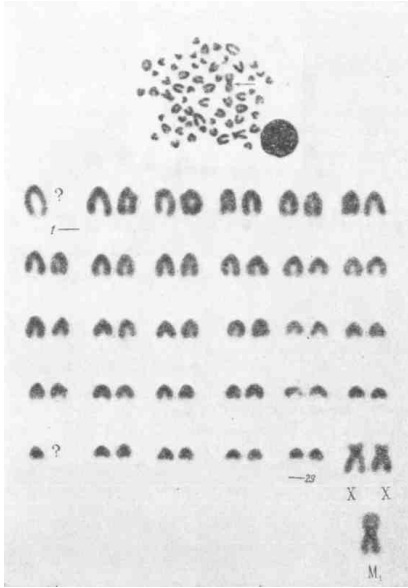


Рис. 11. Мутантная клетка, содержащая 59 хромосом в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

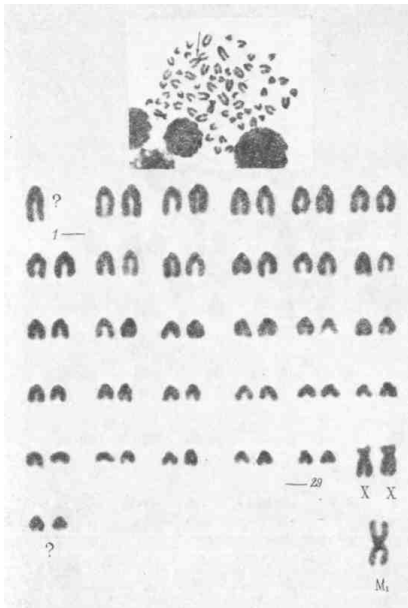


Рис. 12. Мутантная клетка, содержащая 62 хромосомы в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

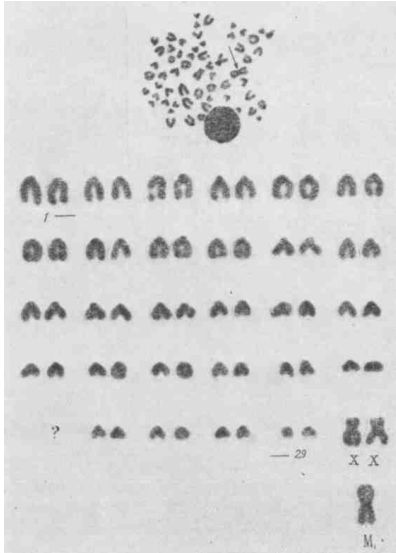


Рис. 13. Мутантная клетка, содержащая 59 хромосом в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

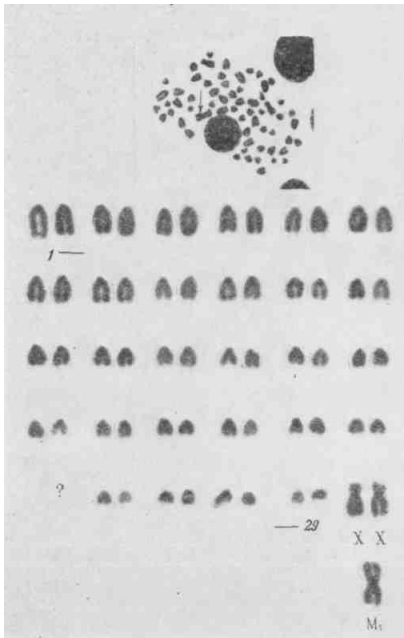


Рис. 14. Мутантная клетка, содержащая 59 хромосом в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, больной гемоцитобластозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

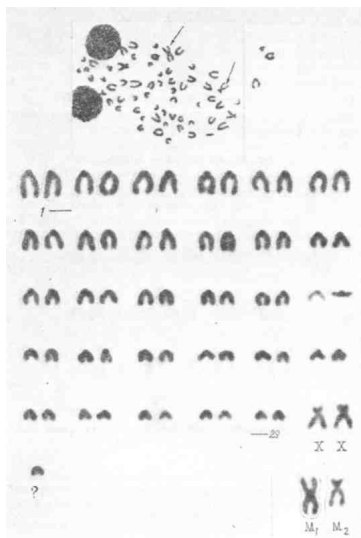


Рис. 15. Мутантная клетка, содержащая 63 хромосомы в кратковременной гемокультуре коровы Любимой, большой гемоцитобластом. Хромосомы- маркеры указаны стрелками.

– 19 –

Обнаружение в клетках кратковременной гемокультуры цитогенетических изменений, носящих клонный характер, в совокупности с гематологическими изменениями позволило считать корову заболевшей лейкозом. Патогистологический диагноз – гемоцитобластом.

2. Корова Пушинка, 8 лет, черно-пестрой породы, обследована в связи с выделением её в группу животных, подозрительных на заболевание лейкозом. Гематология: лейкоцитоз 13,0 тыс. в 1 мм<sup>3</sup> крови, лимфоцитоз – 70,5%.

В кратковременной гемокультуре животного были обнаружены и проанализированы 34 метафазы, среди которых 29 (85,3%) оказались с гипердиплоидным (69–79) набором хромосом. Модальным классом были клетки, содержащие 74 хромосомы (рис. 16). Во всех мутантных клетках отсутствовала одна из X-хромосом (рис. 17–19).

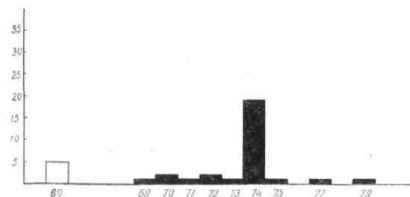


Рис. 16. Гистограмма распределения чисел хромосом в клетках кратковременной гемокультуры коровы Пушинки, больной лимфолейкозом. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – число хромосом. Светлым контуром указаны нормальные клетки, темным – мутантные.

Уровень изменчивости числа хромосом в мутантных клетках коровы Пушинки составил 36,0%. По совокупности гематологических и цитогенетических изменений у коровы Пушинки было установлено заболевание лейкозом. Патогистологический диагноз – лимфолейкоз.

– 20 –

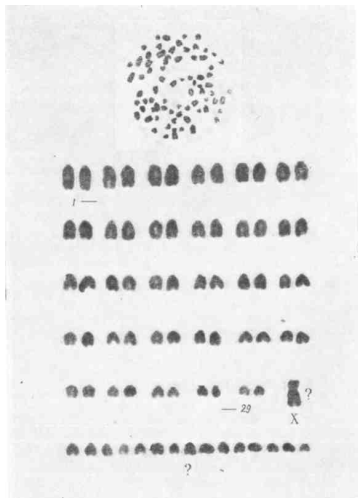


Рис. 17. Мутантная клетка, содержащая 74 хромосомы в кратковременной гемокультуре коровы Пушинки, больной лимфолейкозом.

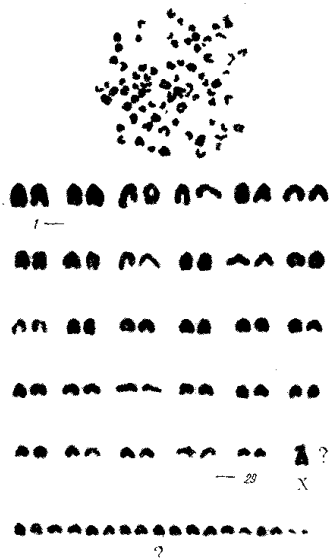


Рис. 18. Мутантная клетка, содержащая 77 хромосом в кратковременной гемокультуре коровы Пушинки, больной лимфолейкозом.

– 22 –

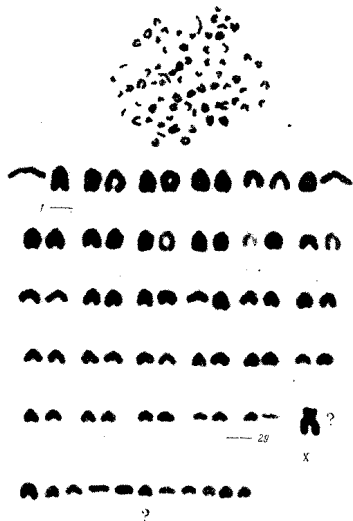


рис. 19. Мутантная клетка, содержащая 70 хромосом в кратковременной гемокультуре коровы Пушинки, больной лимфолейкозом.

3. Корова № 1292, 6 лет, черно-пёстрой породы. Цитогенетически обследована в связи с выделением её в группу животных, подозрительных на заболевание лейкозом. Гематология: лейкоцитоз 78 тыс. в 1 мм<sup>3</sup> крови, лимфоцитоз – 96,0%. Исследовано 43 метафазы. В 42 клетках (97,7%) имелась хромосома-маркер (M<sub>1</sub>) метацентрического типа (Li :L<sub>M1</sub> – –0,96, Г<sup>1</sup><sub>M1</sub>, –48,5%), (рис. 20). В модальном классе мутантных клеток содержалось по 63 хромосомы (рис. 21 и 22).

Уровень анеуплоидии мутантных клеток, маркированных хромосомой M<sub>1</sub> составил 30,9%. В 7 клетках содержалось по две идентичных маркерных хромосомы (рис. 23).

По совокупности выраженных гематологических и цитогенетических изменений у коровы № 1292 был установлен лейкоз. Патогистологический диагноз – лимфолейкоз.

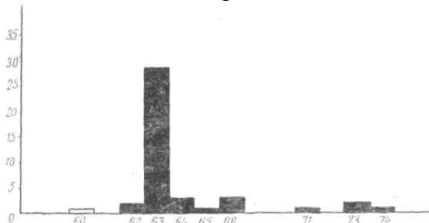


Рис. 20. Гистограмма распределения чисел хромосом в клетках кратковременной гемокультуры коровы 1292, больной лимфолейкозом. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – число хромосом. Светлым контуром указаны нормальные клетки, темным – мутантные.

4. Корова Красотка, 8 лет, черно-пестрой породы, цитогенетически обследована в связи с выделением её в группу животных, подозрительных на заболевание лейкозом. Гематология: лейкоцитоз – 206,0 тыс. в 1 мм<sup>3</sup> крови, лимфоцитоз – 98%. 24

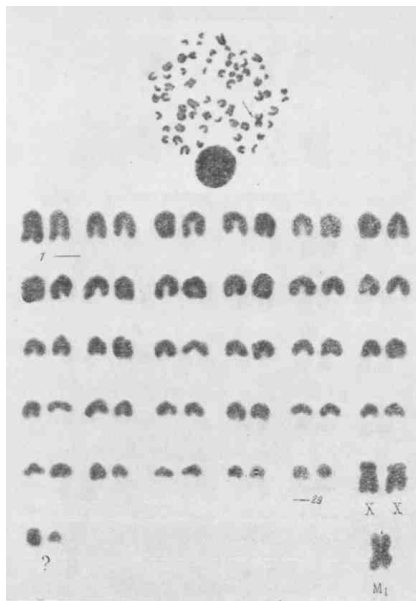


Рис. 21. Мутантная клетка, содержащая 63 хромосомы в кратковременной гемокультуре коровы 1292, больной лимфолейкозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

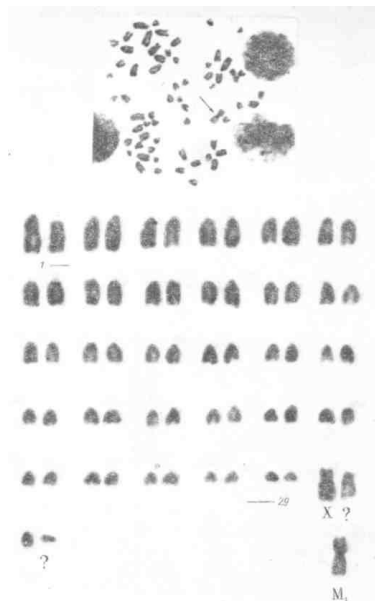


Рис. 22. Мутантная клетка, содержащая 63 хромосомы в кратковременной гемокультуре коровы 1292, больной лимфолейкозом. Хромосома маркер указана стрелкой.

– 26 –

В 16 препаратах кратковременной гемокультуры животного были обнаружены и проанализированы 173 метафазы; в 171 из них (98,3%) имелась дополнительная хромосома-маркер (Mi) метацентрического типа ( $L_1^a : L_{M_1}^a - 1,13, I_{M_1}^c - 46,5$ ), См. рис. 24.

Модальным классом были клетки, содержащие 61 хромосому (рис. 25–27). Вариации в числе хромосом в мутантных клетках составили



35,0%. Патогистологический диагноз – лимфолейкоз.

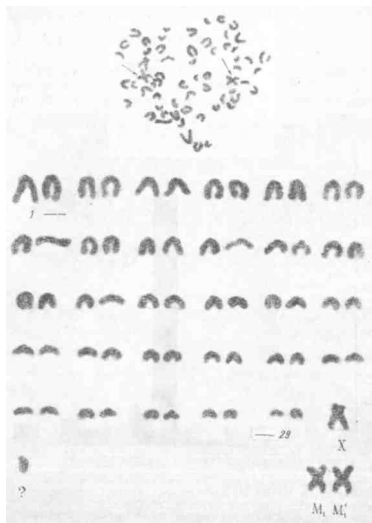


Рис. 23. Мутантная клетка, содержащая 62 хромосомы в кратковременной гемокультуре коровы 1292, больной лимфолейкозом. Хромосомы-маркеры указаны стрелками.

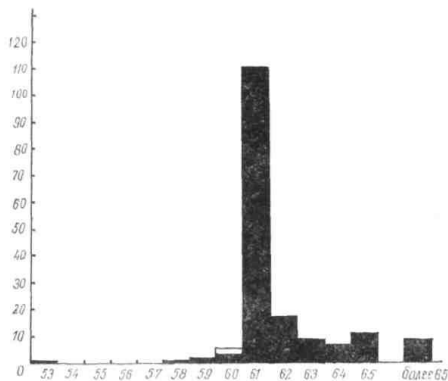


Рис. 24. Гистограмма распределения чисел хромосом в клетках кратковременной гемокультуры коровы Красотки, больной лимфолейкозом. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – число хромосом. Светлым контуром указаны нормальные клетки, темным – мутантные.

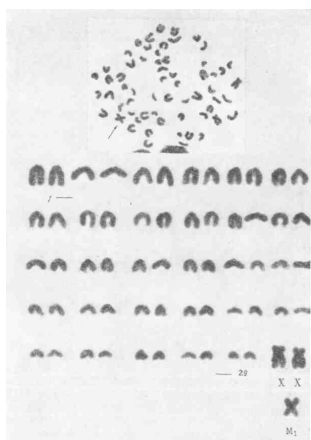


Рис. 25. Мутантная клетка, содержащая 61 хромосому в кратковременной гемокультуре коровы Красотка, больной лимфолейкозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

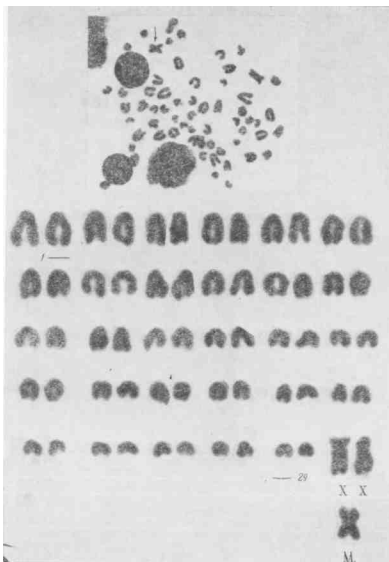


Рис. 26. Мутантная клетка, содержащая G1 хромосому в кратковременной гемокультуре коровы Красотки, больной лимфопейкозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

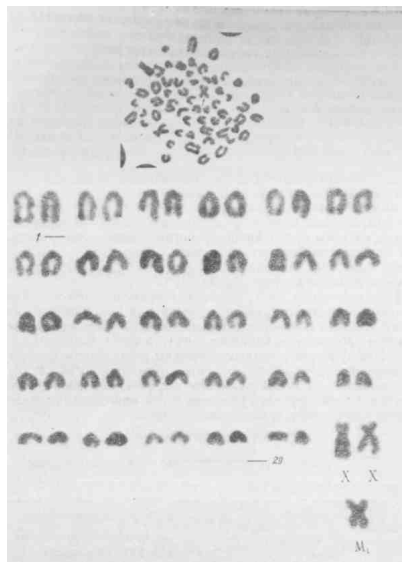


Рис. 27. Мутантная клетка, содержащая b1 хромосому в кратковременной гемокультуре коровы Красотки, больной лимфопейкозом. Хромосома-маркер указана стрелкой.

## Заключение

Цитогенетическое исследование лимфоидных клеток кратковременных гемокультур является более информативным по сравнению с исследованием длительных гемокультур, поскольку ФГА оказывает преимущественное стимулирующее влияние лишь на нормальные лимфоциты, что скрывает картину изменений генетической конституции клеток при лейкозах.

В кратковременных гемокультурах крупного рогатого скота при лейкозах обнаруживается комплекс кариологических изменений, имеющих инвариантой выраженную анеуплоидию гипердиплоидного типа с появлением хромосом-маркеров в подавляющем большинстве случаев сформированных по типу робертсоновских транслокаций. Наличие общих хромосом-маркеров указывает на присутствие клонов и отличающихся различными сдвигами в кариотипах подклонов злокачественных клеток.

Для обнаружения этих кариологических аномалий требуется непродолжительное по времени исследование препаратов хромосом лимфоидных клеток кратковременной гемокультуры.

Центральным моментом цитогенетической изменчивости клеток системы крови крупного рогатого скота при лейкозах является повышенная мутабельность аберрантных клеток, которую можно рассматривать как составной компонент процесса малигнизации клеток.

Идентификация робертсоновских транслокаций хромосом методом дифференциального окрашивания в дальнейшем позволит ответить на вопрос о специфичности аберраций хромосом при заболевании крупного рогатого скота лейкозом.

В совокупности с гематологическим исследованием цитогенетический анализ кратковременных гемокультур может быть использован для целей ранней и дифференциальной диагностики лейкозов крупного рогатого скота при селекции животных на устойчивость к этому заболеванию.

**Оборудование, материалы, реактивы и препараты,  
необходимые для исследования хромосом крупного рогатого скота  
в кратковременных гемокультурах**

**ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

1. Биологический термостат на 37,5°.
2. Бытовой холодильник
3. Лабораторная центрифуга
4. Микроскоп с иммерсионной системой и микрофотонасадкой
5. Иглы для взятия крови
6. Спиртовая горелка
7. Пробирки по 50 мл
8. Центрифужные пробирки
9. Мерные пипетки от 1 до 10 мл
10. Пастеровские пипетки
11. Предметные и покровные стекла
12. Вата
13. Марля
14. Липкий пластырь
15. Карандаш по стеклу
16. Термометр от 0 до 50°

**РЕАКТИВЫ И ПРЕПАРАТЫ**

1. Раствор Хенкса (без бикарбоната)
2. Гепарин
3. Колхицин
4. Двухзамещенный фосфат натрия
5. Хлористый кальций
6. Дистиллированная вода
7. Этанол
8. Метанол
9. Ледяная уксусная кислота
10. Краска Гимза

## Литература

1. Гольдман П.Л., Мутузкин Л.И., Живалев П.К. Цитогенетика лейкозов крупного рогатого скота, С/х за рубежом, сер. Животноводство, 1970; 40–45.
2. Лемеш В. М., Островская Л. П. Цитогенетическая характеристика лимфоидной ткани крупного рогатого скота при лейкозах. Труды НИИЭВ им. Вышелесского, 15 : 20–26.
3. Живалев П.К., Гольдман П.Л. Полиплоидные клетки гемопозитической ткани крупного рогатого скота в норме и при лейкозе. «Цитология и генетика», 1973, 3 : 279–281.
4. Живалев П.К., Гольдман П.Л. Ассоциации хромосом крупного рогатого скота в норме и при лейкозе. Сб. ВИЖа, 1972. 27 : 39 40.
5. Мутузкин Л. П. Обнаружение клеточных клонов в костном мозге крупного рогатого скота при лейкозе. Ветеринария, 1937, 10:35 37.
6. Яковлев А. Ф. Исследования хромосом сельскохозяйственных животных. ВНИИРГЖ, Лениздат, 1976: 1 65.
7. Гольдман И. Л., Добрянов Л. С, Карликов Д. В., Живалев И.К. Цитогенетическая лаборатория для исследования хромосом животных и птиц. Вестник с.-х. науки, 1970, 3 : 96–100.
8. Методические рекомендации по исследованию хромосом клеток системы крови крупного рогатого скота в норме и при лейкозах. М., ВИЖ, 1980 : 1–52.
9. Олиницы К.Д. Хромосомы при раке. М., Медицина, 1982:232.
10. Адомайтепе Д.Ю., Тамошюнас В.П, Садаускас П.Б. Бласт-трансформация лимфоцитов периферической крови крупного рогатого скота в культурах *in vitro* при хроническом лимфолейкозе. Труды ЛИ Лит. ССР, сер. В, 1973 : 131.
11. Арак А. П., Гольдман И. Л. Морфологические тесты ранней диагностики лимфолейкоза крупного рогатого скота. Доклады ВАСХНИЛ, 1977, 9 : 21-22.
12. Гольдман И.Л., Живалев И.К., Дун Е.А. Хромосомы-маркеры мутантных клеток системы крови при лейкозах крупного рогатого скота. Доклады ВАСХНИЛ, 1983, 0:32-34.
13. Бирбин С. О Кариологический анализ лимфоидных клеток крови в изучении этнологии лейкоза. Ветеринария, 1978, 5 : 37–40.

Методические рекомендации по цитогенетическому исследованию  
клеток крови крупного рогатого скота при селекции животных  
на устойчивость к лейкозу  
Редактор Л. П. Нечипорук  
Подписано к печати 6/II-1984 г. Заказ 248 Тираж 500 экз.  
Цена 20 коп.  
142012, Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровины, ВИЖ  
Типография ВАСХНИЛ