

ZASADNOŚĆ DIAGNOSTYKI CHIMERYZMU KOMÓRKOWEGO 60,XX/60,XY U CIELĄT URODZONYCH Z CIĄŻY MNOGICH RÓŻNOPLCIOWYCH

Anna Kozubska-Sobocińska, Grzegorz Smołucha

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa

Abstrakt

Na podstawie wieloletnich badań prowadzonych u bydła przyjmuje się, że zjawisko ciąży mnogich dotyczy około 2% urodzeń, natomiast 82–95%, a nawet 97% jalołek pochodzących z ciąży bliźniaczych różnopłciowych posiada chimeryzm leukocytarny (60,XX/60,XY) i frymartyzizm, natomiast pozostałe 3–18% samic rozwija się prawidłowo. Biorąc pod uwagę fakt, że częstość ciąży mnogich u bydła mlecznego w ostatnim czasie znacząco wzrosła, u niektórych ras nawet do 20%, można przypuszczać, że wzrosła również liczba płodnych bliźniaczek. Taką tendencję potwierdziły także badania cytomolekularne jalołek rasy HF urodzonych z męskim współbliźniakiem, których wyniki pozwoliły na stwierdzenie że 12,5% takich jalołek nie wykazuje frymartyzmu i może być kwalifikowane do rozrodu. Z tego powodu niezwykle ważne jest wczesne i precyzyjne rozpoznanie samic z kariotypem 60,XX i urodzonych z ciąży mnogich różnopłciowych, gdyż zapobiega to eliminacji z hodowli cennego materiału żeńskiego. Uwzględniając te argumenty i rosnące potrzeby szybkiej diagnostyki frymartyzmu, konieczne są badania cytomolekularne cieląt wieloraczków, dające podstawę do sformułowania trafnych wytycznych i zaleceń selekcyjnych, ograniczających nakłady finansowe spowodowane utrzymaniem zwierząt nieprzydatnych w rozrodzie.

Słowa kluczowe: chimeryzm 60,XX/60,XY, frymartyzizm, diagnostyka cytomolekularna, bydło rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej

Wstęp

Zjawisko chimeryzmu komórkowego oznacza występowanie u danego osobnika dwóch lub kilku linii komórkowych o różnych założeniach genetycznych. Chimeryzm XX/XY, pojawiający się w okresie rozwoju płodowego, jest efektem implantacji do zarodka komórek pochodzących od matki lub w przypadku ciąży mnogiej od współbliźniaka. Chimeryzm może też powstać na sku-

tek fuzji zygot, a także być efektem równoczesnego zapłodnienia dwoma plemnikami komórki jajowej i ciała kierunkowego (Ford, 1969; Jankowski i Ildstad, 1997).

U bydła chimeryzm komórkowy najczęściej obserwuje się u osobników pochodzących z ciąży bliźniaczych lub mnogich różnojajowych, zarówno jedno- jak i różnopłciowych. Obecność kilku linii komórkowych jest wynikiem tworzenia się, wspólnego krwioobiegu między rozwijającymi się zarodkami i wymiany tkanki krwiotwórczej poprzez anastomozy, czyli połączenia naczyniowe między błonami płodowymi współbliźniaków (Kastli, 1974; Khan i Foley, 1994).

Wpływ chimeryzmu komórkowego 60,XX/60,XY na płodność nosicieli

Na podstawie wieloletnich badań, przeprowadzonych na różnych populacjach bydła, przyjmuje się, że 82–95% jałówek pochodzących z ciąży mnogich różnopłciowych to nosicielki chimeryzmu leukocytnego i związanego z nim frymartyzmu (Kozubska-Sobocińska i in., 2019). Frymarty, czyli samice o kariotypie 60,XX/60,XY, są bezpłodne, a jałowosc spowodowana jest rozległymi zmianami patologicznymi układu rozrodczego. Zewnętrzne narządy płciowe w większości przypadków są typowo samicze, natomiast najczęściej rejestrowane zmiany dotyczą powiększonej lechtaczki, małej, często ślepo zakończonej pochwy, hypo-, a nawet aplastycznej macicy (Khan i Foley, 1994; Zhang i in., 1994; Peretti i in., 2008). Hypoplastyczne, czasem zmaskulinizowane gonady zawierają struktury jajnikowo-jądrowe, a w nielicznych przypadkach struktury przypominające nowotwór rozwijający się w jednowarstwowym nabłonku (Padula, 2005; Kozubska-Sobocińska i in., 2011). Należy podkreślić, że wielkość procentowego udziału linii komórkowej XY, zapożyczonej od męskiego współbliźniaka, nie determinuje stopnia maskulinizacji narządów rozrodczych frymarty, o czym świadczą nieprawidłowe wewnętrzne narządy płciowe stwierdzane często przy niewielkim odsetku komórek męskich (Nowacka i in., 2004; Padula, 2005; Esteves i in., 2012; Kozubska-Sobocińska i in., 2016). Warto również wspomnieć, że niejednokrotnie w badaniach cytogenetycznych diagnozuje się przypadki wystąpienia chimeryzmu komórkowego u jałówek rejestrowanych w dokumentacji hodowlanej jako pochodzące z pojedynczych urodzeń, w sytuacji gdy dochodzi do obumarcia męskiego współbliźniaka we wczesnym okresie płodowym (Esteves i in., 2012; Szczerbal i in., 2014; Iannuzzi i in., 2021).

Od wielu lat prowadzona jest dyskusja dotycząca wpływu obecności osobników żeńskich w okresie rozwoju zarodkowego na późniejszą przydatność rozplodową samców pochodzących z bliźniąt lub wieloraczków różnej płci (Kozubska-Sobocińska i Rejduch, 2008; Kozubska-Sobocińska i in., 2016). Liczne badania bliźniąt bydłych wykazały, że buhaje z chimeryzmem leukocytnym 60,XX/60,XY najczęściej charakteryzują się nieodbiegającymi od ogólnie przyjętych norm parametrami płodności, jakości nasienia i jego przydatności do mrożenia i w związku z tym takie buhajki można warunkowo dopuścić do rozrodu (Gustavsson, 1977; Kovács i Karakas, 1997). Z kolei szereg innych doniesień sugeruje obniżenie wskaźników płodności u takich buhajów, a szczególnie wskaźnika niepowtarzalności rui oraz parametrów

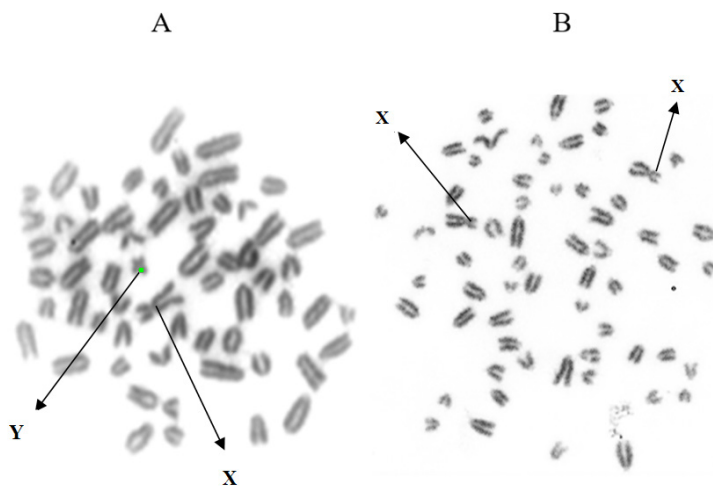
nasienia (De Giovanni i in., 1975; Cribiu i Popescu, 1982; Świtoński i in., 1991). Ocena jakości nasienia, prowadzona w oparciu o badania ejakulatów uzyskanych od buhajów o kariotypie 60,XX/60,XY, wykazała istotne lub wysoko istotne obniżenie objętości ejakulatów, ruchliwości i koncentracji plemników oraz wyższy procent plemników uszkodzonych z wadami morfologicznymi głównymi i podrzędnymi, a także większą częstość występowania zmian degeneracyjnych w strukturze jąder, niekiedy azoospermie i słabe libido (Dunn i in., 1979; Rejduch i in., 2011).

Diagnostyka chimeryzmu komórkowego

Metoda konwencjonalna oceny kariotypu

Badania cytogenetyczne zwierząt hodowlanych mają na celu identyfikację aberracji chromosomowych i wad kariotypu, wywierających z reguły niekorzystny wpływ na płodność i rozwój zwierząt. Szczególnym rodzajem nieprawidłowości kariotypu jest chimeryzm leukocytarny, wyrażany formułą $2n,XX/2n,XY$, którego diagnoza polega na identyfikacji linii komórkowych różniących się zestawem heterosomów.

Nieprawidłowość ta może być w prosty sposób diagnozowana w kariotypie bydła. Ze względu na specyficzną morfologię chromosomów u tego gatunku: dwadzieścia dziewięć par akrocentrycznych autosomów oraz charakterystyczne heterosomy X i Y (meta- lub submetacentryki), możliwa jest identyfikacja chimeryzmu 60,XX/60,XY w mikroskopie świetlnym, bezpośrednio na preparatach chromosomowych, barwionych rutynowo barwnikiem Giemsy (fot. 1) (Dunn i in., 1979; Long, 1990; Słota i in., 2000; 2004).



Fot. 1. Chromosomy metafazowe jałówki o kariotypie 60,XX/60,XY: linia komórkowa 60,XX (A) i linia komórkowa 60,XY (B)

Photo 1. Metaphase chromosomes of a heifer with 60,XX/60,XY karyotype: cell lines 60,XX (A) and 60,XY (B)

W przypadku innych gatunków należących do *Bovidae*, takich jak owce czy kozy, u których chimeryzm komórkowy występuje z podobną częstością, identyfikacja chromosomów płci wymaga zastosowania technik barwienia różnicowego takich jak CBG, GTG, RBA i QFQ, z których najbardziej przydatna jest technika CBG, gdyż umożliwia odróżnienie akrocentrycznego heterosomu X od chromosomów autosomalnych, ze względu na jego charakterystyczną cechę, jaką jest słabo zabarwiony prążek C w rejonie heterochromatyny centromerowej (Iannuzzi i Di Berardino, 2008).

Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

Obecnie coraz szersze zastosowanie w diagnostyce cytogenetycznej znajdują badania molekularne chromosomów techniką hybrydyzacji *in situ* (FISH). Ta cytochemiczna metoda polegająca na hybrydyzacji specyficznych sekwencji DNA lub RNA, znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi, z komplementarnymi odcinkami chromosomów utrwalonych na szkiełku mikroskopowym, może być wykorzystana w diagnozie niewielkich mutacji strukturalnych, fizycznym mapowaniu genów oraz identyfikacji chromosomów X i Y zarówno w komórkach somatycznych, jak i rozrodczych (Słota i in., 2003; Kozubska-Sobocińska i in., 2009; Villagómez i in., 2009; Ron i in., 2011; Barasc i in., 2014; Danielak-Czech i in., 2016).

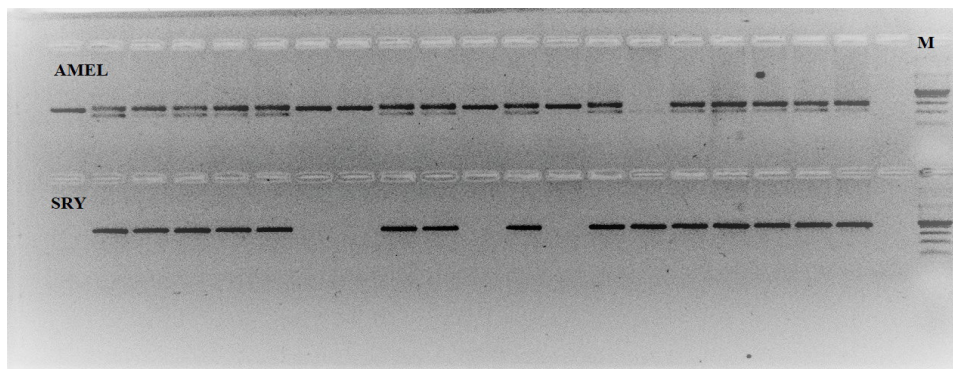
W przypadku ewentualnego utworzenia się połączeń naczyniowych między błonami płodowymi zarodków pochodzących z różnopłciowych ciąży mnogich, zastosowanie techniki FISH umożliwia precyzyjną identyfikację heterosomów X i Y, będących markerami żeńskiej i męskiej linii komórkowej (Kozubska-Sobocińska i in., 2003; 2016; Rychlik i in., 2005). Sondy molekularne stosowane w diagnostyce chimeryzmu XX/XY to najczęściej sondy malujące całe chromosomy płci lub ich fragmenty, czy też identyfikujące geny specyficzne dla heterosomów (np. gen *SRY*, *AMELY*, *AMELX*) (Rejduch i in., 2000; 2004; Revay i in., 2002; Peretti i in., 2008).

Diagnostyka cytomolekularna chimeryzmu komórkowego

W ostatnich latach do cytomolekularnego pakietu diagnostycznego wykorzystującego techniki kariotypowania i identyfikacji heterosomów dołączono analizy sekwencji mikrosatelitarnego DNA (STR – short tandem repeats) i analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz nowe, szybkie i precyzyjne techniki molekularne. Do technik tych należą porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH), metoda QF-PCR (quantitative fluorescence PCR) oparta na analizie wybranych markerów STR, technika ddPCR (droplet digital PCR), czy Real-Time PCR – ilościowy test PCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym, uwzględniający STR-y specyficzne dla chromosomów płci (Martinez-Royo i in., 2009; Villagómez i in., 2009; Qiu i in., 2018; Szczerbal i in., 2019).

Ważnymi markerami stosowanymi w analizach molekularnych do identyfikacji linii komórkowych XX i XY są geny zlokalizowane na heterosomach, a zwłaszcza gen *SRY* – determinujący płć męską i gen amelogeniny występujący w dwóch wariantach *AMELX* i *AMELY*, specyficznych odpowiednio dla chromosomu X i Y. Różnice między wariantami genu amelogeniny polegają na występowaniu delekcji 6 pz w intronie

1 genu *AMELX* w stosunku do intronu 1 genu *AMELY*. Delecja ta jest wykrywana techniką PCR i elektroforezy żelowej. Dwa prążki DNA wskazują na dwa warianty genu *AMELX* i *AMELY* (linia komórkowa XY), natomiast jeden prążek świadczy o obecności wyłącznie wariantu genu *AMELX* (linia XX)(fot. 2) (Qiu i in., 2018; Kozubka-Sobocińska i in., 2019).



Fot. 2. Analiza elektroforetyczna próbek bydlęcego DNA z amplifikacją genów *SRY* (widoczny jeden prążek) i *AMEL*; XY – buhajki (widoczne dwa prążki), XX – jałówki (widoczny jeden prążek), M – 100 bp marker DNA. Brak prążka oznacza brak amplifikacji.

Photo 2. Electrophoretic analysis of bovine DNA samples with amplification of *SRY* (one band visible), and *AMEL* genes; XY – bulls (two bands visible), XX – heifers (one band visible), M – 100 bp DNA marker. No bands means no amplification.

Należy zaznaczyć, że zastosowanie metod molekularnych umożliwia identyfikację aberracji submikroskopowych, niewidocznych w standardowym badaniu cytogenetycznym, z niespotykaną jak dotąd rozdzielczością, sięgającą od kilkuset do kilkunastu, czy nawet kilku par zasad, bez konieczności prowadzenia hodowli komórkowej (Mc Niel i in., 2006; Kozubka-Sobocińska i in., 2016; 2019).

Wielokrotnie podejmowano próby oceny przydatności metod cytogenetycznych i molekularnych do identyfikacji różnych linii komórkowych, zarówno we krwi jak i w innych tkankach. Potwierdzają to badania próbek krwi oraz fibroblastów skóry uzyskanych od cieląt pochodzących z jedno- i różnopłciowych ciąży bliźniaczych (Plante i in., 1992; Nowacka i in., 2004; Mc Niel i in., 2006). Stwierdzono, że tylko metody molekularne, takie jak analizy polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnego DNA, umożliwiają diagnozę chimeryzmu komórkowego także u dwujajowych bliźniąt tej samej płci. Badania te pozwoliły na oszacowanie wiarygodności i efektywności metod określania chimeryzmu komórkowego, a także wykazały, że poziom populacji komórek otrzymanych od współrodzeństwa jest znacznie wyższy w krwi niż w innych tkankach (Rejduch i in., 2000; 2004).

Efekty badań cytomolekularnych cieląt urodzonych z ciąży mnogich różnopłciowych

Nosicielstwo nieprawidłowości kariotypu wiąże się zwykle z niepłodnością lub obniżoną płodnością, decydując o niskiej przydatności rozplodowej zwierząt hodow-

lanych obarczonych tymi wadami. Aberracje te nie mogą być rozpoznane bez przeprowadzenia diagnostyki cytogenetycznej, ponieważ na ogół występują u osobników o normalnym eksterierze (i w przypadku samców prawidłowych parametrach nasienia), a poprzez sztuczną inseminację mogą być szybko rozprzestrzeniane w populacjach, powodując straty w hodowli o istotnym znaczeniu ekonomicznym (Yimer i Rosnina, 2014; Raudsepp i Chowdhary, 2016; Danielak-Czech i in., 2020). Poprawę użytkowości rozplodowej w stadach zarodowych zwierząt gospodarskich można osiągnąć poprzez selekcję opartą na wczesnym diagnozowaniu i eliminacji zwierząt dotkniętych nieprawidłowościami kariotypu, w tym również chimeryzmem leukocytarnym, monitorując cytogenetycznie przede wszystkim młode osobniki przed ich wykorzystaniem w rozrodzie. W związku z tym w wielu krajach UE, w tym również w Polsce, funkcjonują systemy kontroli kariotypu rozplodników przeznaczonych do inseminacji (Ducos i in., 2008; Kozubska-Sobocińska i Danielak-Czech, 2017). W ostatnich latach zintensyfikowano program monitoringu cytogenetycznego włączając obligatoryjne badania cytogenetyczne wszystkich młodych buhajów (przed przeznaczeniem ich do rozrodu), czego efektem było wykrycie nowych kilkudziesięciu rearanzacji chromosomowych oraz bardzo licznych przypadków chimeryzmu komórkowego (Peretti i in., 2008; Ron i in., 2011; Kozubska-Sobocińska i in., 2019; Szczerbal i in., 2019). Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność systemu kontroli kariotypu rozplodników inseminacyjnych, uzasadniając potrzebę kontynuacji i intensyfikacji cytogenetycznych badań przesiewowych bydła hodowanego w Polsce, ze szczególnym uwzględnieniem młodych samców przed ich wykorzystaniem w rozrodzie, a także cieląt urodzonych z ciąży mnogich różnopłciowych (Kozubska-Sobocińska i Danielak-Czech, 2017; Kozubska-Sobocińska i in., 2019).

Aby podkreślić znaczenie nowych metod cytomolekularnych, stosowanych obecnie we wczesnej diagnostyce chimeryzmu komórkowego 60,XX/60,XY u cieląt pochodzących z heteroseksualnych ciąży mnogich, należy wyjaśnić iż wieloletnie badania różnych ras bydła wykazały że 82–95%, a nawet 97% jałówek pochodzących z różnopłciowych ciąży bliźniaczych ma chimeryzm leukocytarny (60,XX/60,XY) i frymartyzizm, natomiast pozostałe 3–18% samic rozwija się prawidłowo. Biorąc pod uwagę fakt, że częstość ciąży mnogich u bydła mlecznego w ostatnim czasie znacząco wzrosła, u niektórych ras nawet do 20%, można przypuszczać, że wzrosła również liczba płodnych bliźniaczek (Wiltbank i in., 2006; Bierman i in., 2010). Taką tendencję potwierdziły także badania cytomolekularne 24 jałówek rasy HF urodzonych z męskim współbliźniakiem, z których 3 charakteryzowały się prawidłowym kariotypem (60,XX). Wyniki te pozwoliły na stwierdzenie że 12,5% takich jałówek nie wykazuje frymartyzmu i może być kwalifikowane do rozrodu (Kozubska-Sobocińska i in., 2019). Z tego powodu niezwykle ważne jest wczesne i precyzyjne rozpoznanie samic z kariotypem 60,XX, a urodzonych z ciąży mnogich różnopłciowych, gdyż zapobiega to eliminacji z hodowli cennego materiału żeńskiego. Uwzględniając te argumenty i rosnące potrzeby szybkiej diagnostyki frymartyzmu, zasadne są poszukiwania różnych kombinacji technik molekularnych dających podstawę do sformułowania trafnych wytycznych i zaleceń selekcyjnych. Eliminacja ze stad hodowlanych zwierząt obarczonych anomaliami chromosomowymi zapobiega rozprzestrzenieniu

się tych wad genetycznych, a także ogranicza nakłady finansowe związane z utrzymaniem zwierząt nieprzydatnych w reprodukcji (Ducos i in., 2008; Danielak-Czech i in., 2020).

Należy również dodać, że wprowadzanie różnych kombinacji precyzyjnych i wydajnych technik molekularnych (takich jak: PCR, STR, Real-Time PCR, ddPCR) do pakietu diagnostycznego chimerizmu komórkowego pozwala na wykorzystanie do badań materiału mrożonego, co znacznie upraszcza kłopotliwą procedurę dostarczenia do laboratorium próbek świeżej krwi, w terminie do 24 godzin od momentu pobrania (Qiu i in., 2018; Kozubska-Sobocińska i in., 2019; Szczerali i in., 2019).

Efektom wczesnej diagnostyki cytomolekularnej chimerizmu komórkowego 60,XX/60,XY u cieląt pochodzących z ciąży mnogich różnopłciowych są ekspertyzy wydawane hodowcom, zawierające konkretne wskazania i zalecenia selekcyjne dotyczące przydatności do rozrodu nosicieli tej nieprawidłowości kariotypu (Kozubska-Sobocińska i Danielak-Czech, 2017; Kozubska-Sobocińska i in., 2019).

Piśmiennictwo

- Barasc H., Ferchaud S., Mary N., Cucchi M.A., Lucena A.N., Raymond-Letron I., Calgaro A., Bonnet N., Duzet A.M., Yerle M., Ducos A., Pinton A. (2014). Cytogenetic analysis of somatic and germinal cells from 38,XX/38,XY phenotypically normal boars. *Theor. Genet. Anim. Sci.*, 81: 368–372.
- Bierman C.D., Kim E., Shi X.W., Weigel K., Jeffery Berger P., Kirkpatrick B.W. (2010). Validation of whole genome linkage-linkage disequilibrium and association results, and identification of markers to predict genetic merit for twinning. *Anim. Genet.*, 41: 406–416.
- Cribiu E.P., Popescu C.P. (1982). Distribution and fertility of 60,XX/60,XY bulls. *Proc. 5th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim.*, Milan, ss. 215–221.
- Danielak-Czech B., Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B. (2016). Molecular cytogenetics in the diagnostics of balanced chromosome mutations in the pig (*Sus scrofa*) – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 16: 679–699.
- Danielak-Czech B., Kozubska-Sobocińska A., Smółucha G., Babicz M. (2020). Breeding and economic aspects of cytogenetic screening studies of pigs qualified for reproduction. *Animals*, 10, 1200; doi:10.3390/ani10071200.
- De Giovanni A., Popescu C.P., Succi G. (1975). Premiere etude cytogenetique dans un centre Italien d'insemination artificielle. *Ann. Genet. Sel. Anim.*, 7: 311–315.
- Ducos A., Revay T., Kovacs A., Hidas A., Pinton A., Bonnet-Garnier A., Molteni L., Słota E., Świtoński M., Arruga M.V., van Haeringen W.A., Nicolae I., Chaves R., Guedes-Pinto H., Andersson M., Iannuzzi L. (2008). Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenet. Genome Res.*, 120: 26–41.
- Dunn H.O., McEntee K., Hall C.E., Johnson R.M., Stone W.H. (1979). Cytogenetic and reproductive studies of bulls born co-twin to freemartins. *J. Reprod. Fertil.*, 57: 21–30.
- Esteves A., Båge R., Payan Carreira R. (2012). Freemartinism in Cattle. In *Ruminants: Anatomy, Behavior and Diseases*. New York, USA, Nova Science Publishers, ss. 99–120.
- Ford C.E. (1969). Mosaics and chimaeras. *Br. Med. Bull.*, 25: 104–109.
- Gustavsson I. (1977). Chromosome aberrations and their influence on reproductive performance of domestic animals – a review. *Z. Tierz. Zuchtungsbio.*, 97: 176–195.
- Iannuzzi L., Di Bernardino D. (2008). Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal cytogenetics. *J. Appl. Genet.*, 49: 357–366.
- Iannuzzi A., Parma P., Iannuzzi L. (2021). Chromosome abnormalities and fertility in domestic bovinds: a review. *Animals*, 11, 802; doi: 10.3390/ani11030802.

- Jankowski R.A., Hltdstad S.T. (1997). Chimerism and tolerance: from freemartin cattle and neonatal mice to humans. *Hum. Immunol.*, 52: 155–161.
- Kastli F. (1974). Heterosexual cattle twins. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 116: 423–428.
- Khan M.Z., Foley G.L. (1994). Retrospective studies on the measurements, karyotyping and pathology of reproductive organs of bovine freemartins. *J. Comp. Pathol.*, 110: 25–36.
- Kovács A., Karakas P. (1997). Routine chromosome investigations on cattle. *Abstr. V Colloq. Cytogenet.*, Balice, Poland, ss. 12–14.
- Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B. (2017). Zasadność systematycznej oceny kariotypu bydła kwalifikowanego do rozrodu. *Med. Weter.*, 73: 451–455.
- Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B. (2008). Identification of heterosomes in spermatozoa of rams with 54,XX/54,XY chimerism. *Vet. Med.-Czech.*, 53: 250–254.
- Kozubska-Sobocińska A., Słota E., Pieńkowska A. (2003). Zastosowanie techniki FISH do diagnozy chimeryzmu leukocytnego u owiec. *Med. Weter.*, 59: 987–989.
- Kozubska-Sobocińska A., Bugno-Poniewierska M., Słota E. (2009). Application of bovine heterosome painting probes to analysis of the bivalent in rams. *Ann. Anim. Sci.*, 9: 373–378.
- Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B., Słota E., Sysa P.S. (2011). New aspects of degenerative changes in reproductive system of freemartin heifers. *Ann. Anim. Sci.*, 11: 229–239.
- Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B., Rejduch B. (2016). Cytogenetic and molecular diagnostics of XX/XY chimerism in cattle, sheep, and goats – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 16: 989–1005.
- Kozubska-Sobocińska A., Smolucha G., Danielak-Czech B. (2019). Early diagnostics of freemartinism in Polish Holstein-Friesian female calves. *Animals*, 9, 971; doi:10.3390/ani9110971.
- Long S.E. (1990). Development and diagnosis of freemartinism in cattle. *In Pract.*, 12: 208–210.
- Martinez-Royo A., Dervishi E., Alabart J.L., Jurado J.J., Folch J., Calvo J.H. (2009). Freemartinism and FecXR allele determination in replacement ewes of the Rasa Aragonesa sheep breed by duplex PCR. *Theriogenology*, 72: 1148–1152.
- McNiel E., Madrill N.J., Treeful A.E., Buoen L.C., Weber A.F. (2006). Comparison of cytogenetics and polymerase chain reaction based detection of the amelogenin gene polymorphism for the diagnosis of freemartinism in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18: 469–472.
- Nowacka J., Switonski M., Mackowski M., Słota E., Radko A., Zabek T., Urbanik K. (2004). The use of cytogenetic and molecular techniques reveals ambiguity of the freemartinism diagnosis in cattle. *Czech J. Anim. Sci.*, 49: 239–243.
- Padula A.M. (2005). The freemartin syndrome: an update. *Anim. Reprod. Sci.*, 87: 93–109.
- Peretti V., Ciotola F., Albarella S., Paciello O., Dario C., Barbieri V., Iannuzzi L. (2008). XX/XY chimerism in cattle: clinical and cytogenetic studies. *Sex Dev.*, 2: 24–30.
- Plante Y., Schmutz S.M., Lang K.D.M., Moker J.S. (1992). Detection of leucochimaerism in bovine twins by DNA fingerprinting. *Anim. Genet.*, 23: 295–302.
- Qiu Q., Shao T., He Y., Muhammad A.-U.-R., Cao B., Su H. (2018). Applying real-time quantitative PCR to diagnosis of freemartin in Holstein cattle by quantifying SRY gene: a comparison experiment. *PeerJ*, 6, e4616.
- Raudsepp T., Chowdhary B. P. (2016). Chromosome aberrations and fertility disorders in domestic animals. *Annu. Rev. A. Biosci.*, 4: 15–43.
- Rejduch B., Słota E., Gustavsson I. (2000). 60,XY/60,XX chimerism in the germ cell line of mature bulls born in heterosexual twinning. *Theriogenology*, 54: 621–627.
- Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Radko A., Rychlik T., Słota E. (2004). The application of genetic markers for cell chimerism diagnosis in lambs. *J. Anim. Breed. Genet.*, 121: 197–203.
- Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B., Babicz M. (2011). Semen quality evaluation of young bulls carrying leukocyte chimerism 60,XX/60,XY. *Ann. UMCS, sect. EE, Zootechnica*, XXIX (3): 47–53.
- Revay T., Kovacs A., Rens W., Gustavsson I. (2002). Simultaneous detection of viability and sex of bovine spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, 14: 373–376.
- Ron M., Porat B., Band M.R., Weller J.I. (2011). Chimaerism detection in bovine twins, triplets and quadruplets using sex chromosome-linked markers. *Anim. Genet.*, 42: 208–211.
- Rychlik T., Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B., Sikora J. (2005). The phenomenon of cell chimerism in goats. *Vet. Med.-Czech*, 50: 311–314.

- Słota E., Danielak-Czech B., Pietraszewska J., Kozubska-Sobocińska A. (2000). Preliminary identification of the fragile X in two crossbred cows. *Vet. Med. – Czech*, 45: 7–9.
- Słota E., Kozubska-Sobocińska A., Kościelny M., Danielak-Czech B., Rejduch B. (2003). Detection of the XXY trisomy in a bull by using sex chromosome painting probes. *J. Appl. Genet.*, 44: 379–382.
- Słota E., Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B., Rejduch B., Kowol P., Żyga A. (2004). A note on cytogenetic monitoring of Polish Red cattle. *J. Anim. Feed Sci.*, 12: 65–71.
- Szczerbal I., Kociucka B., Nowacka-Woszuik J., Lach Z., Jaskowski J.M., Switon-ski M. (2014). A high incidence of leukocyte chimerism (60,XX/60,XY) in single born heifers culled due to underdevelopment of internal reproductive tracts. *Czech J. Anim. Sci.*, 59: 445–449.
- Szczerbal I., Nowacka-Woszuik J., Albarella S., Switon-ski M. (2019). Technical note: Droplet digital PCR as a new molecular method for a simple and reliable diagnosis of freemartinism in cattle. *J. Dairy Sci.*, 102(11):10100–10104.
- Świtoński M., Lechniak D., Landzwojczak D. (1991). Cytogenetic survey of bulls used in artificial insemination. Reproductive performance of XY/XX chimeric bulls. *Genet. Pol.*, 32: 227–233.
- Villagómez D.A.F., Parma P., Radi O., Meo G.D., Pinton A., Iannuzzi L., King W.A. (2009). Classical and molecular cytogenetics of disorders of sex development in domestic animals. *Cytogenet. Genome Res.*, 126: 110–131.
- Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S., Gümen A. (2006). Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65: 17–29.
- Yimer N., Rosnina Y. (2014). Chromosomal anomalies and infertility in farm animals: A review. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 37 (1): 1–18.
- Zhang T., Buoen L.C., Bradley B.A., Seguin E., Ruth G.R., Weber A.F. (1994). Diagnosis of freemartinism in cattle: the need for clinical and cytogenetic evaluation. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 204, 10: 1672–1675.

Zatwierdzono do druku: 12 VII 2022

Anna Kozubska-Sobocińska, Grzegorz Smolucha

LEGITIMACY OF DIAGNOSIS OF 60,XX/60,XY CELL CHIMERISM IN CALVES BORN FROM MULTIPLE DIFFERENT-SEX PREGNANCIES

SUMMARY

Based on many years of research in cattle, it is assumed that the phenomenon of multiple pregnancies affects about 2% of births, while 82–95% or even 97% of heifers from different-sex twin pregnancies have leukocyte chimerism (60,XX/60,XY) and freemartinism, while the remaining 3–18% of females develop normally. Considering that the frequency of multiple pregnancies in dairy cattle has recently increased significantly, up to 20% in some breeds, it can be assumed that the number of fertile twins has also increased. This tendency was also confirmed by cytomolecular studies of HF heifers born with a male twin, which allowed us to conclude that 12.5% of such heifers do not show freemartinism and may be qualified for reproduction. For this reason, early and precise identification of females with 60,XX karyotype and being born from multiple pregnancies of different sexes is extremely important as it prevents the

elimination of valuable female material from breeding. Considering these arguments and the growing need for quick diagnostics of freemartinism, cytomolecular studies of multiparous calves are necessary, giving the basis for formulating proper guidelines and selection recommendations, limiting the financial outlays caused by keeping animals unsuitable for reproduction.

Key words: 60,XX/60,XY chimerism, freemartinism, cytomolecular diagnostics, Polish Holstein-Friesian breed