



95-lecie Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN



Mikroskopia i Obrazowanie

95-lecie Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN

Mikroskopia i Obrazowanie

Autorzy tekstów i ilustracji

Seweryn Bajer
Zbigniew Baranowski
Cezary Bregier
Anna Ćmoch
Stanisław Dryl
Aleksandra Ellert-Miklaszewska
James. R. Fonseca
Konrad Gabrusiewicz
Andrzej Grębecki
Theodore L. Jahn
Anna Jakubiec-Puka
Maria Jerka-Dziadosz
Bożena Kamińska
Justyna Karolczak
Andrzej Kasprzak
Włodzimierz Kinastowski
Wanda Kłopocka
Jarosław Korczyński
Zbigniew Korwek
Aneta Kwiatkowska
Leszek Kuźnicki
Ewa Mikołajczyk
Michał Opas
Magdalena Osińska
Katarzyna Piwocka
Paweł Pomorski
Marta Pyskaty
Zdzisław Raabe
Małgorzata Sielska
Jerzy Sikora
Marzena Stefaniuk
Izabela Strzyżewska-Jówko
Liliana Surmacz
Joanna Szczepanowska
Zsuzsanna Szepesi
Kinga Szydłowska
Ewa Waclawek
Anna Wasik
Jolanta Wiejak
Grzegorz Wilczyński
Jakub Włodarczyk
Elżbieta Wyroba
Tomasz Zajkowski
Małgorzata Zawadzka

Instytut Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN

Mikroskopia i Obrazowanie

Pod redakcją
Leszka Kuźnickiego i Jerzego Sikory

Warszawa 2013

<http://rcin.org.pl>

Korekta: zespół
Projekt graficzny: Dariusz Kozłowski
Na okładce: Neuron z mózgu szczura. Fot. Jakub Włodarczyk

© Copyright by Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, 2013
All right reserved

ISBN: 978-83-927972-5-8

Dofinansowano ze środków Unii Europejskiej w ramach Projektu BIO-IMAGINE:
BIO-IMAGIning in research INnovation and Education, Nr kontraktu 264173

Skład komputerowy: Wydawnictwo Retro-Art, Dariusz Kozłowski,
01-052 Warszawa. ul. Anielewicza 30 lok. 58, tel. 22 838 18 28

Druk i oprawa: DRUKPOL, 00-739 Warszawa. ul. Stępińska 22/30
tel. 22 851 36 79

Spis treści

Wstęp – Leszek Kuźnicki	7
Rozmieszczenie larw chruścika <i>Molanna angustata</i> na Śniardwach i jeziorach przyległych – Leszek Kuźnicki	8
Zastosowania makrofotograficznej rejestracji do analizy ruchu i taksji pierwotniaków – Leszek Kuźnicki	9
Metoda rejestracji ruchu rzęsek u pływającego <i>Paramecium</i> – Leszek Kuźnicki	11
Pierwsze w piśmiennictwie zdjęcia (polaroid) rzęsek, obrazujące ich zachowanie podczas zmiany kierunku pływania pierwotniaka – Leszek Kuźnicki	13
Ilościowe badania okrężnego ruchu cytoplazmy w komórkach <i>Paramecium aurelia</i> i <i>P. bursaria</i> – Jerzy Sikora	14
Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych	18
Postępy na drodze poznania ruchów euglenoidalnych – Leszek Kuźnicki	19
Indukowana makropinocytoza u <i>Ameba proteus</i> – Leszek Kuźnicki	21
Badanie zjawisk skurczu u modeli glicerynowych ameb – Leszek Kuźnicki	22
Trójwymiarowa analiza ruchu plazmodium śluzowca <i>Physarum polycephalum</i> przy wykorzystaniu mikroskopu holograficznego Holmin, PZO – Leszek Kuźnicki	25
Różne metody obrazowania w badaniach <i>Paramecium</i> – Elżbieta Wyroba	27
Ultrastruktura mięśnia w procesach przystosowawczych i patologicznych – Anna Jakubiec-Puka	32
Pierwszy w Polsce Mikroskop Konfokalny – Paweł Pomorski	43
Tintinnina i ich loriki – Anna Wasik	47
Orzęski jako przedmiot badań morfogenetycznych – Maria Jerka-Dziadosz	50
Zastosowanie fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej – Jakub Włodarczyk	52
Zastosowanie zaawansowanego laserowego mikroskopu konfokalnego – Grzegorz Wilczyński	55
Mikroskopia całkowitego wewnętrznego odbicia – Andrzej Kasprzak	60
Obrazowanie mikrogleju w procesach patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym – Bożena Kamińska, Małgorzata Zawadzka, Kinga Szydłowska, Aleksandra Ellert- -Miklaszewska, Konrad Gabrusiewicz, Małgorzata Sielska	62

Pracownia Mikroskopii Konfokalnej	
– Jarosław Korczyński, Wanda Kłopocka	71
Cytometria przepływowa w Instytucie Nenckiego – Katarzyna Piwocka	83
Laserowa cytometria skaningowa – Joanna Szczepanowska	90
Indeks rzeczowy	94

Wstęp – Leszek Kuźnicki

Rozwój nauk biologicznych i medycznych wiąże się ściśle z postępem w zakresie technik badawczych. Mikroskopia jako metoda została odkryta i zastosowana w drugiej połowie XVII wieku przy wielkim udziale Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723). Dzięki jego konstrukcjom optycznym i opisom zostały zapoczątkowane badania niedostępnych dotychczas ludzkiemu oku pierwotniaków, bakterii i komórek organizmów tkankowych.

Kolejny przełom na polu technik był udziałem Wilhelma Conrada Röntgena (1845-1923). W roku 1895 odkrył on przenikliwe promieniowania jonizujące, zwane promieniowaniem X. Röntgen wykazał, że może być ono wykorzystane do analizy wnętrza konstrukcji metalowych i wizualizacji kośćca u żywych organizmów.

W latach trzydziestych kolejny wynalazek otworzył nowe pola badawcze w biologii i medycynie. Wykorzystując prace Władimira Zwornika (1889-1982) i Ernsta Ruska (1906-1988) w Zakładach Simensa zbudowano w 1938 mikroskop elektronowy. Na szeroką skalę technika ta rozwinęła się dopiero po II wojnie światowej. Współcześnie zaawansowana mikroskopia elektronowa pozwala na prowadzenie badań nie tylko na poziomie ultrastrukturalnym ale również atomowym.

„Mikroskopia” jest techniką zróżnicowaną, ale wyraźnie określoną. Inaczej przedstawia się sprawa z „obrazowaniem”. Samo pojęcie jak i jego zakres nie są ostre.

Każdy model graficzny jak i prezentacja przestrzenna w szczególności kiedy odwzorowuje jakiś obiekt żywy, czy martwy jest obrazowaniem. Dotyczy to również analizy zjawisk zachodzących w czasie. Jedną z form obrazowania jest film, który jako udoskonalona technika fotografii został wynaleziony w drugiej połowie XIX wieku w celu śledzenia i analizy szybkich ruchów człowieka i zwierząt, dopiero później wykorzystany jako narzędzie sztuki.

Współcześnie pojawiły się tendencje do zawężenia pojęcia „obrazowanie” do technik wykorzystujących elektronikę. Z tego punktu wiedzenia z obrazowaniem mamy do czynienia wtedy, kiedy następuje cyfrowe przetwarzanie informacji, pozwalające następnie na przekształcenie w obrazy rzeczywiste lub wytworzone. Same zjawiska i formy ich rejestracji mogą być najróżniejsze, natomiast dalsze koleje są te same – przetwarzanie w postać cyfrową i następnie syntetyczny obraz na ekranie.

W Instytucie im. Marcelego Nenckiego mikroskopia świetlna, elektronowa i różne techniki obrazowania były od ponad pół wieku z powodzeniem stosowane. Przyniosły one szereg godnych przypomnienia wyników.

Dla upamiętnienia 95-lecia utworzenia Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w książce zostały przedstawione dawne i współczesne dokonania na polu mikroskopii i obrazowania.

Rozmieszczenie larw chruścika *Molanna angustata* na Śniardwach i jeziorach przyległych – Leszek Kuźnicki

Instytut Nenckiego od zarania był ośrodkiem, w którym prowadzone są prace etologiczne i ekologiczne na stawonogach. Jednym z obiektów intensywnie badanych przez Jana Dembowskiego i jego uczniów była larwa chruścika *Molanna angustata*. Jest ona mieszkańcem strefy przybrzeżnej jezior i rzek krajów nad-

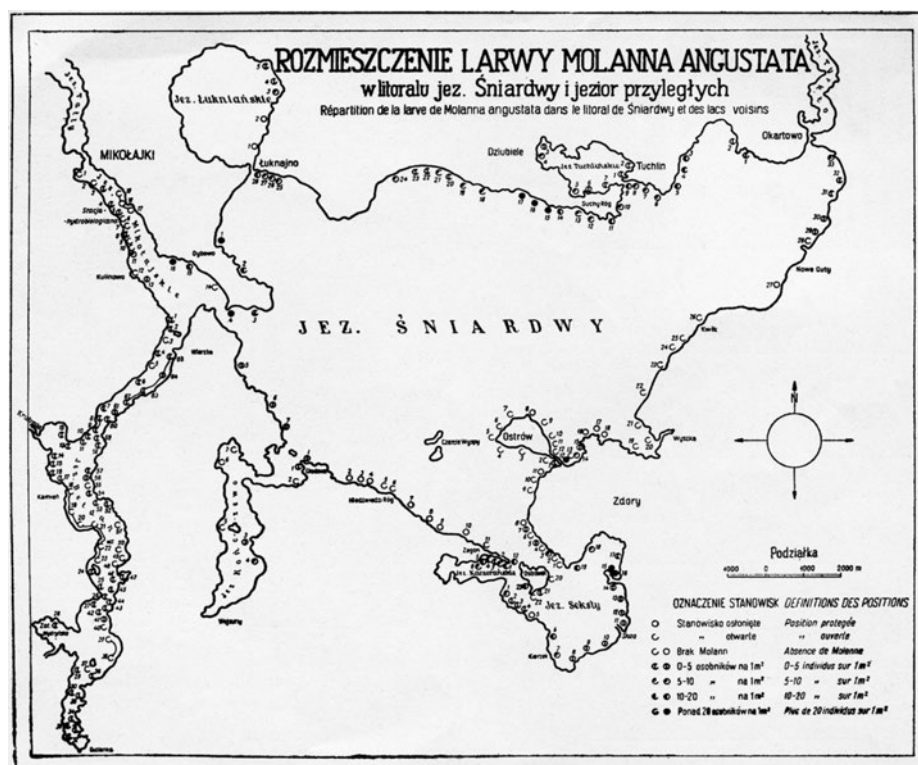


Fig. 1. Mapa rozmieszczenia larw *Molanna angustata* na Śniardwach i jeziorach przyległych.

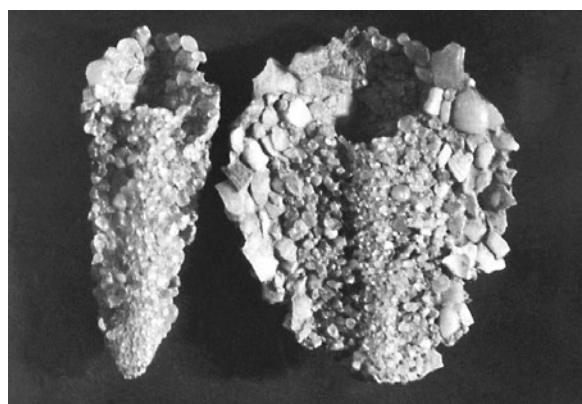
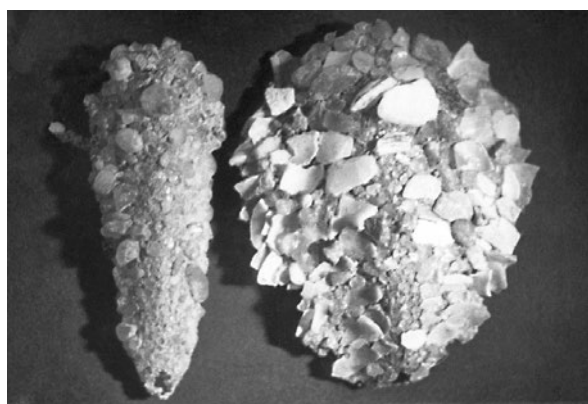


Fig. 2 i 3 Fotografie zróżnicowanych domków larw, w zależności od podłoża na którym żyją. **Fig. 2** Domki od strony grzbietowej osłaniające larwę owada. **Fig. 3.** Te same domki odwrócone stroną brzuszną. Fot. Andrzej Grębecki, Włodzimierz Kinastowski i Leszek Kuźnicki.

bałtyckich. Larwa chruścika buduje domek z piasku, którego nigdy nie opuszcza. Domek jest miejscem pozwalającym względnie bezpiecznie przeżyć, aż do czasu przepoczwarczenia się w dorosłego owada. Badania na Śniardwach rozstrzygnęły wieloletni spór między ekologami, czy *Molanna* jest mieszkańcem wód burzliwych, czy spokojnych. Zamieszczona ilustracja, dotycząca rozmieszczenia larw *Molanna angustata* wskazuje, że domek nie zabezpiecza owada przed skutkami falowania wody. Larwy chruścików żyją w zatoczkach osłoniętych trzcina i sitowiem, unikając miejsc narażonych na intensywne falowanie, które łatwo odwraca domki strona brzuszna do góry.

Piśmiennictwo

Grębecki A., Kinastowski W. i Kuźnicki L. (1954) *Uwagi o ekologii larwy Molanna angustata* Curtis w związku z jej rozmieszczeniem w jeziorach. „Polskie Archiwum Hydrobiologii”, **2 (XV)**: 191-235

Zastosowania makrofotograficznej rejestracji do analizy ruchu i taksji pierwotniaków – Leszek Kuźnicki

Analiza ruchów i taksji pierwotniaków w szczególności *Paramecium* była jednym z nurtów badawczych uprawianych w Instytucie Nenckiego od roku 1918, to jest od początków jego istnienia. Ten kierunek działalności naukowej rozwinął się w pełni dopiero w trzydziestolecie 1960-1990. Było to następstwem rozszerzenia tematyki i objęcia nią nie tylko orzęsków lecz również wiciowców, ameb i śluzowców. Osiągnięcia poznawcze, które odnotowano w tym czasie w dużym stopniu zawdzięczano nowym metodom i technikom mikroskopowania i obrazowania. Lista tych innowacji jest długa. Polegały one na nowych sposobach wykorzystania konwencjonalnej jak i specjalnej aparatury przy jednoczesnym przyżyciowym oddziaływaniu na pierwotniaki, pozwalającym na śledzenie i rejestracją ich szybkich i złożonych ruchów.

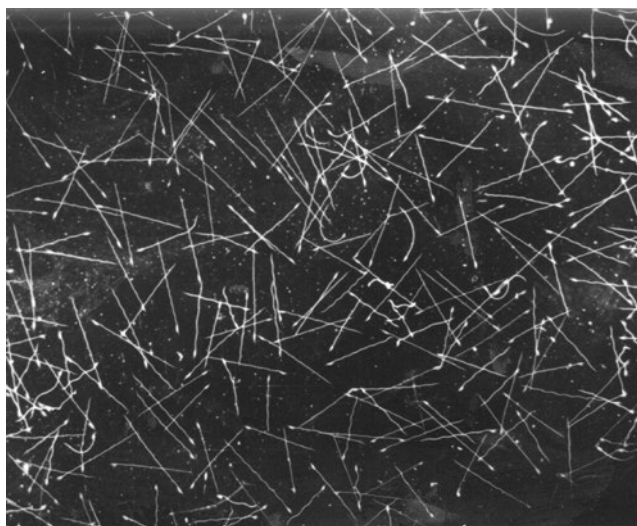


Fig. 1. Zapis ruchu swobodnie pływających *Paramecium caudatum*. Makrofotografia w ciemnym polu przy wydłużonym czasie ekspozycji. Próbkę z orzęskami umieszczano na szklanej płytce i oświetlano dwoma lub jedną lampą osłoniętą filtrem cieplnym, znajdującymi się z boku pod płytką. Skierowany skośnie strumień światła, w pomieszczeniu ciemnym, pozwala na stworzenie efekty „ciemnego pola”. Tło pozostaje ciemne natomiast pływające orzęski są jasnymi punktami. Aparat fotograficzny umieszczony na statywie nad szklaną płytką przy wydłużonej ekspozycji w zakresie 2-10 s rejestruje długość drogi i charakter ruchu pływających orzęsków. Fot. Stanisław Dryl.

M. L. Fergusson w 1957 opisał technikę fotograficzną umożliwiającą ilościowe badania ruchu *Paramecium* i innych pływających jednokomórkowych organizmów. Metoda ta po udoskonaleniu przez Stanisława Dryła (1959) została wykorzystana przez Andrzeja Grębeckiego i Leszka Kuźnickiego do szczegółowej analizy nie tylko taksji i kinez, ale również charakterystycznych sposobów pływania w zależności od stężenia jonów wapnia w środowisku, w stosunku do stężenia innych, jedno i dwuwartościowych kationów.

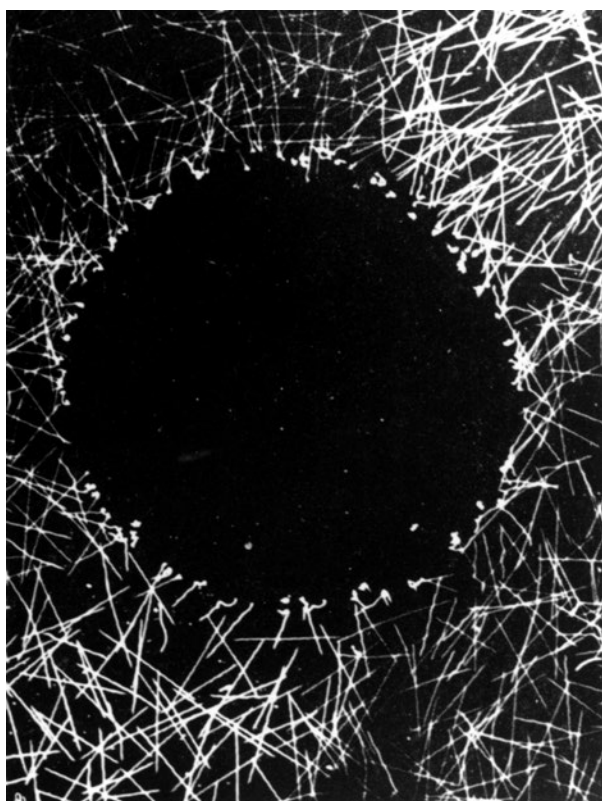


Fig. 2. Chemotaksja ujemna w stosunku do środowiska zasadowego.
Fot. 2 i 3. Stanisław Dryl.



Fig. 3. Chemotaksja dodatnia w stosunku do środowiska lekko kwaśnego.

Piśmiennictwo

Fergusson M. L. (1957) *Photographic technique of quantitative studies of paramecium and other motile cells.* „Physiol. Zool.”, **30**: 208-215

Dryl S. (1959) *Effects of adaptation to environment on chemotaxis of Paramecium caudatum.* „Acta Biol. Exp. Polish Acad. Sci.”, **19**: 95-104

Metoda rejestracji ruchu rzęsek u pływającego *Paramecium* – Leszek Kuźnicki

Do roku 1968 nikomu nie udało się zarejestrować na taśmie filmowej ruchu rzęsek u pływających pierwotniaków. Przyczyna była obiektywna. Rzęska u największego z rodzaju *Paramecium* gatunku *P. multimicronucleatum* – ma długość 10-12 μm i przekrój 0.24-0.40 μm . Charakter pływania pierwotniaka ma formę złożoną, gdyż składa się z ruchu postępowego (dochodzącego do 1.3 mm/s) i jednoczesnego ruchu obrotowego i nutacyjnego.

Trudności te udało się pokonać dzięki umieszczeniu pierwotniaków roztworze metylocelulozy o stężeniu 0.8-1.5% na okres 3-24 godzin. W tych warunkach okazało się, że rzęski nie wykonują ruchu naprzód i do tyłu, jak sądzono, lecz pracuje jak wiele wici w postaci fali spiralnej wędrującej od podstawy do wierzchołka rzęski.

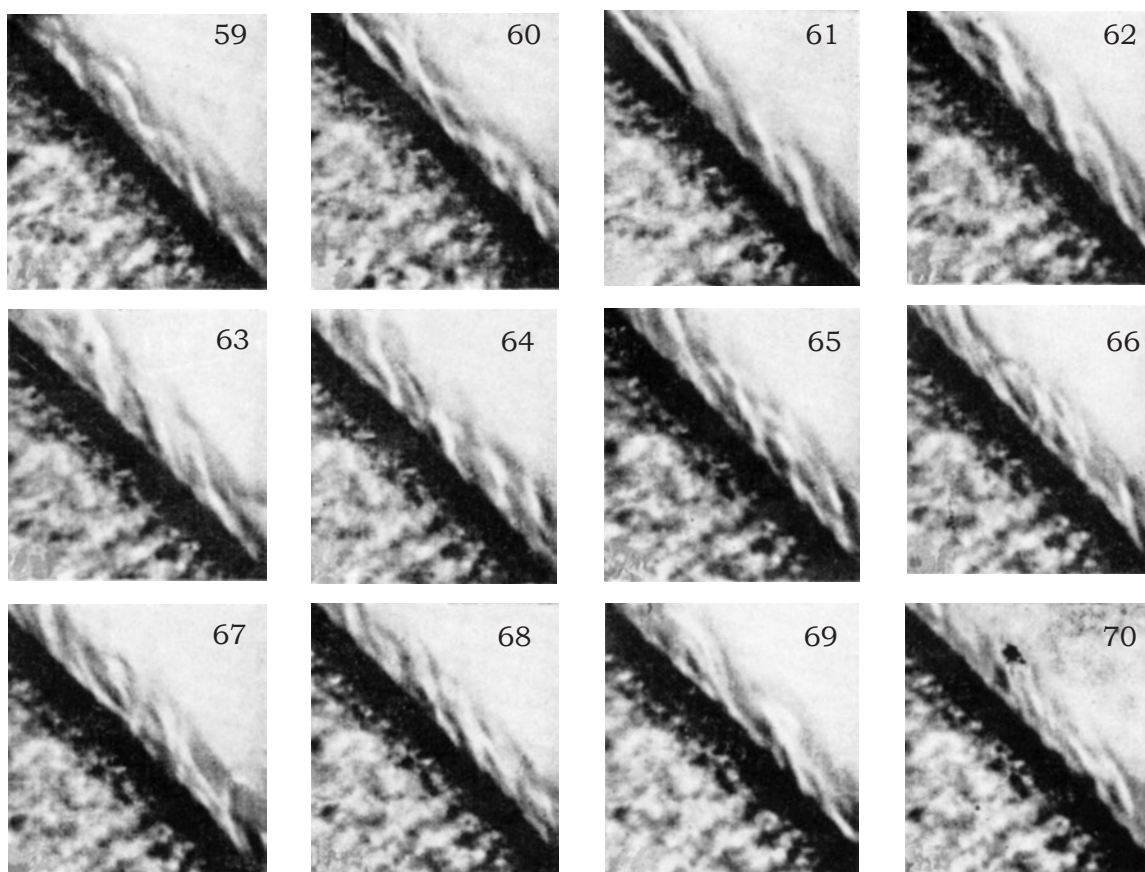


Fig. 1. *Paramecium multimicronucleatum* w 1,2 % roztworze metylocelulozy. Kontrast interferencyjno-fazowy. Rzęski obserwowane z profilu na krawędzi pierwotniaka. 59-70 seria kolejnych zdjęć wykonanych z szybkością 50 klatek/sek. Fot. Leszek Kuźnicki.

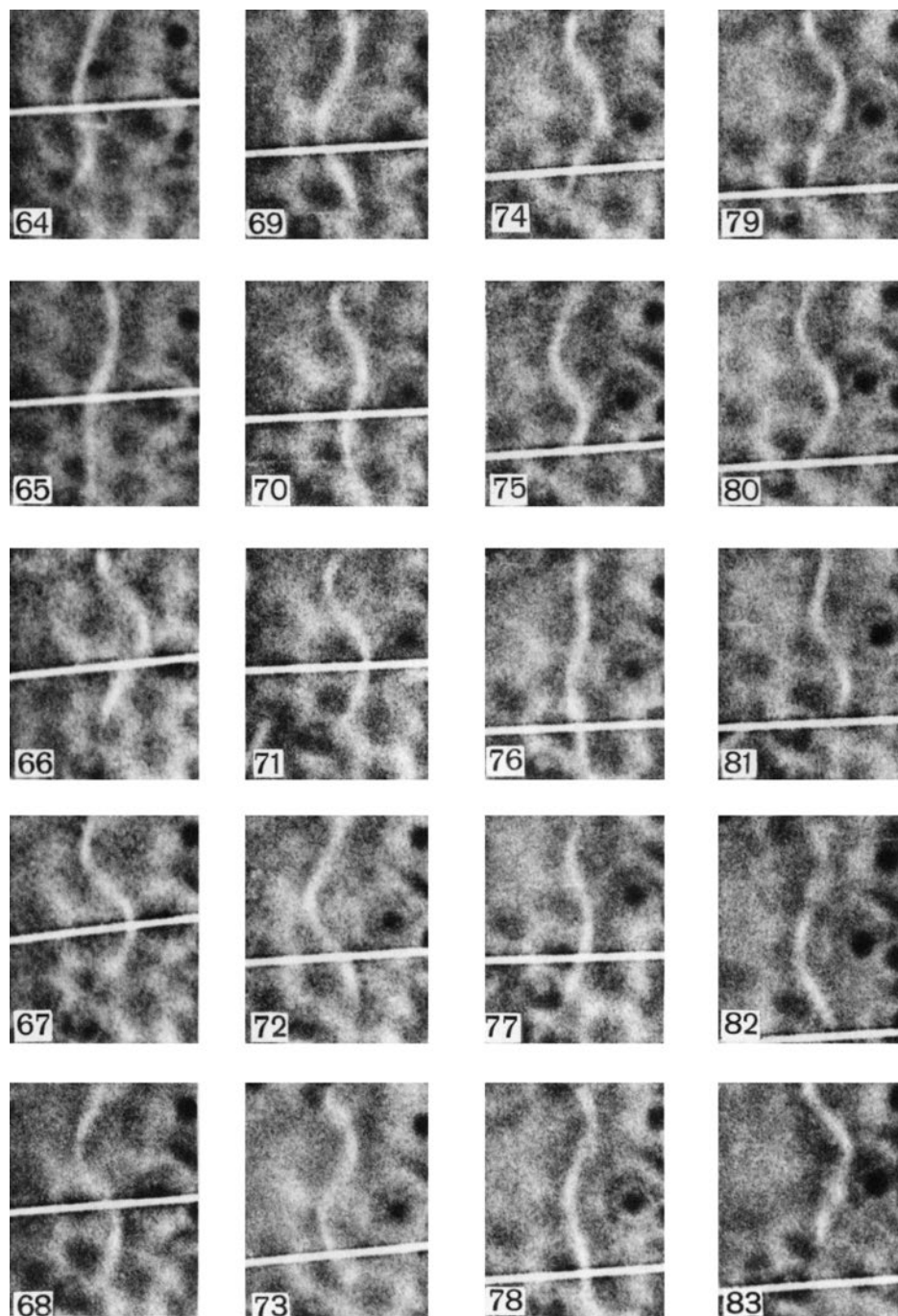


Fig. 2. 20 kolejnych zdjęć (64-83) jednej i tej samej rzęski w roztworze metylocelulozy (1.2%) pod mikroskopem z kontrastem interferencyjno-polarizacyjnym. Biała linia poprzeczna – znacznik na obiektywie mikroskopu, pozwalający na ustalenie kierunku ruchu pierwotniaka. Szybkość filmu – 50 klatek/sek, powiększenie 1250 x. Fot. Leszek Kuźnicki, Theodore L. Jahn i James R. Fonseca.

Piśmiennictwo

Kuźnicki L., Jahn T.L. i Fonseca J.R. (1970) *Helical nature of the ciliary beat of Paramecium multimicronucleatum*. „J. Protozoology”, **17**: 16-24

Pierwsze w piśmiennictwie zdjęcia (polaroid) rzęsek obrazujące ich zachowanie podczas zmiany kierunku pływania pierwotniaka – Leszek Kuźnicki

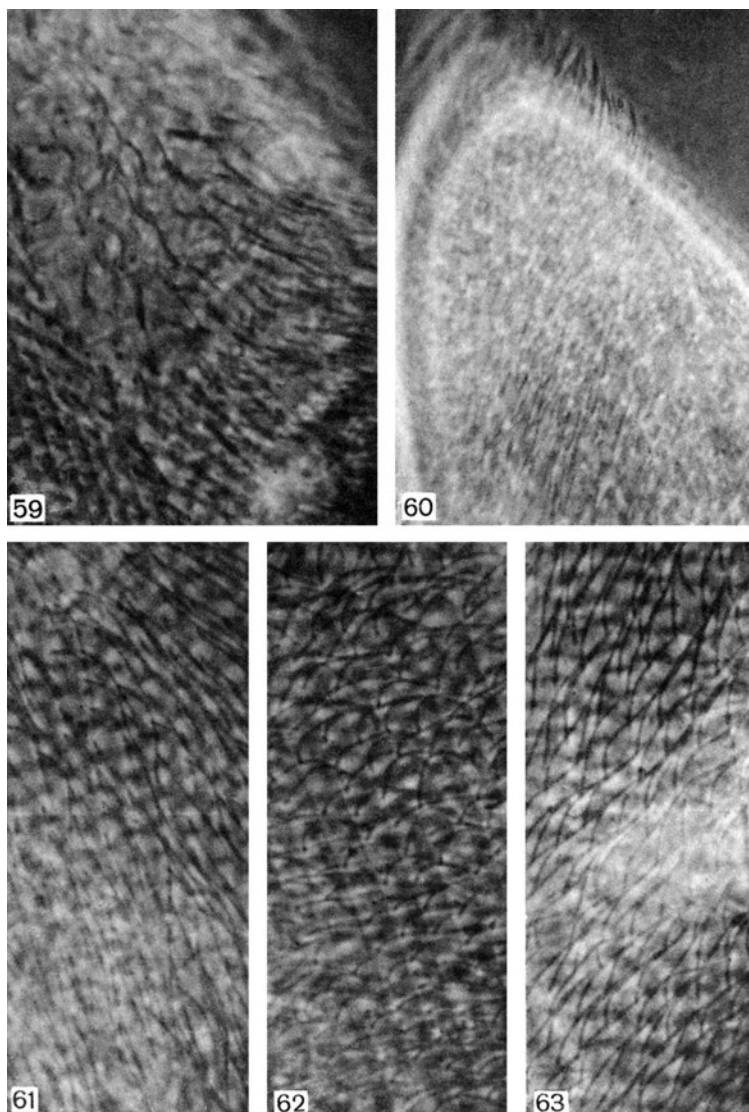


Fig. 1. *Paramecium multimicronucleatum* w 1,2 % roztworze metylocelulozy. Kontrast interferencyjno-fazowy, różne powiększenia. (59-63). (59) Pierwotniak płynie do przodu, rzeski widoczne na przedniej części zagłębienia oralnego. (60) – Pierwotniak płynie tyłem do przodu w wyniku odwrócenia położenia rząsek w stosunku do osi ciała (rewersja rząskowa). (61-63) Przejście rząsek od położenia normalnego do rewersji rząskowej przy której pierwotniak porusza się tyłem, zmieniając jednocześnie kierunek obrotu wokół podłużnej osi ciała. Fot. Leszek Kuźnicki.

Piśmiennictwo

Kuźnicki L. (1970) *Mechanismus of the motor responses of Paramecium*. „Acta Protozool.”, **8**: 83-118, Plates I-IX

Ilościowe badania okrężnego ruchu cytoplazmy w komórkach *Paramecium aurelia* i *P. bursaria* – Jerzy Sikora

Poczynając od badań Ehrenberga (1838) i Steina (1854) liczni badacze zajmowali się ruchem cytoplazmy w komórce i przemieszczaniem się wodniczek pokarmowych u orzęsków. Główną przeszkodą i źródłem rozbieżnych wyników obserwacji i ich interpretacji, był brak skutecznej metody zatrzymania postępowego i obrotowego ruchu szybko pływających orzęsków (bez uszkodzenia komórki) i tym samym ilościowego poznania tego zjawiska. Leszek Kuźnicki i Jerzy Sikora w latach 70-tych XX wieku podjęli udaną próbę przewyciężenia uprzednich ograniczeń metodycznych.

W celu możliwości przeprowadzenia ilościowych pomiarów ruchu cytoplazmy u różnych gatunków z rodzaju *Paramecium* połączyli techniki immobilizacji pierwotniaków przy pomocy poddania działaniu roztworów NiCl_2 (Kuźnicki 1963) lub homologicznej surowicy odpornościowej z wykorzystaniem kryształów, będących naturalnymi składnikami cytoplazmy jako wskaźnikami tegoż ruchu (Kuźnicki L. i Sikora J. 1971). Dotychczas za wskaźniki ruchu służyły wodniczki pokarmowe, twory relatywnie duże. Do śledzenia ruchu kryształów wykorzystano techniki immobilizacji i mikroskop interferencyjno-polaryzacyjny, co było również rozwiązaniem nowatorskim, i znacznie skuteczniejszym niż obserwacja ruchu kryształów tylko w świetle spolaryzowanym. W mikroskopie interferencyjno-polaryzacyjnym dwójłomne kryształy wyraźnie świecą na tle nieruchomej komórki *Paramecium*. Fotografując ich ruch przy otwartej przesłonie lub filmując (Kuźnicki L. i wsp. 1972), autorom udało się wykazać, że:

1. Szybkość ruchu cytoplazmy jest różna w różnych miejscach komórki, oraz zależy od stanów funkcjonalnych komórki.

2. Strumień cytoplazmy płynie tylko przez określone regiony ciała *Paramecium*, gdy jednocześnie rozległe obszary cytoplazmy pozostają nieruchome.

3. Wzdłuż drogi obiegu cyklicznego (stąd nazwa – cykloza) wykazuje różną szybkość. Przekrój poprzeczny strumienia jest zbliżony do koła co pozwala na nazywanie go umownym terminem „kanał”.

4. Nie ma wyraźnej zależności pomiędzy szybkością z jaką przesuwają się kryształy unoszone przez strumień cytoplazmy a ich odległością od żelu ektoplazmatycznego. Zarówno u *P. aurelia* jak i *P. bursaria* profil rozkładu prędkości kryształów ma charakter paraboidalny, i to niezależnie od miejsca w obrębie całego „kanału”.

Tak więc dominujący do lat 70. pogład, że siły napędowe cyklozy powstają jedynie na styku ektoplazmatycznego żelu i endoplazmatycznego solu nie znalazły potwierdzenia w badaniach Sikory i Wasik (1978) i Sikory, Wasik i Allena (1979).

5. Nie stwierdzono występowania „autonomicznego” ruchu wodniczek pokarmowych. Są one biernie unoszone, podobnie jak kryształy, z tym, że im większa wodniczka lub kryształ, poruszają się wolniej (Sikora J., Wasik A., Baranowski Z. 1979).

6. Ruch cytoplazmy zostaje zatrzymany w okresie poprzedzającym podział komórki i w czasie podziału, po czym zostaje odtworzony w obu potomnych komórkach (Sikora J. i Kuźnicki L. 1976).

7. Szybkość ruchu cytoplazmy jest wyraźnie uzależniona od temperatury otoczenia, z tym, że w zakresie od 3 do 27°C, przyrost szybkości na charakter liniowy, to w zakresie od 27 do 36°C już niema tego charakteru (Kuźnicki L. i Sikora J. 1973, Sikora J. 1981).

Istniała możliwość, że ruch okrężny cytoplazmy może być indukowany przez dotychczas stosowane metody immobilizacji komórek. Prostą weryfikacją była obserwacja ruchu cytoplazmy w osobnikach tigmotaktycznych. Aby jednak wykluczyć wszystkie argumenty, zastosowano metodę zakotwiczenia orzęska nakarmionego mikrokulkami żelaza i zakotwiczonego w polu magnetycznym. Mimo pełnej aktywności wszystkich rzęsek występował typowy strumień cytoplazmatyczny (Sikora J. 1975).



Fig. 1. *Paramecium bursaria* unieruchomiona działaniem roztworu NiCl_2 , w świetle spolaryzowanym. Fotograficzna rejestracja przemieszczających się dwójłomnych kryształów obrazuje obszary cytoplazmy objęte ruchem. Fot. Jerzy Sikora.

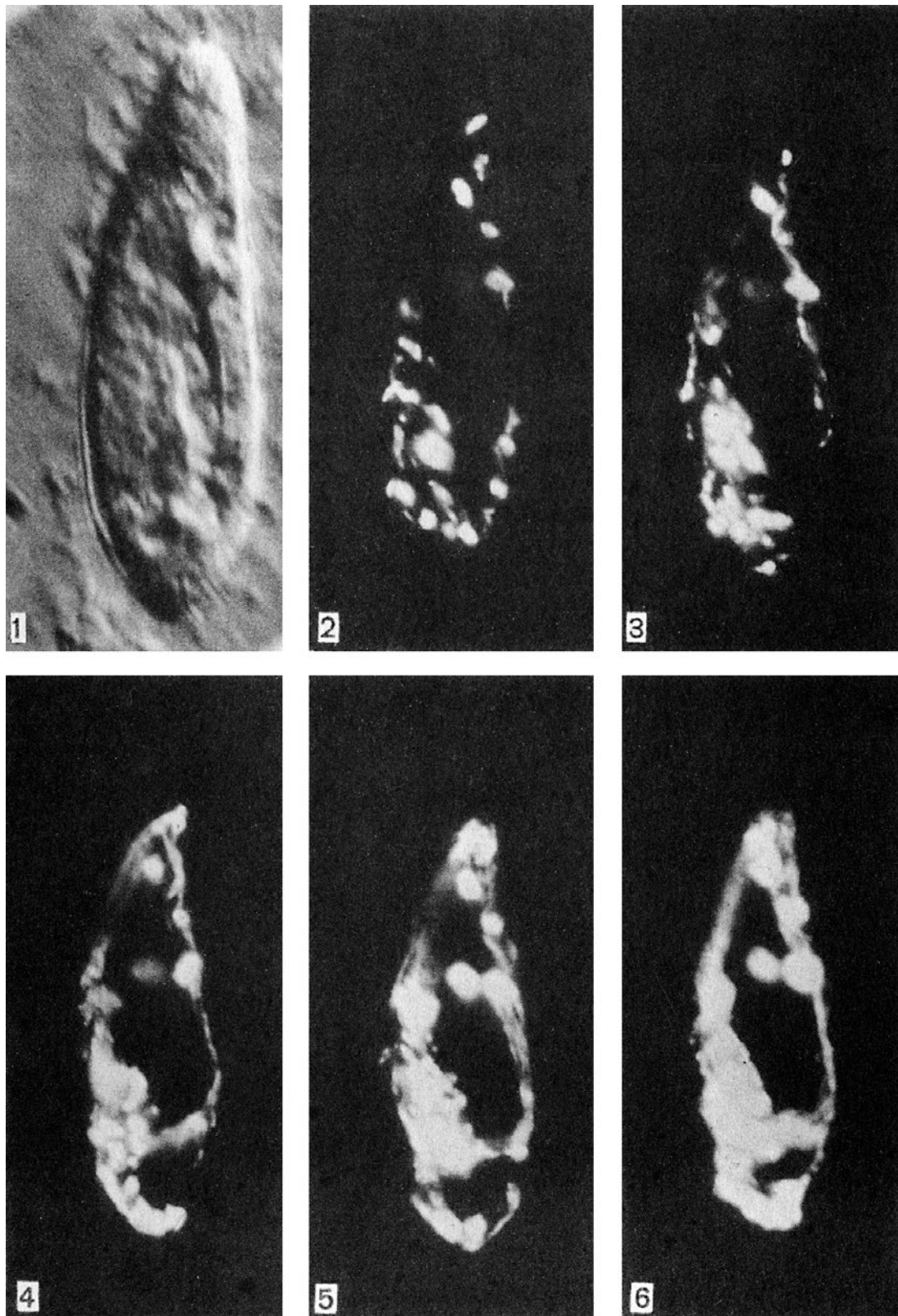


Fig. 2. *Paramecium aurelia* unieruchomiona działaniem homologicznej surowicy odpornościowej pod mikroskopem interferencyjno-polaryzacyjnym (400x). 1. Zarys orzęska (ekspozycja 2 s). Czasy ekspozycji w świetle spolaryzowanym: Kolejne zdjęcia po upływie 5, 10, 15, 30 i 60 s. Dwójłomne kryształy unoszone przez okrężny strumień cytoplazmy zakreślają obszary objęte ruchem. Fot. Leszek Kuźnicki i Jerzy Sikora.

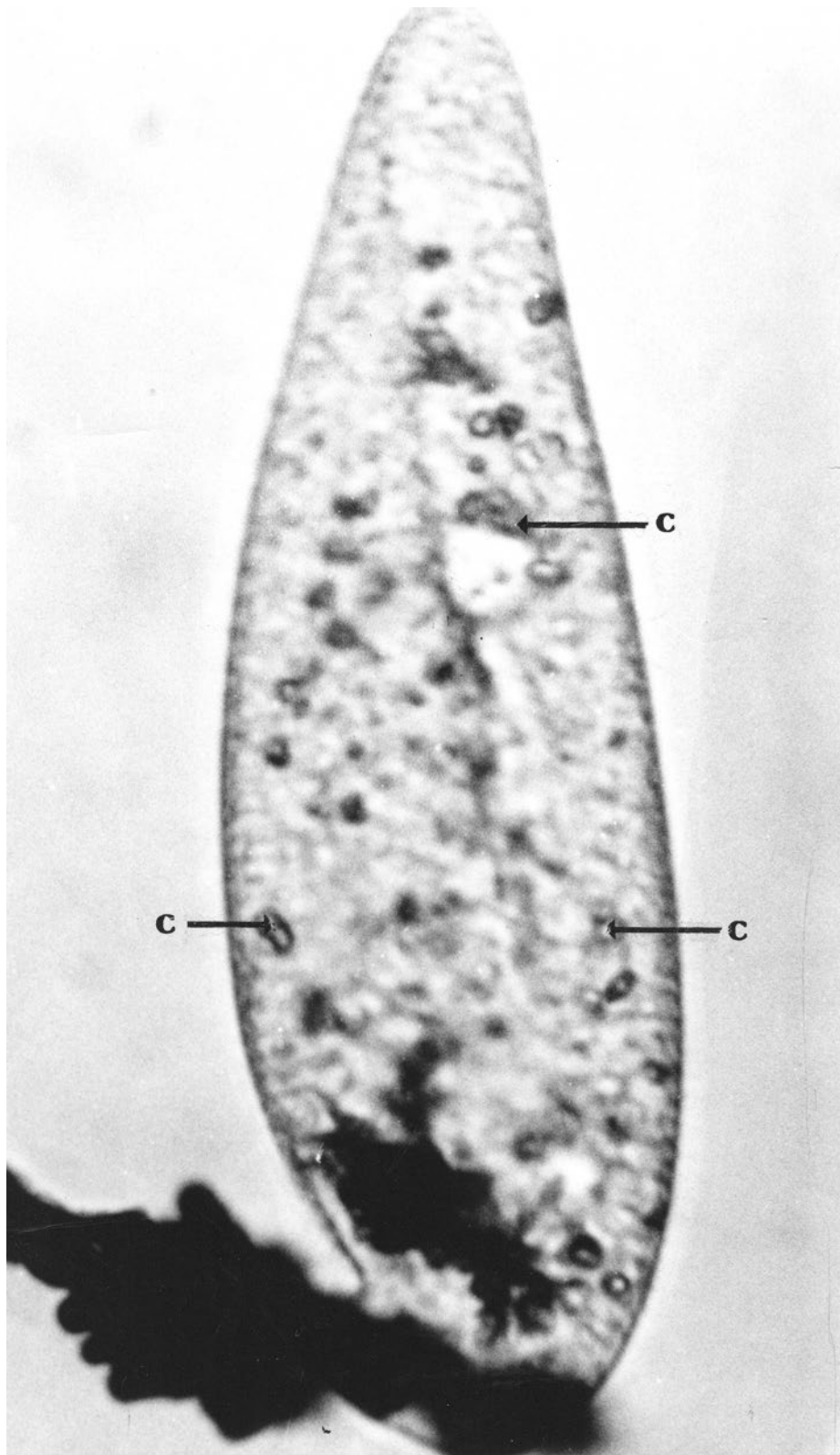


Fig. 3. W polu magnetycznym mikrokuleczki żelaza znajdujące się w otoczeniu stają się mikromagnesami, do których przylegają i zostają zakotwiczone komórki *Paramecium aurelia* poprzez wodniczkę wypełnioną mikrokuleczkami (uprzednio pobranymi z otoczenia). C – kryształy naturalnie elementy cytoplazmy. Fot. J. Sikora.

Piśmiennictwo

Ehrenberg C. G. (1838) *Die Infusorienthierchen als vollkommene Organismen*. Leipzig: Felix

Stein F. (1854) *Die Infusoriensthier, auf ihre Entwicklungsgeschichte untersucht*. Leipzig.; pp. 265. W. Engelmann

Kuźnicki L. (1963) *Reversible immobilization of Paramecium caudatum evoked by nickel ions*. „Acta Protozool.”, **1**: 301-312

Kuźnicki L. i Sikora J. (1971) *Cytoplasmic streaming within Paramecium aurelia. I. Movements of crystals after immobilization by antiserum*. „Acta Protozool.”, **8**: 439-446

Kuźnicki L., Sikora J. i Fabczak S. (1972) *Cytoplasmic streaming within Paramecium aurelia. II. Cinematographic analysis of the course of reversible cessation of cyclosis*. „Acta Protozool.”, **11**: 237-242

Kuźnicki L. i Sikora J. (1973) *Cytoplasmic streaming within Paramecium aurelia. III. The effect of temperature on flow velocity*. „Acta Protozool.”, **12**: 59-66

Sikora J. (1975) *A new method of locomotion arresting in some ciliates without ciliary immobilization*. „Acta Protozool.”, **13**: 421-424

Sikora J. i Kuźnicki L. (1976) *Cytoplasmic streaming within Paramecium aurelia. IV. Cyclosis during binary fission and conjugation*. „Acta Protozool.”, **15**: 173-178

Sikora J. i Wasik A. (1978) *Cytoplasmic streaming within NiCl₂ immobilized Paramecium aurelia*. „Acta Protozool.”, **17**: 389-397

Sikora J., Wasik A. i Allen R. D. (1979) *The role of single particle saltations in cytoplasmic streaming*. „Acta Protozool.”, **18**: 201

Sikora J., Wasik i Baranowski Z. (1979) *Estimation of velocity distribution profile of Paramecium cytoplasmic streaming*. „Europ. J. Cell Biol.”, **19**: 184-188

Sikora J. (1981) *Cytoplasmic streaming in Paramecium*. „Protoplasma”, **109**: 57-77

Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych

Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych. Lata 70-te. Stanowisko pracy Stanisława Fabczaka służące do badania pobudliwości i potencjałów membranowych orzęsków oraz filmowania zjawisk ruchowych. Specjalnie amortyzowana płyta pod mikroskop i ramię do zamocowania kamery filmowej eliminujące drgania wywołane silnikiem elektrycznym.

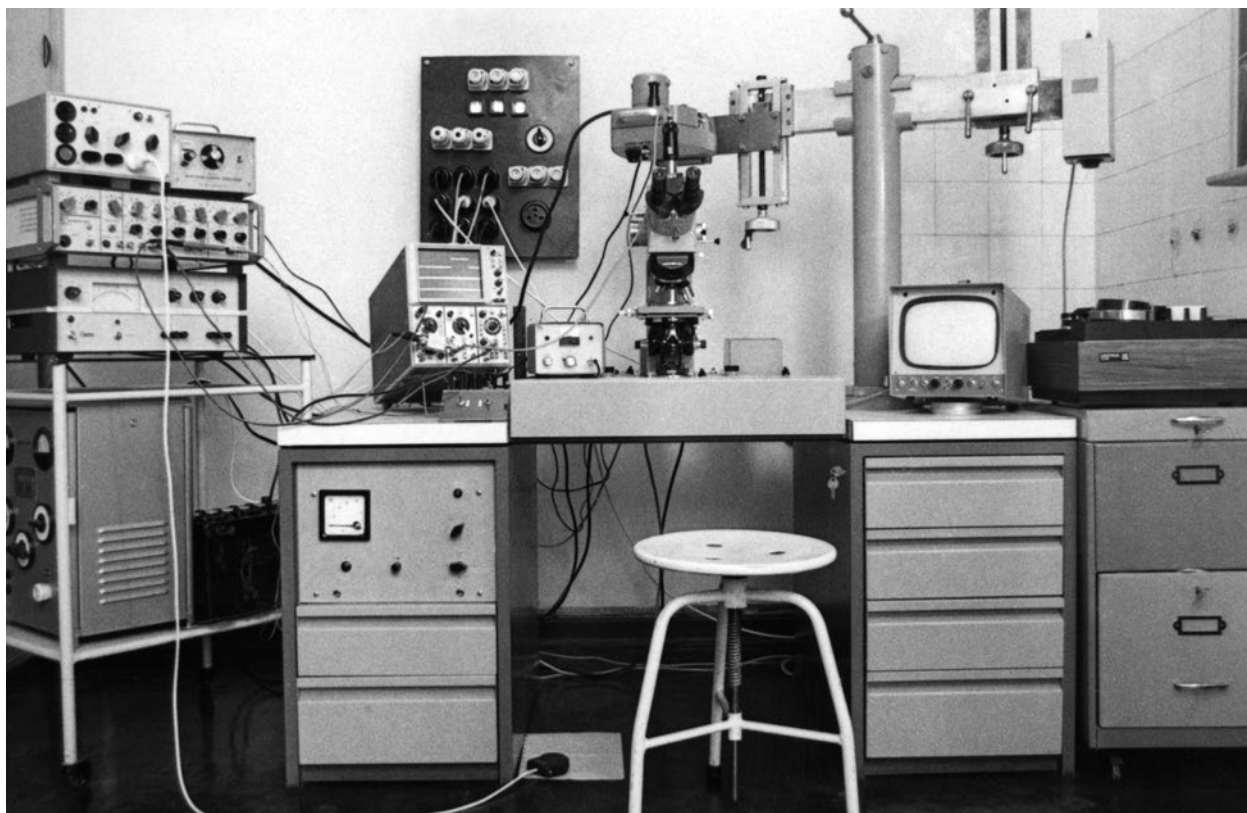


Fig. 1. Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych. Wyposażenie stanowiska pracy Stanisława Fabczaka w 1974 r. [z] L. Kuźnicki *Protozoologia w Polsce 1961-2001*. Warszawa 2003, Centrum Upowszechnia Nauki PAN, s. 110. Fot. Jerzy Sikora.

Postępy na drodze poznania ruchów euglenoidalnych – Leszek Kuźnicki

Euglenoidyna to liczna i szeroko rozpowszechniona na Ziemi grupa pierwotniaków o różnorodnych przystosowaniach. Należą do niej zarówno gatunki autotroficzne – zielone, jak i heterotroficzne – bezbarwne, wolnożyjące jak również pasożytnicze. Na Ziemi niema środowisk wodnych w których nie występowałyby przedstawiciele tej gromady. Podstawową strukturą lokomocyjną Euglenoidyna jest więc lokomotoryczna o typowej budowie charakterystycznej dla większości pierwotniaków, zwierząt i człowieka.

W odpowiedzi na różne czynniki środowiska zmianie ulega charakter pracy wici ale również pojawiają się skurcze obejmujące całą komórkę eugleny. Te zmiany kształtu ciała uznano za charakterystyczne dla Euglenoidyna. W zależności od gatunku zmiany kształtu mają różny zakres. Spotyka się również formy o całkowicie sztywnym ciele. Ruchy ciała zwane w dawnym piśmiennictwie „metabolią” współcześnie nazywane są ruchami euglenoidalnymi. W latach 1971-1990 badania Ewy Mikołajczyk i Leszka Kuźnickiego w Pracowni Fizjologii Ruchów Komórkowych przyczyniły się do wyjaśnienia tych słabo poznanych zjawisk ruchowych.

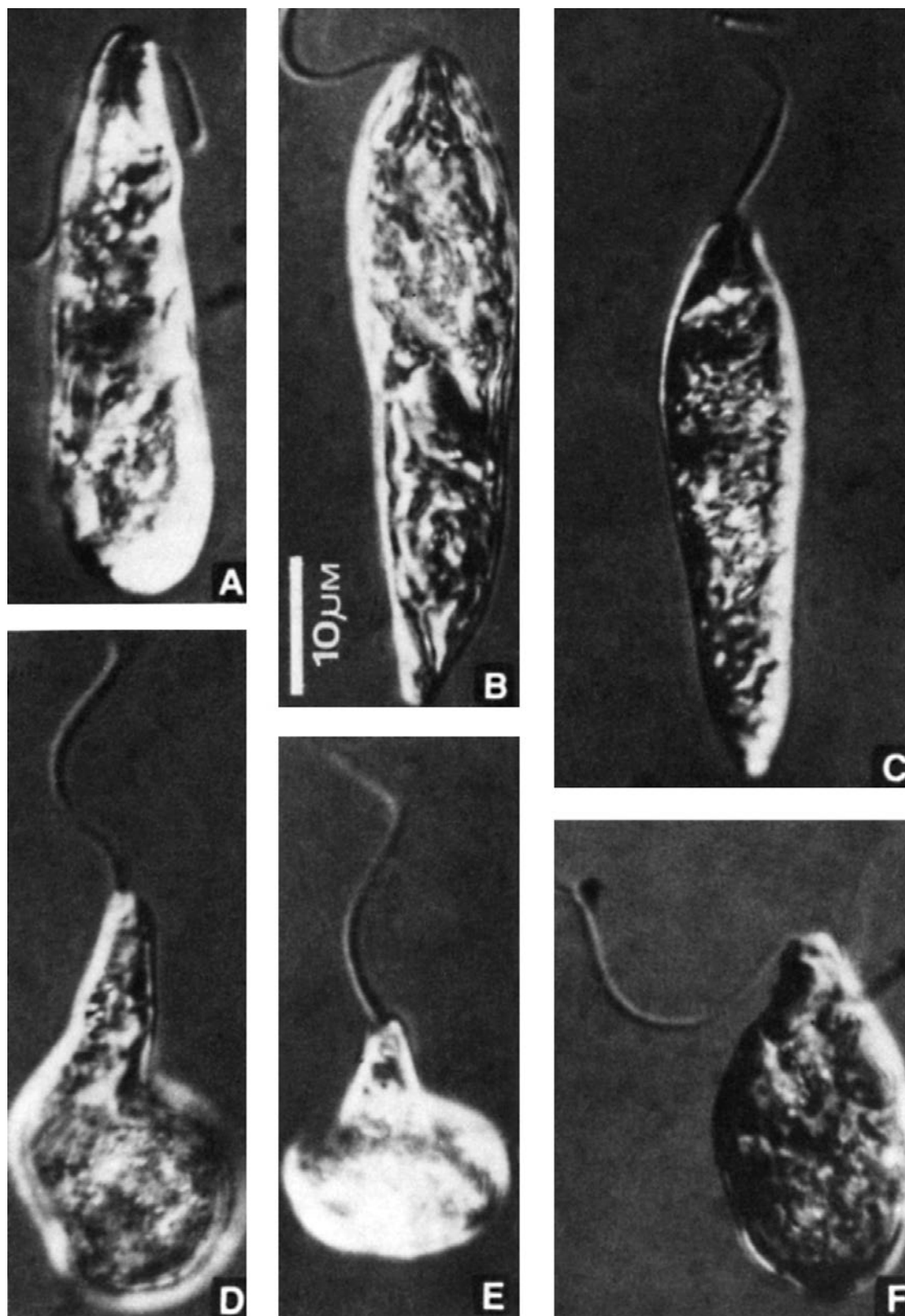


Fig. 1. Rejestracja filmowa pod mikroskopem interferencyjno-dyferencyjnym reakcji fotofobowej, *Euglena gracilis*. Zatrzymanie ruchu, zmiany położenia wici i i towarzyszący jej skurcz ciała pierwotniaka. Kolejne (A-E) fazy pełnego cyklu reakcji fotofobowej F – początek normalizacji kształtu komórki i w następstwie podjęcie pływania. Fot. Ewa Mikołajczyk.

Piśmiennictwo

Mikołajczyk E. (1972) *Patterns of body movements of Euglena gracilis*. „Acta Protozool.”, **11**: 317-324

Kuźnicki L., Mikołajczyk E. i Walne P. L. (1990) *Photobehaviour of eugelenoid flagellates: theoretical and evolutionary prospective*. „CRC Plant Science”, **9**: 343-369

Indukowana makropinocytoza u *Amoeba proteus* – Leszek Kuźnicki

Płyn ze środowiska wraz z rozpuszczonymi substancjami organicznymi i nieorganicznymi dostaje się do wnętrza komórki *Amoeba proteus* w wyniku tworzenia się pęcherzyków na jej powierzchni – mechanizmu zwanego pinocytozą. Proces tworzenia się pęcherzyków pinocytotycznych był badany w pracowniach Morfodynamiki Prosty Systemów Ruchowych i Fizjologii Ruchów Komórkowych. Zjawisko to u żywych ameb analizował Michał Opas. Było to fragmentem jego rozprawy doktorskiej.

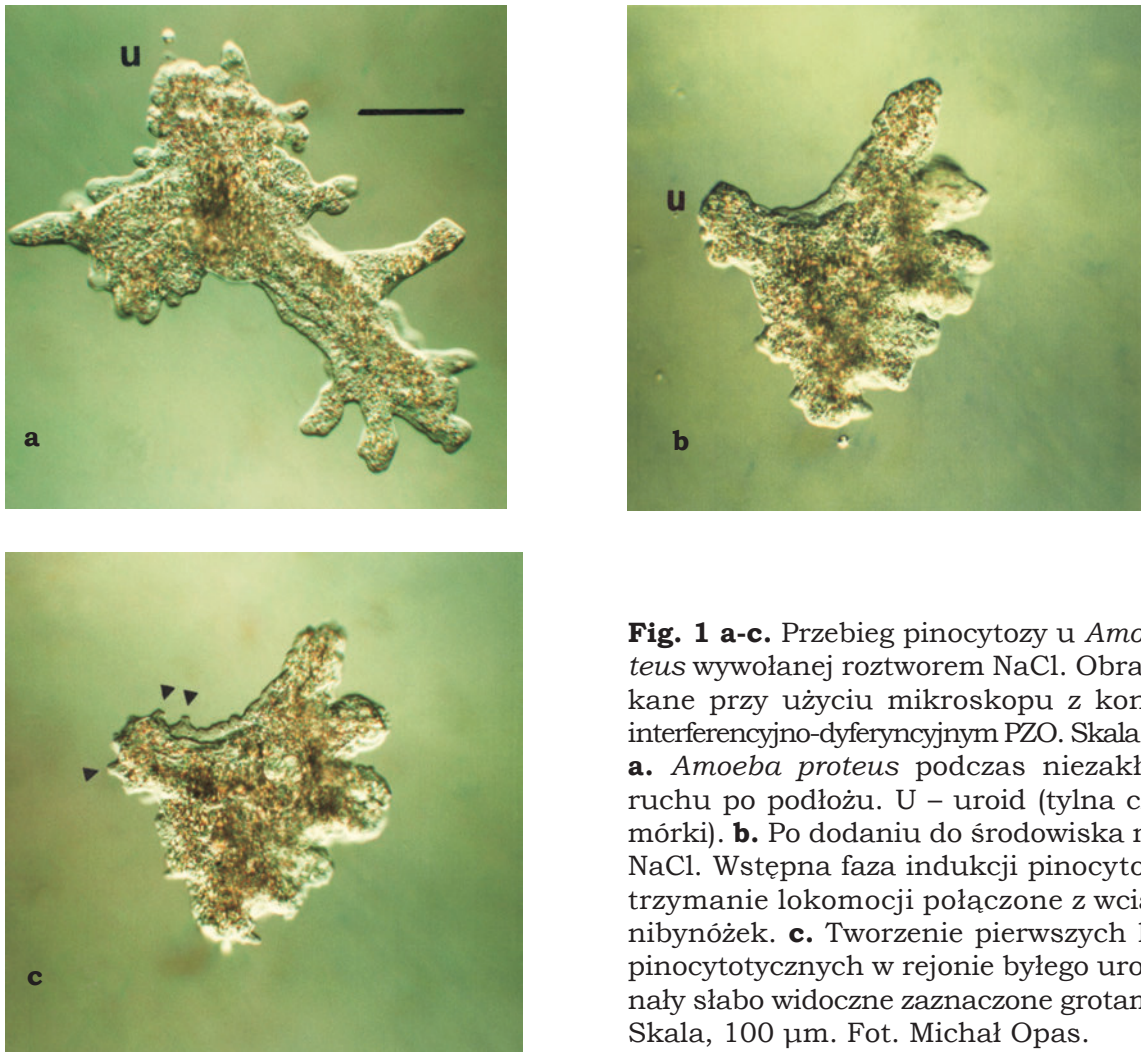


Fig. 1 a-c. Przebieg pinocytozy u *Amoeba proteus* wywołanej roztworem NaCl. Obrazy uzyskane przy użyciu mikroskopu z kontrastem interferencyjno-dyferencyjnym PZO. Skala 100 μm . **a.** *Amoeba proteus* podczas niezakłóconego ruchu po podłożu. U – uroid (tylna część komórki). **b.** Po dodaniu do środowiska roztworu NaCl. Wstępna faza indukcji pinocytozy – zatrzymanie lokomocji połączone z wciąganiem nibynózek. **c.** Tworzenie pierwszych kanałów pinocytotycznych w rejonie byłego uroidu. Kanały słabo widoczne zaznaczone grotami strzał. Skala, 100 μm . Fot. Michał Opas.

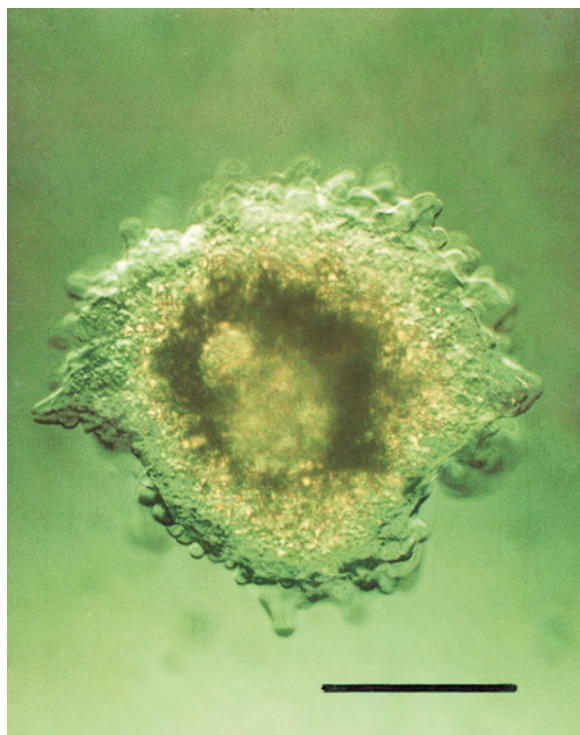


Fig. 2. *Amoeba proteus* w postaci rozety pinocytotycznej.

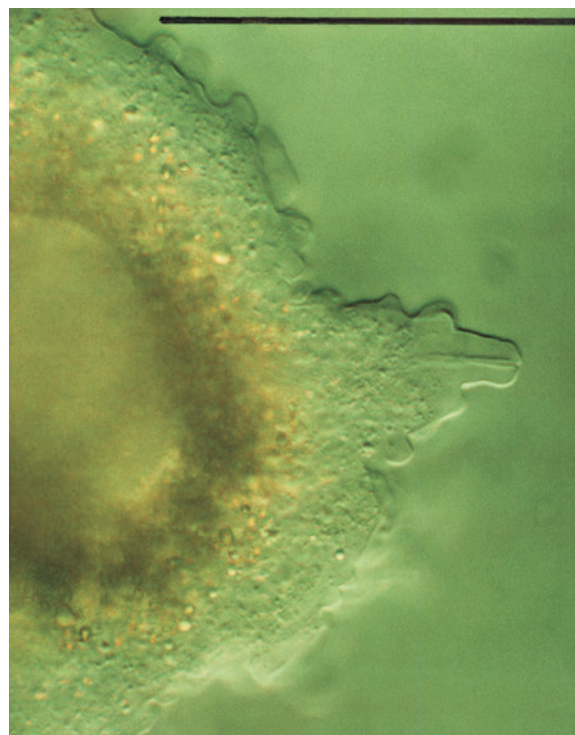


Fig. 3. Kanał pinocytotyczny w powiększeniu. Skala, 100 μm . Fot. 2 i 3 Michał Opas.

Piśmiennictwo

Opas M. (1977) Rozprawa doktorska; *Analiza zjawisk skurczowych u Amoeba proteus*

Kuźnicki L. (2003) *Protozoologia w Polsce 1861-2001*. Warszawa 2003, Centrum Upowszechnia Nauki PAN

Badanie zjawisk skurczu u modeli glicerynowych ameb – Leszek Kuźnicki

W latach 1974-75 na zaproszenie Leszka Kuźnickiego przebywał w Pracowni Fizjologii Ruchów Komórkowych Robert Rinaldi (USA), który wraz z Michałem Opasem i Barbarą Hrebendą, przeprowadził szereg pionierskich doświadczeń nad kurczliwością glicerynowanych modeli *Ameba proteus* i *Chaos chaos*. Doświadczenia te przyczyniły się do wyjaśnienia wieloletniego sporu na temat mechanizmów ruchu wielkich ameb. Modele glicerynowanych ameb zachowywały kształt żywych komórek. Po wprowadzeniu do środowiska ATP, Ca^{2+} i Mg^{2+} reakcje całych modeli jak i pseudopodiów można było rejestrować przy użyciu kamer filmowych. W świetle uzyskanych wyników stwierdzono, że lokomocja ameb i ruch wewnętrznej cytoplazmy są wywoływane aktywnością skurczową ektoplazmy hialinowej, która pokrywa całą powierzchnię pierwotniaka.

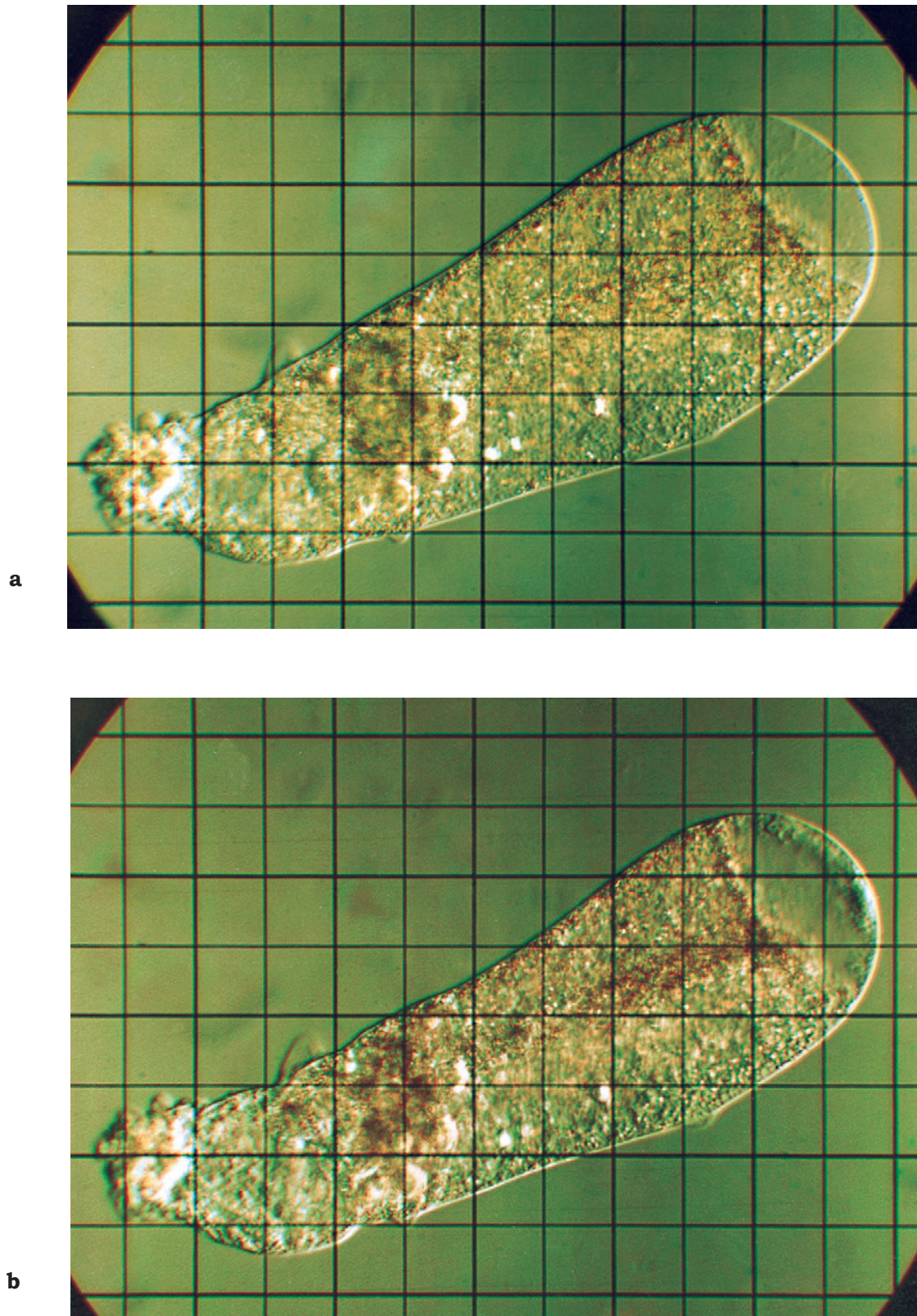
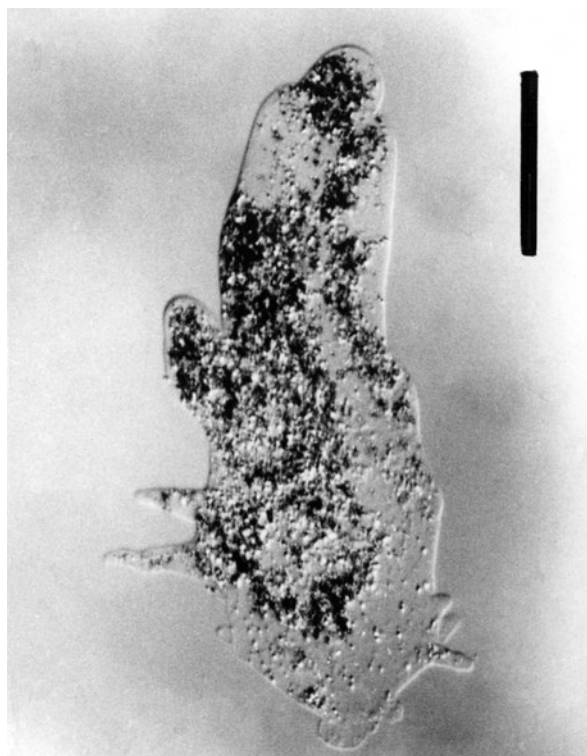
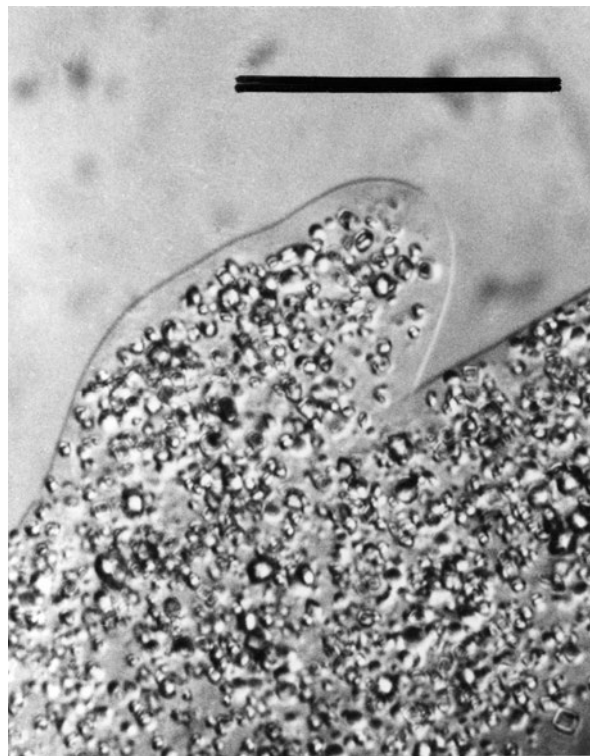


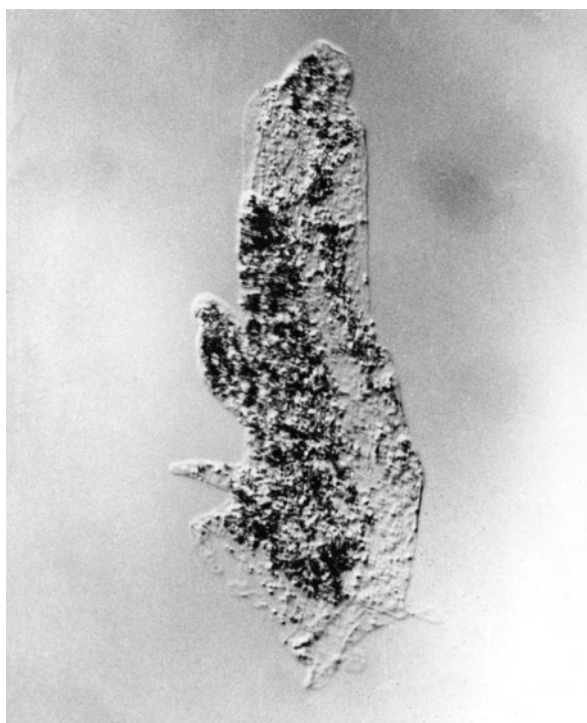
Fig. 1a-b. Model glicerynowany monopodialnej (monotaktycznej) ameby (*Amoeba proteus*). **a.** – przed skurczem **b.** – po skurczu. Interferencyjny kontrast fazowy. Bok najmniejszego kwadratu 43 μm . Fot. Michał Opas.



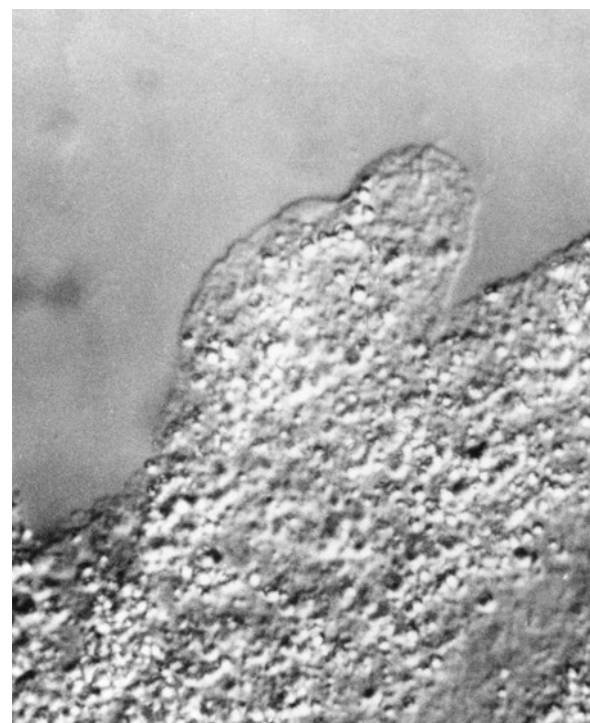
a



b



c



d

Fig. 2 a-d. Model glicerynowany polipodialnej (politaktycznej) ameby (*Amoeba proteus*) i zmiany w obrazie całego pierwotniaka, oraz i zmiany w jednej z nibynózek przed i po skurczu. Dowód, że struktury odpowiedzialne za skurcz są rozmieszczone pod błoną komórkową na całej powierzchni ameby. Interferencyjny kontrast dyferencyjny. Skala **a** i **c** – 100 μm , **b** i **d** – 50 μm . Fot. Michał Opas.

Piśmiennictwo

Rinaldi R. i Opas M. (1976) *Graphs of contracting glicerynated Ameba proteus*. „Nature”, **20**: 5551: 225-226

Kuźnicki L. (2003) *op.cit.*; *Protozoologia*, s. 146-147

Trójwymiarowa analiza ruchu plazmodium śluzowca *Physarum polycephalum* przy wykorzystaniu mikroskopu holograficznego Holmin, PZO – Leszek Kuźnicki

Na początku lat 70-tych XX wieku Romuald Pawluczyk skonstruował w Polskich Zakładach Optycznych mikroskop holograficzny Holmin. Zbigniew Baranowski z Pracowni Fizjologii Ruchów Komórkowych Instytutu Nenckiego wykorzystał to urządzenie do trójwymiarowej analizy ruchu plazmodium śluzowca *Physarum polycephalum*. Wędrujące plazmodium umieszczono na podłożu 2% agaru a następnie filmowano obrazy uzyskane spod mikroskopu holograficznego w czasie rzeczywistym w jednorodnym polu interferencyjnym. W takich warunkach zmiany geometrii kanałów plazmodium obrazują tworzące się zamknięte prążki interferencyjne. Analiza poklatkowa filmu pozwoliła na wykazanie, że zmiany grubości kanału i zmiany kierunku przepływu cytoplazmy wykazują tę samą dynamikę.

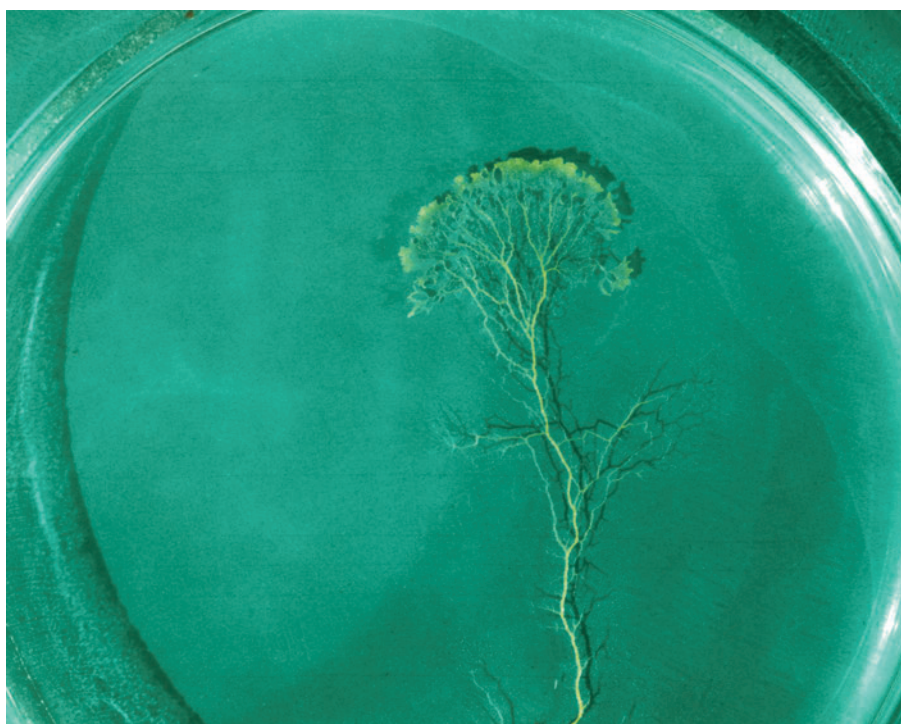


Fig. 1 Makrofotografia wędrującego *Physarum polycephalum* na podłożu 2% agaru. Fot. Zbigniew Baranowski.

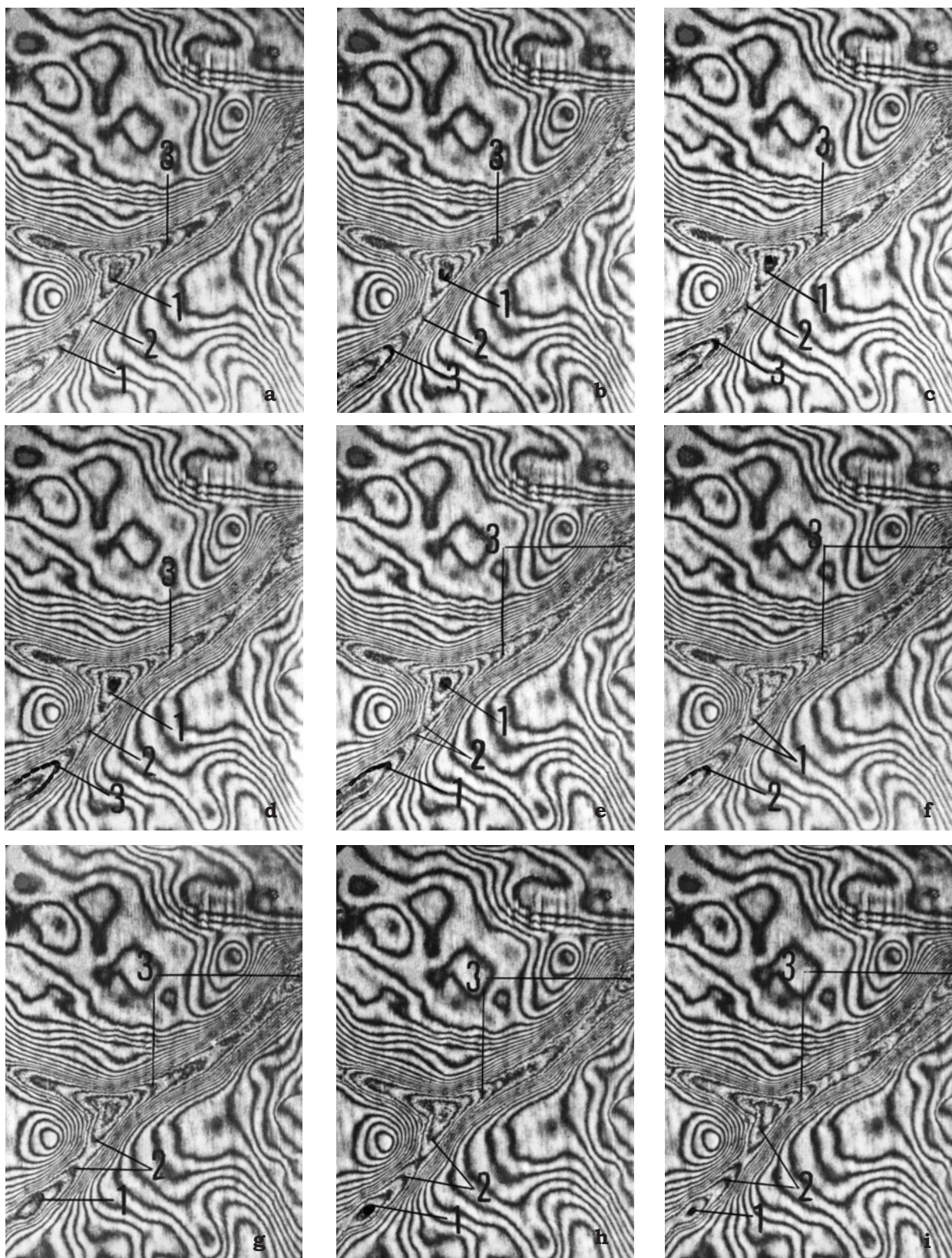


Fig. 2 a-i. Obrazy zmian wymiarów kanału *Physarum polycephalum* spod mikroskopu holograficznego Holmin PZO otrzymane w jednorodnym polu interferencyjnym. Oświetlenie laserem He-Ne, $\lambda = 632,8$ nm. Zdjęcia oznaczone od **a** do **i** są kadratami filmu 16 mm. Odstęp czasu pomiędzy kolejnymi zdjęciami wynosił 4 s. Na kanale cyframi **1**, **2** i **3** oznaczono prążki odpowiadającym wybranym poziomom. Fot. Zbigniew Baranowski.

Piśmiennictwo

Baranowski Z. (1976) *Three-dimensional analysis of movement in Physarum polycephalum plasmodia*. „Cytobiologiae”, **13**: 118-131

Baranowski Z. (1977) *Rozprawa doktorska Integracja zjawisk skurczowych w plazmodium Physarum polycephallum*.

Różne metody obrazowania w badaniach *Paramecium* – Elżbieta Wyroba

Badania nad poznaniem strukturalnych i molekularnych własności błony *Paramecium* z użyciem różnych technik wysokorozdzielczego obrazowania zapoczątkowane zostały w Instytucie Nenckiego na początku lat 70-tych XX wieku. Ten jednokomórkowy Eukaryota to model badawczy w Zakładzie Biologii Komórki od chwili jego powstania w 1918, nad którym wówczas pracował Jan Dembowski.

W tym szkicu będą przykłady z zastosowania: konwencjonalnej analizy w mikroskopii elektronowej, podwójnego immunoznakowania ze złotem koloidalnym, mikroskopii konfokalnej i wysokorozdzielczej STED, ilustrujące ich przydatność m.in. do śledzenia neofunkcjonalizacji genów, bo zduplikowany genom *Paramecium* jest doskonałym obiektem do badań ich białkowych produktów.

Pierwszy cykl prac z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej dotyczył glikokaliksu (warstwy powierzchniowej) *Paramecium* (Wyroba E. i Przełęcka A. 1973), jego własności antygenowych (te były poparte analizą biochemiczną) oraz roli jako warstwy ochronnej błony komórkowej niezbędnej dla zachowania podstawowych czynności życiowych (Wyroba 1980a). Badania te miały, w odniesieniu do orzęsków, charakter pionierski, co znalazło wyraz w uwzględnieniu ich w podstawowym przeglądzie dotyczącym struktury glikokaliksu opublikowanym przez Lufta (1976). Użyto w tych badaniach glikokaliksu metody tego autora: utrwalano komórki w obecności związku polikationowego czerwieni rutenowej (Ruthenium Red) wiążącego się z polianionami np. glikoproteinami uwidaczniając je na błonie całej komórki (**Fig. 1a**) włącznie z rzęskami (**Fig. 1b**). Naruszenie lub przerwanie ciągłości błony plazmatycznej przyżyciowym zastosowaniem np. fosfolipazy C w niewielkim stężeniu (Wyroba 1980b) powodowało nagromadzenie tego związku w obrębie alweoli – pęcherzyków podbłonowych, bez wynikania w głąb cytoplazmy (**Fig. 1c**). Był to jeden z pierwszych dowodów na ochronną rolę tego kompartmentu dla komórki i jego zdolność wiązania kationów (Wyroba 1981).

Różne metody obrazowania zostały też użyte do poszukiwania lokalizacji białek zaangażowanych w procesy endocytotyczne w komórce *Paramecium*. Zastosowanie technik biologii molekularnej doprowadziło do zidentyfikowania u *Paramecium octaurelia* kilkunastu genów (zdeponowano je w bazie GenBank) kodujących elementy maszynery endocytotycznej i transportu pęcherzykowego (Surmacz i inni 2003). Elżbieta Wyroba ze swymi współpracownikami wykazała, że u *P. octaurelia* istnieje m.in. dynamina i Rab7 spełniające funkcje analogiczne, jak w komór-

kach organizmów wyższych i o bardzo wysokim stopniu homologii do białek ssaków (Surmacz i inni 2003). Dynamina, odkryta w roku 1987 u ssaków i zidentyfikowana na poziomie genu dopiero w 1990 – dzięki swej aktywności GTP-azowej i zdolności do oligomeryzacji, odcina od błony komórkowej nowopowstałe pęcherzyki endocytotyczne i uczestniczy też w sekwestracji receptorów w trakcie desensytyzacji (Obar i inni 1990).

Jako markera endocytozy zachodzącej z udziałem receptorów użyto transferyny (Surmacz i inni 2003), która dostaje się do komórek *Paramecium* na szlaku zależnym od dynaminy, o czym świadczy kolokalizacja w mikroskopii konfokalnej po zastosowaniu fluorescencyjnych znaczników (**Fig. 2a,b**).

Stwierdzono wzrost poziomu dynaminy po podaniu transferyny o 22 % oraz jej spadek w warunkach zahamowania procesu internalizacji chlorkiem amonu zależnie od jego stężenia (Wiejak i inni 2004). Lokalizacja ultrastrukturalna w mikroskopii elektronowej z użyciem podwójnego immunoznakowania ze złotem koloidalnym wykazała, że w komórkach internalizujących transferynę dynamina występuje w opłaszczonych zagłębieniach i pęcherzykach, w których kolokalizuje się z klatryną (Wiejak i inni 2004), jak uwidoczniono na **Fig. 3**.

Późne etapy procesów endocytotycznych zależne są od białka Rab7 – sklonowanego u ssaków w 1996 roku (Vitelli i inni 1996), które reguluje transport wewnątrzkomórkowy z endosomów wczesnych do późnych oraz lizosomów i dojrzewanie fagosomów współdziałając ze specyficznymi białkami efektorowymi (Bruckert i inni 2000).

Sklonowano 2 geny kodujące Rab7a i Rab7b w komórkach *Paramecium octaurelia*, których sekwencja aminokwasowa jest w 97,6% identyczna (Osińska i inni 2011). Zastosowanie technik biologii molekularnej i biochemii (w tym absolutnego PCR w czasie rzeczywistym, RT PCR, spektrometrii mas i elektroforezy 2D) wykazało ich odmienne własności, ekspresję, lokalizację i funkcję (Osińska i inni 2011).

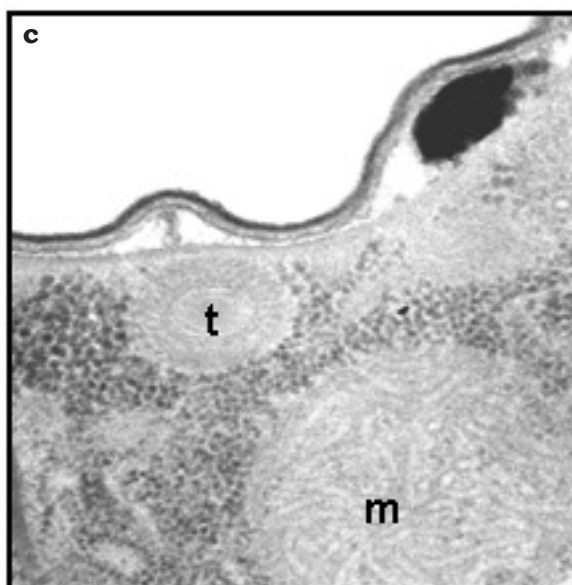
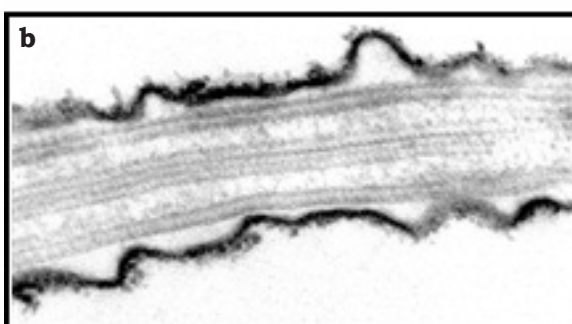
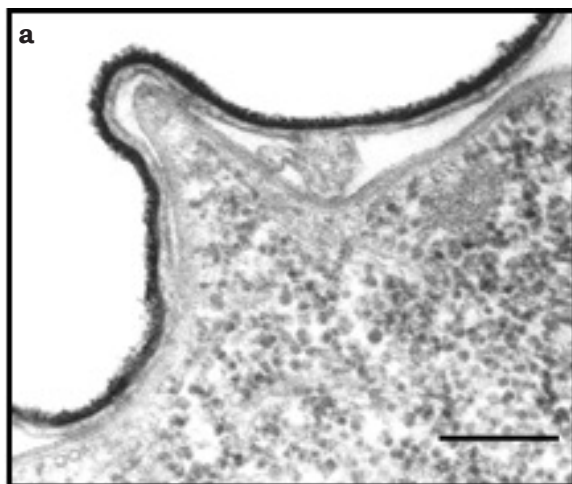
Immunofluorecencyjna lokalizacja w mikroskopii konfokalnej z wykorzystaniem peptydo-specyficznych przeciwciał wykazała charakterystyczne umiejscowienie obu białek: Rab7a w obrębie fagosomów, natomiast Rab7b głównie na obrzeżu cytostomu – wyspecjalizowanego obszaru prowadzącego w głąb aparatu oralnego (**Fig. 4a**), gdzie białko to asocjuje ze strukturami mikrotubularnymi (**Fig. 4b**).

Wyciszenie genu *rab7a* hamuje fagocytozę uniemożliwiając rekrutację V-ATPazy, a tym samym zakwaszenie wnętrza fagosomu, co wykazano też ultrastukturalnie. Nie zaobserwowano widocznych efektów fenotypowych po wyciszeniu paralogicznego genu *rab7b* (Osińska i inni 2011).

Struktura obu izotypów Rab7 *Paramecium* pokrywa się ze strukturą homologicznego białka u człowieka i innych ssaków, a porównanie z TcRab7 z *Trypanosoma cruzi* (Surmacz i inni 2006) wskazało na 21-aminokwasową insercję w sekwencji białka tego pasożytniczego wiciowca wywołującego chorobę Chagasa. Co ciekawe, insercja ta może mieć wpływ na nietypową dla białek Rab7 lokalizację tej GTP-azy w obrębie aparatu Golgiego *T. cruzi* (Araripe i inni 2004). Jak dotąd *Paramecium* jest najstarszym filogenetycznie gatunkiem niższych Eukaryota nie wykazującym powyższej insercji typowej dla Kinetoplastida.

Porównanie wydedukowanej sekwencji aminokwasowej obu izotypów Rab7 *Paramecium* do ludzkiego białka Rab7 wykazało 81,6 – 82,1% homologii. Świadczy to o wysokim stopniu konserwowania białek zaangażowanych w maszynę transportu pęcherzykowego. Wyniki te mają znaczenie dla rozważań dotyczących ewolucji białek i mechanizmów rozwoju dróg sygnałowych – m.in. zanalizowaliśmy 210 tych GTPaz z grupy funkcjonalnej VII, obejmującej białka Rab7 i Rab9. Nasza analiza bioinformatyczna wykazała, że Rab7 pojawiło się wcześniej w ewolucji, przed rozdzieleniem się głównych królestw eukariotycznych. Z kolei białka Rab9 można znaleźć tylko u przedstawicieli *Metazoa* i najprawdopodobniej odzieliły się one od typowych Rab7 jeszcze przed zróżnicowaniem zwierząt tkankowych. Duplikacja genów, która zaszła w tej podrodzynie GTP-az Rab spowodowała powstanie kilku ich kopii u niektórych przedstawicieli *Excavata*, *Ciliata* i *Amoebozoa* (Mackiewicz i Wyroba 2009). Nasze badania wykazały, że ich produkty w przypadku *Paramecium octaurelia* uzyskały w toku ewolucji nowe funkcje – prawdopodobnie wskutek modyfikacji potranslacyjnych (Osińska i inni 2011), co zmienia ich oddziaływanie z efektorami. Takie zaburzenia interakcji pomiędzy białkami Rab7 – regulującymi transport wewnątrzkomórkowy – a efektorami zachodzą w niektórych typach neuropatii u ludzi.

Co ciekawe modyfikacje potranslacyjne leżą u podłoża funkcji innego białka *Paramecium* – parafuzyny, które sklonowano we współpracy z USA w roku 1994 (Subramanian i inni 1994), a jego wyciszenie hamuje inny istotny proces w komórce – egzocytozę.



Co ciekawe modyfikacje potranslacyjne leżą u podłoża funkcji innego białka *Paramecium* – parafuzyny, które sklonowano we współpracy z USA w roku 1994 (Subramanian i inni 1994), a jego wyciszenie hamuje inny istotny proces w komórce – egzocytozę.

Fig. 1a-c Badania ultrastrukturalne nad błoną *Paramecium* z użyciem związku polikationowego czerwieni rutenowej (RR). Uwidocznienie glikokaliks na błonie otaczającej komórkę (a) włącznie z rzęskami (b). Po nadtrawieniu błony plazmatycznej fosfolipazą C widoczna jest ochronna rola alweoli, w których wiązana jest RR i nie dostaje się do wnętrza komórki (c), gdzie widoczne są organelle: m – mitochondrium, t – trichocysta w przekroju poprzecznym. Skala 200 nm. Fot. Elżbieta Wyroba.

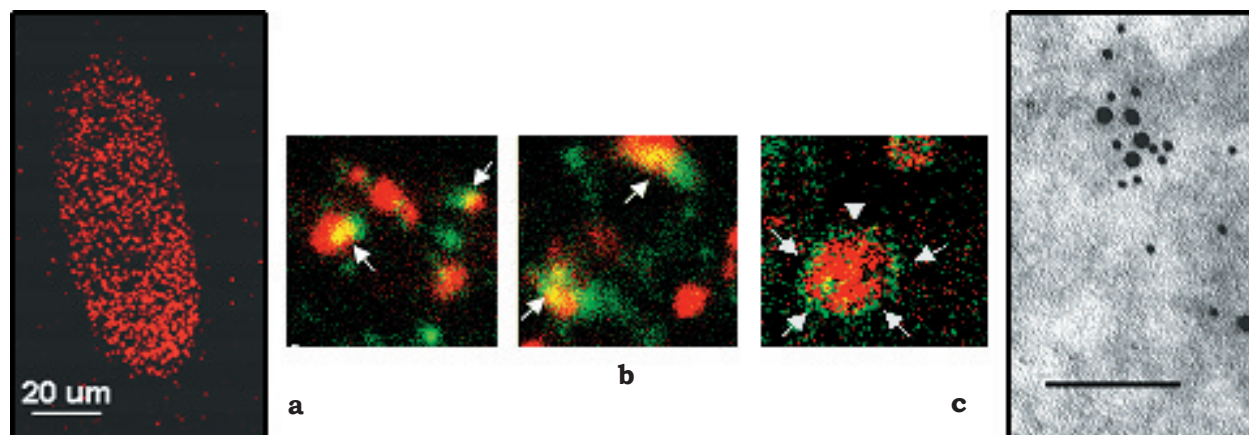


Fig. 2 a-c Endocytoza dynamino-klatryno-zależna. **a** – Internalizacja transferyny (wyznakowanej Texas Red – czerwona) – markera endocytozy zachodzącej z udziałem receptorów w komórkach *P. octaurelia* do tysięcy opłaszczonych pęcherzyków, **b** – Dynamina (zielona) wykrywana specyficznym przeciwciałem wobec fragmentu zdeponowanej przez nas sekwencji aminokwasowej tego białka asocjuje z endosomami w trakcie internalizacji transferyny, **c** – Immunolokalizacja dynaminy (duże ziarna złota 10 nm) i klatryny (ziarna złota 5 nm) w mikroskopii elektronowej. Skala 200 nm. Fot. Jolanta Wiejak, Liliana Surmacz i Elżbieta Wyroba.

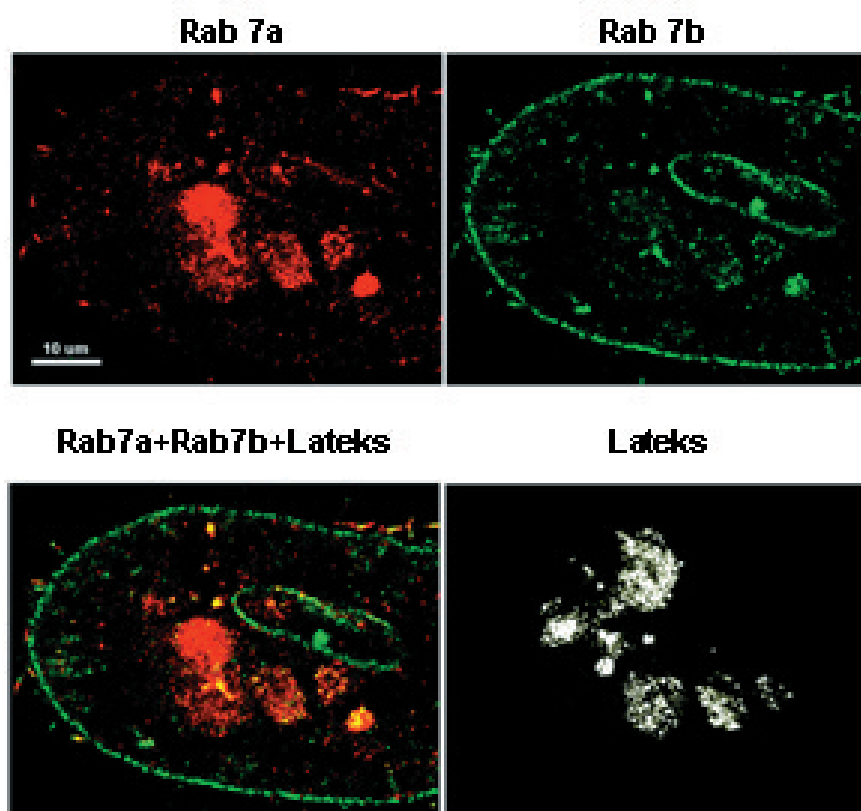


Fig. 3 Lokalizacja izotypów Rab7a i Rab7b w komórkach *Paramecium* w trakcie fagocytozy uwidoczniona za pomocą mikroskopii konfokalnej. Fagosomy zawierające kulki lateksowe widoczne jako białe w ciemnym polu. Przeciwciało anti-Rab7a sprzężone z fluorochromem Cy5 (czerwony), przeciwciało anti-Rab7b sprzężone z fluorochromem FITC (zielony). Skala, 10 μ m. Fot. Magdalena Osińska i Elżbieta Wyroba.

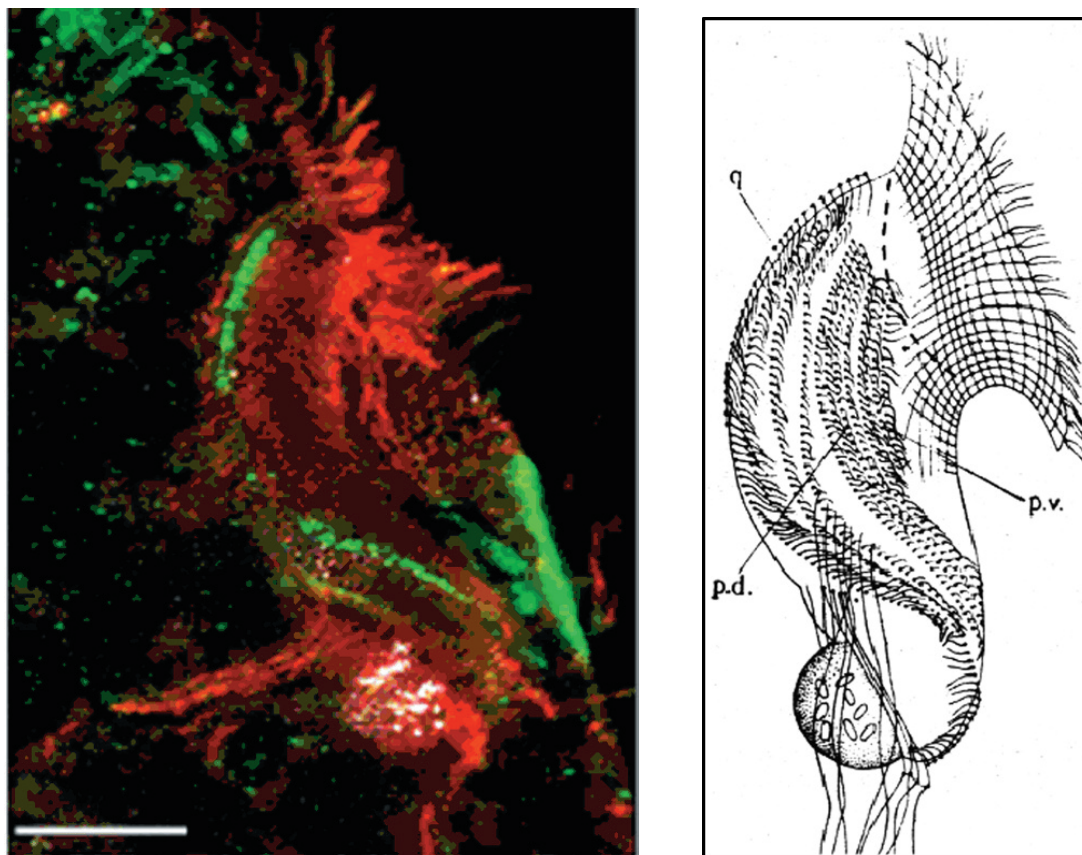


Fig. 4a-b Obrazowanie Rab7b w konfokalnej mikroskopii wysokorozdzielczej STED. Rab7b (zielone, wyznakowane przeciwciałem sprzężonym z FITC) asocjuje ze strukturami mikrotubularnymi w obrębie aparatu oralnego *Paramecium* (a). Widoczny fagosom zawierający kuleczki lateksu (białe), α -tubulina wykrywana przeciwciałem sprzężonym z barwnikiem ATTO 647N (czerwona). Obraz ten porównano ze schematycznym rysunkiem tej struktury (b) z Raabe (1970). Skala, 10 μ m. Fot. Magdalena Osińska i Elżbieta Wyroba.

* Podziękowania dla mgr Szymona Suskiego za formatowanie plików obrazowych do tego opracowania.

Piśmiennictwo

Araripe J.R., Cunha E., Silva N.L., Leal S.T., De Souza W. i Rondinelli E. (2004) *Trypanosoma cruzi*: TcRAB7 protein is localised at the Golgi apparatus in epimastigotes. „Biochem Biophys Res Commun”, **321**: 397-402

Bruckert F., Laurent O. i Satre M. (2000) *Rab7, a multifaceted GTP-binding protein regulating access to degradative compartments in eukaryotic cells*. „Protoplasma”, **210**: 108-116

Liu L., Wyroba E. i Satir B.H. (2011) *RNAi knockdown of parafusin inhibits the secretory pathway*. „Eur. J. Cell Biol”, **90**: 844-853

Luft J.H. (1976) *The structure and properties of the cell surface coat*. „Int Rev Cytol.”, **45**: 291-382

Mackiewicz P., Wyroba E. (2009) *Phylogeny and evolution of Rab7 and Rab9 proteins*. „BMC Evolutionary Biology”, **9**: 101

Obar R.A., Collins, C.A., Hammarback J. A., Shpetner H.S. i Vailee R.B. (1990) *Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins*. „Nature” (London), **347**: 256-261

Osińska M., Wiejak J., Wypych E., Bilski H., Bartosiewicz R. i Wyroba E. (2011) *Distinct expression, localization and function of two Rab7 proteins encoded by paralogous genes in a free-living model eukaryote*. „Acta Biochim. Polon.”, **58**: 597-607

Subramanian S.V., Wyroba E., Andersen A.P. i Satir B.H. (1994) *Cloning and sequencing of parafusin, a calcium-dependent exocytosis-related phosphoglycoprotein*. „Proc Natl Acad Sci U S A.”, **91**: 9832-9836

Surmacz L., Wiejak J. i Wyroba E. (2003) *Evolutionary conservancy of the endocytic machinery in the unicellular eukaryote Paramecium*. *Biol. Cell* **95**: 69-74

Surmacz L., Wiejak J. i Wyroba E. (2006) *Cloning of two genes encoding Rab7 in Paramecium*. „Acta Biochim Polon”, **53**: 149-156

Vitelli R., Chiariello M., Lattero D., Bruni C.B. i Bucci C. (1996) *Molecular cloning and expression analysis of the human Rab7 GTP-ase complementary deoxyribonucleic acid*. „Biochem Biophys Res Commun.”, **229**: 887-890

Wiejak J., Surmacz L. i Wyroba E. (2004) *Dynamin- and clathrin dependent endocytic pathway in unicellular eukaryote Paramecium*. „Biochem. Cell Biol.”, **82**: 547-558

Wyroba E. (1980a) *Release of Paramecium immobilization antigen to the non-nutrient medium*. „Cell Biol. Int. Rep.”, **4**: 1-10

Wyroba E. (1980b) *Ultrastructural effects of hyaluronidase and phospholipase C on the pellicle of Paramecium aurelia*. [w:] *Electron Microscopy*. Ed. Brederoo P., de Priester W., Leiden, **2**: 210-211

Wyroba E. (1981) *Alveolar system of Paramecium. I. Trapping of polycationic dye as a result of membrane impairment*. „Acta Histochem.”, **69**: 132-148

Wyroba E. i Przełęcka A. (1973) *Studies on the surface coat of Paramecium aurelia. I. Ruthenium red staining and enzyme treatment*. „Z. Zellforsch. Mikr. Anat.”, **3**: 343-353

Ultrastruktura mięśnia w procesach przystosowawczych i patologicznych – Anna Jakubiec-Puka

Badania struktury mięśnia prążkowanego technikami mikroskopii świetlnej, a następnie także elektronowej, rozpoczęte zostały w Instytucie im. Nenckiego we wczesnych latach siedemdziesiątych ub. wieku w Zespole biochemii mięśni prof. Witolda Drabikowskiego i są prowadzone nieprzerwanie do chwili obecnej.

Budowa mięśnia prążkowanego ssaków

Aparat skurczu mięśnia prążkowanego składa się z białek strukturalnych i enzymatycznych i charakteryzuje się bardzo regularną budową przestrzenną. Zasadniczymi jego elementami są miofilamenty grube (miozynowe) i miofilamenty cienkie (aktynowe), których wzajemne przemieszczanie leży u podstaw skurczu mięśnia. Filamenty grube usytuowane są równolegle względem siebie, w regular-

nym układzie heksagonalnym (**Fig. 1a**). W środkowej części połączone są między sobą struktura nazwaną błoną środkową M lub linię M (**Fig. 1a, 2**). Filamenty grube tworzą element aparatu skurczu nazwany prążkiem A (**Fig. 2**). Po obu stronach prążka A, pomiędzy końce filamentów grubych wnikają filamente cienkie, z których 6 otacza każdy filament gruby (**Fig. 1a**). W czasie skurczu filamente cienkie przemieszczają się w kierunku linii M. Drugi koniec każdego filamentu cienkiego zakotwiczony jest w strukturze, nazwanej błoną graniczną Z lub linią Z, do której filamente wchodzi w układzie tetragonalnym (**Fig. 1b**). Przestrzeń pomiędzy dwoma liniami Z zawierająca w środku prążek A, nazywana sarkomerem, jest jednostką strukturalną aparatu skurczu (**Fig. 2**). Do linii Z, po obu jej stronach, wiążą się filamente cienkie z dwu sąsiednich sarkomerów (**Fig. 1b, 2b,c**). Przestrzeń pomiędzy sąsiadującymi prążkami A, zawierająca filamente cienkie i w środku linię Z, nazwano prążkiem I (**Fig. 2**). Prążek I ulega skróceniu w czasie skurczu, a zwiększa szerokość w rozkurczu. Liczne kolejne połączone sarkomery tworzą podłużną strukturę nazwaną miofibrylą (lub włókienkiem mięśniowym), która jest organellą skurczu. Miofibryła przebiega wzdłuż podłużnej wielojądrowej komórki mięśniowej, zwanej włóknem mięśniowym, aż do jej końców w okolicy przyczepów do ścięgien. Miofibryle są ułożone równoległe obok siebie, a ich sąsiadujące linie Z są połączone filamentami pośrednimi (**Fig. 2b**) zbudowanymi z białka desminy. Połączenia te formują we włóknie mięśniowym poprzecznie usytuowaną płaszczyznę, nazwaną płaszczyzną Z (**Fig. 2b**), która jest powiązana z elementami tkanki łącznej w przestrzeni międzykomórkowej. Kolejne płaszczyzny Z są rozmieszczone regularnie, równoległe względem siebie, co powoduje również regularne rozmieszczenie prążków A i I sąsiadujących miofibryli, uwidaczniających się jako charakterystyczne poprzeczne prążkowanie.

Funkcjonowanie mięśnia

Skurcz następuje dzięki, równoczesnemu w całym włóknie mięśniowym, przesuwaniu się filamentów cienkich względem grubych. Powoduje to skracanie się sarkomerów i miofibryli, dające skrócenie całego włókna mięśniowego, umożliwiające efektywną pracę. Proces ten jest stymulowany przez jony wapnia, uwalniane do wnętrza komórki ze zbiorników siateczki sarkoplazmatycznej, zorganizowanych w specjalny system oplatający miofibryle. Uwolnienie jonów wapnia następuje w wyniku zadziałania impulsu z nerwu i depolaryzacji błony komórkowej (sarkolemmy). Bodziec dociera do sarkomerów w całym włóknie mięśniowym, dzięki kanalikom, nazwanym kanalikami T lub tubułami T (**Fig. 3**), wnikającym od sarkolemmy w głąb włókna mięśniowego pomiędzy miofibryle. Kanaliki T stykają się ze zbiornikami siateczki sarkoplazmatycznej, którym przekazują sygnał dla uwolnienia wapnia. Kanalik T wraz z dwoma przyległymi zbiornikami tworzy kompleks strukturalny nazwany „triadą” (**Fig. 3**).

Działanie mięśnia w zależności od warunków

Czynność mięśnia zależy od ilości impulsów dochodzących przez nerw z nerwowych komórek ruchowych (motoneuronów). Zmiana impulsacji z motoneuronów powoduje zmianę w czynności mięśnia, co dla zapewnienia skuteczności

funkcjonowania prowadzi do odpowiedniej przebudowy struktury mięśnia, w tym aparatu skurczu. Charakterystyczną cechą tkanki mięśniowej jest jej ogromna możliwość adaptacji do wymogów zmienionej czynności. Ta właściwość mięśni warunkuje łatwość uczenia się nowych czynności, jak też leży u podstaw wyczynów sportowych.

W sytuacji utraty kontaktu z motoneuronem (odnerwienie) włókno mięśniowe przestaje się kurczyć i zaczyna zanikać (ulega atrofii). W odnerwionym mięśniu zmniejsza się masa i średnica włókien, a w nich ilość i regularność aparatu skurczu (**Fig. 4, 5, 6a**). Znikają zwłaszcza filamenty miozynowe (**Fig. 5**), których główny składnik - białko miozyna szybko reaguje na zmiany czynności zmianami ilościowymi i jakościowymi. Po ponownym unerwieniu (re-innerwacja) mięsień powraca do stanu normalnego - aparat skurczu ma zdolność szybkiej odbudowy i reorganizacji (**Fig. 5d, 6b, 7a**). W razie braku re-innerwacji atrofia odnerwienia postępuje (**Fig. 6a**), a w miarę upływu czasu, tkanka mięśniowa zostaje zastępowana tkanką łączną.

Tkanka mięśniowa ma także zdolność szybkiego przystosowywania się do zmiany warunków anatomicznych, jak na przykład wydłużenie, lub skrócenie mięśnia (**Fig. 7**). W takich sytuacjach mięsień ulega przebudowie, a aparat skurczu przeorganizowaniu, aby jego ilość oraz struktura były optymalne dla nowych warunków funkcjonowania. Te właściwości mięśni pozwalają na szybki powrót ruchomości po urazach i uszkodzeniach, mają więc kapitalne znaczenie dla przetrwania zwierzęcia.

Należy jednak pamiętać, że te bardzo korzystne procesy przystosowawcze mogą w niesprzyjających warunkach, zamiast ulepszać funkcjonowanie mięśnia, wywoływać zmiany niekorzystne, prowadzące do patologii, a nawet niszczenia i zwłóknienia mięśnia. Dochodzi do tego, na przykład, po długotrwałej nieczynności lub w dystrofiach mięśniowych (**Fig. 8**).

W Instytucie im. Nenckiego zajmowano się mięśniami poddanymi różnym stanom eksperymentalnym, jak odnerwienie, re-innerwacja, nieczynność, tenotomia, (t.j. przecięcie ścięgna), przeciążenie pracą, zmienienie długości, stymulacja bodźcami elektrycznymi, a także mięśniami dystroficznymi. Badania prowadzone były celem lepszego zrozumienia schorzeń mięśniowych u ludzi oraz w aspekcie przydatności dla ich leczenia i rehabilitacji. Wiele prac wykonano we współpracy z ośrodkami zagranicznymi.

Elektronomikrogramy zostały wykonane w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN przy udziale Panów Henryka Bilskiego, Kazimierza Krawczyka i Szymona Suskiego. Zdjęcia robiono na mikroskopach JEM 100 B oraz JEM 1200 EX (Jeol Ltd Tokyo).

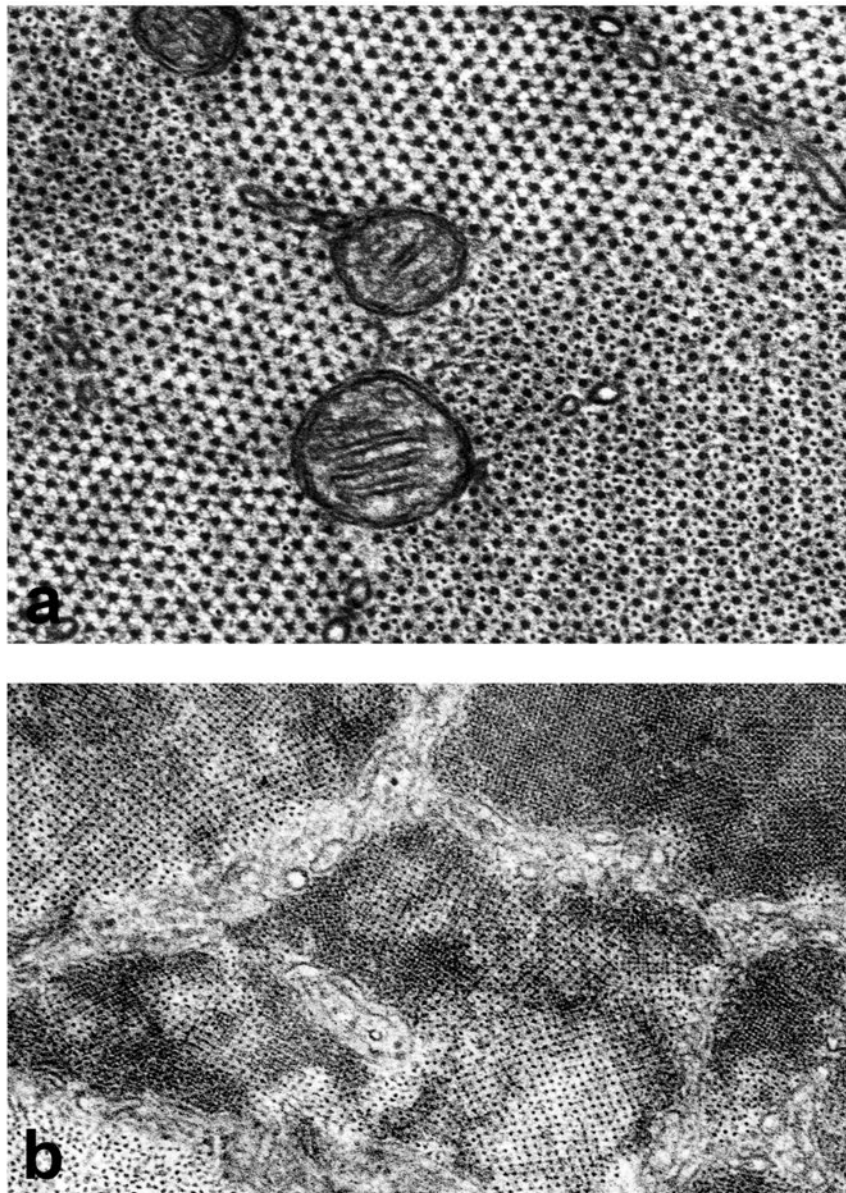


Fig. 1a-b Ultrastruktura aparatu skurczu mięśnia podudzia szczura, przekrój poprzeczny (przekrój w płaszczyźnie prostopadłej do osi włókna mięśniowego). **a.** Prażek A. W górnej i lewej części elektronomikrogramu widoczny przekrój przez miofibryle na poziomie linii M: regularny heksagonalny układ miofilamentów grubych, połączonych strukturami linii M. W prawej dolnej części oraz w lewym górnym rogu przekrój przez prażek A w rejonie zachodzenia na siebie obu typu miofilamentów: każdy filament gruby otoczony jest przez 6 filamentów cienkich. Między miofibrylami widoczne kanaliki siateczki sarkoplazmatycznej i mitochondria. **b.** Linia Z w kilku sąsiadujących miofibrylach, rozdzielonych kanalikami siateczki sarkoplazmatycznej. Regularna tetragonalna struktura linii Z i tetragonalny układ filametów cienkich wchodzących do linii Z, przemieszczony o 45 stopni w stosunku do układu filamentów wchodzących do linii Z ze strony przeciwnej, należących do następnego sarkomeru (dobrze odróżnialne w środkowym rejonie elektronomikrogramu i w lewym górnym rogu). W górnym prawym rogu widoczny drobniejszy układ tetragonalny, reprezentujący środkową warstwę linii Z, gdzie są obecne filamenty aktynowe wchodzące z obu stron linii Z. Preparaty przygotowywane metodą standardową (Fot. i opis szczegółowy: Anna Jakubiec-Puka 1985). Powiększenia: **(a)** 82 000x; **(b)** 40 000x.

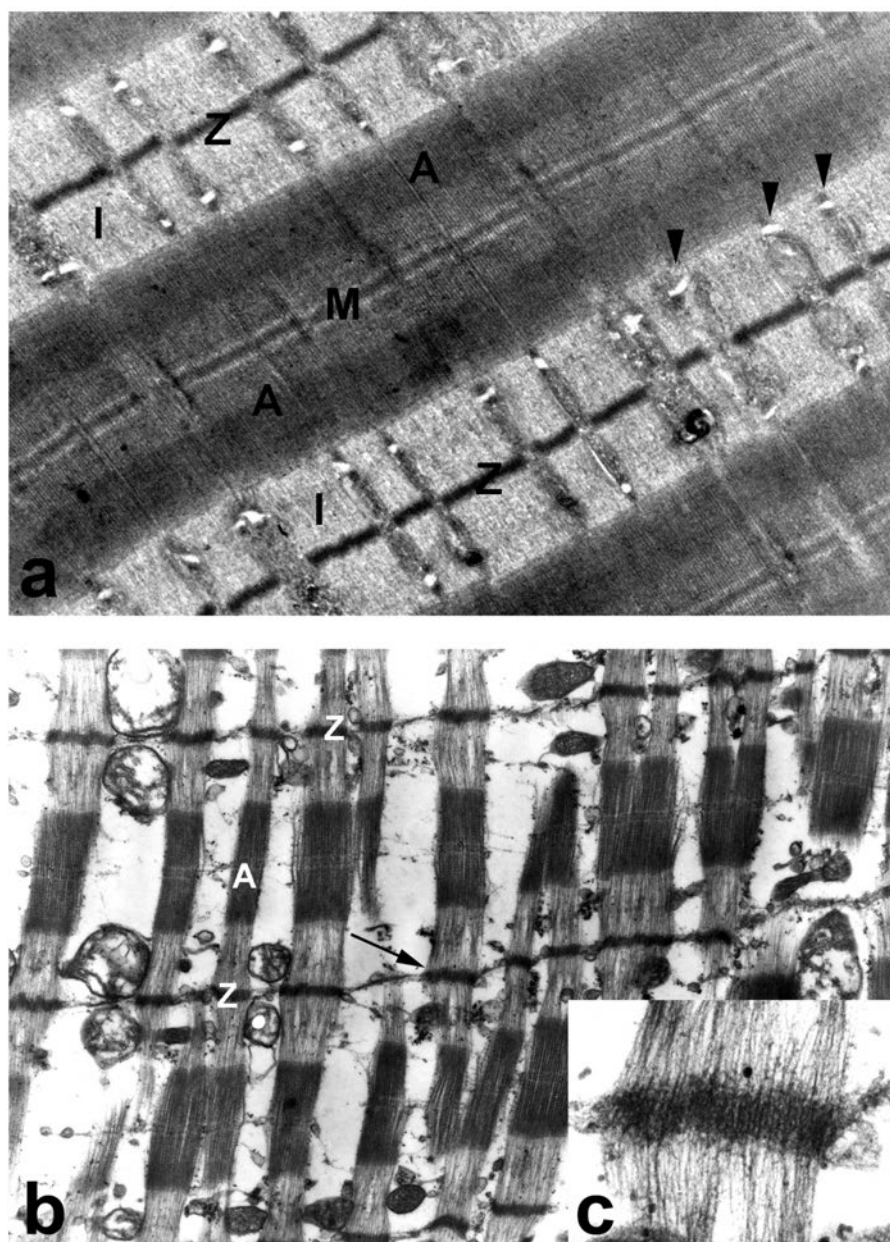


Fig. 2a-c Ultrastruktura aparatu skurczu mięśnia podudzia szczura; przekrój podłużny (przekrój w płaszczyźnie równoległej do osi włókna mięśniowego). Widoczne: prażek A (**A**) z linią M (**M**), prażek I (**I**) z linią Z (**Z**). **a.** Preparat przygotowywany metodą bez odwadniania tkanki. (opis szczegółowy: Jakubiec-Puka i wsp. 1989), co pozwoliło na lepsze uwidocznienie elementów błonowych: dobrze odróżnialne kanaliki T i „triady” pomiędzy miofibrilami (strzałki). **b.** Mięsień po zastosowaniu ekstrakcji roztworem gliceryny na etapie procedury poprzedzającym przygotowywania preparatu do badania w mikroskopie elektronowym (Jakubiec-Puka 1981; Szczepanowska i wsp. 1987). Pozwoliło to na lepsze uwidocznienie ultrastruktury elementów białkowych: wyraźnie odseparowane i porzysowane indywidualne miofibryle oraz dobrze odróżnialne płaszczyzny Z (utworzone przez linie Z sąsiadujących miofibryli, połączone strukturami zawierającymi desminowe filamenty pośrednie) Elementy błonowe, w tym mitochondria, zostały uszkodzone, lub całkowicie wypłukane. **c.** Powiększony fragment elektronomikrogramu **b** (wskazany strzałką). Linia Z jednej miofibryli z widocznymi filamentami cienkimi wnikającymi w nią z obu stron. Powiększenia: **(a)** 25 000x; **(b)** 10 000x; **(c)** 38 000x. Fot. Anna Jakubiec-Puka.

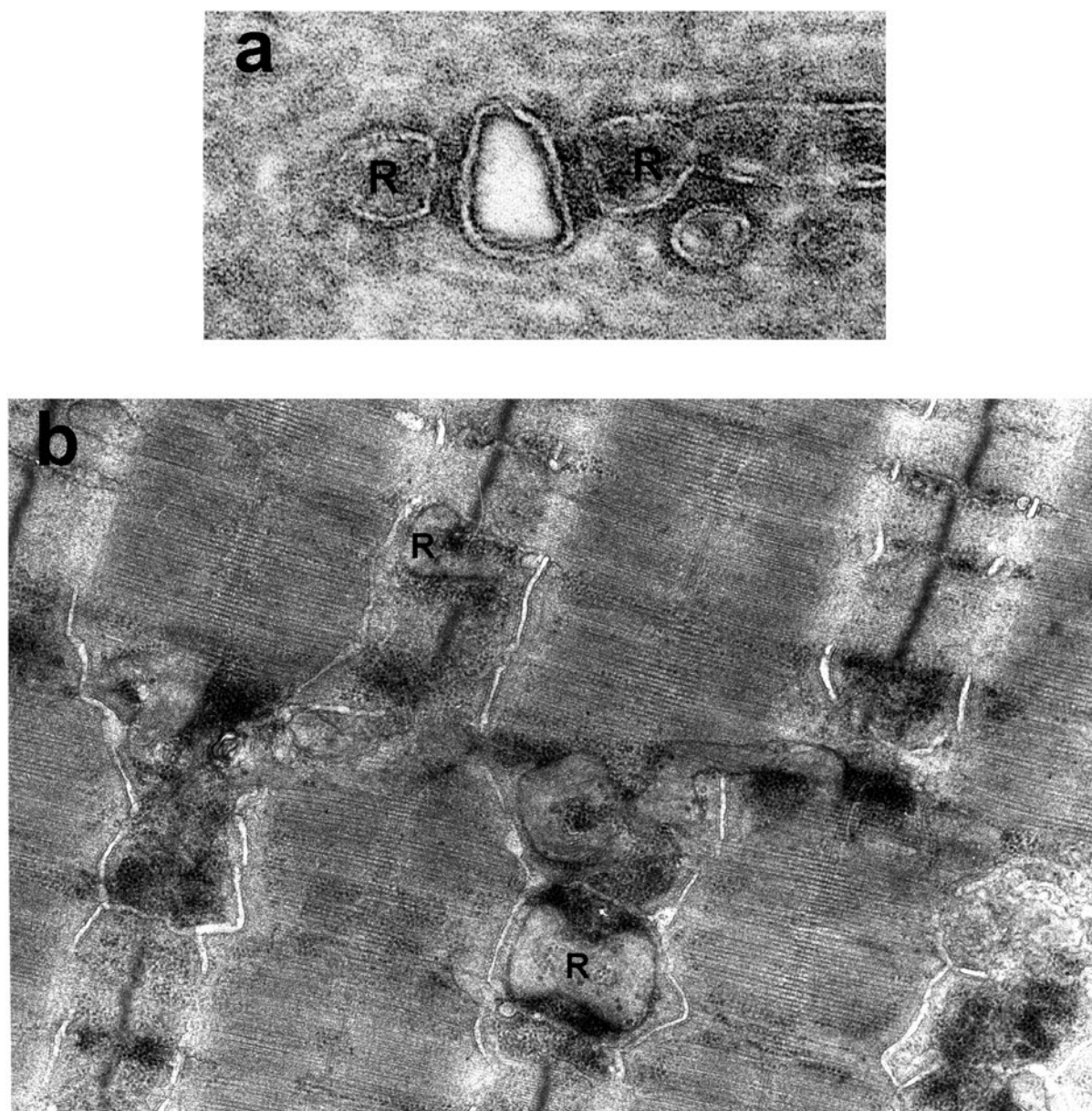


Fig. 3a-b Ultrastruktura kanalików T na przekroju podłużnym mięśnia podudzia szczura. **a.** Obraz typowej „triady”: Kanalik T w przekroju poprzecznym oraz przylegające do niego z dwu stron zbiorniki siateczki sarkoplazmatycznej (**R**). Widoczna wielowarstwowa budowa błon. Preparat przygotowany metodą bez odwadniania tkanki. **b.** W górnej części elektronomikrogramu typowe „triady” między miofibrilami. W środkowej i dolnej części obrazka kanalik T są uwidocznione w przekroju podłużnym, wzdłuż ich przebiegu. Kanaliki T biegną pomiędzy miofibrilami, poprzecznie do osi miofibryli, lub wokół miofibryli. Widoczne są przylegające do kanalików zbiorniki siateczki sarkoplazmatycznej (**R**). Preparat przygotowywany metodą standardową. Powiększenia: (**a**) 210 000x; (**b**) 23 000x. Fot. Anna Jakubiec-Puka

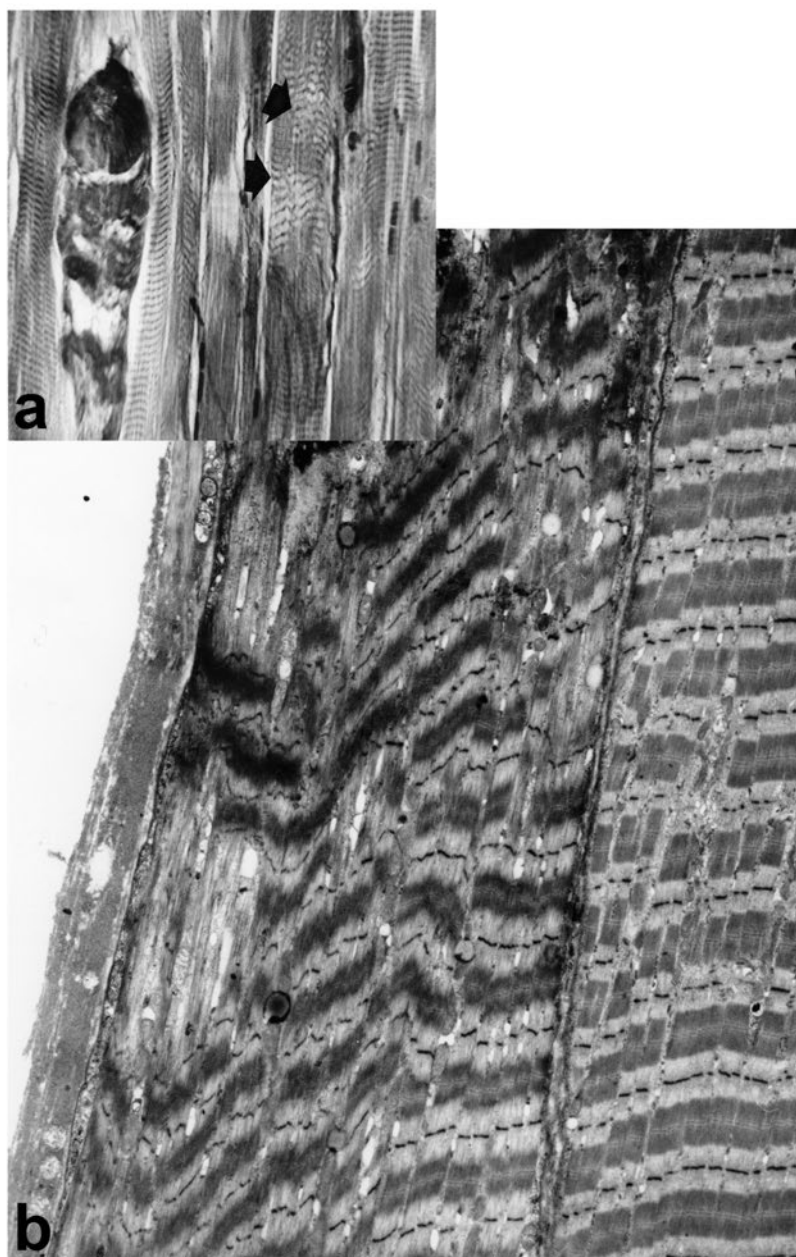


Fig. 4 a-b Odnerwione atroficzne mięśnie podudzia szczura: 30 dni (a) i 60 dni (b) po odnerwieniu; przekroje podłużne. **a.** Obraz z mikroskopu świetlnego: widoczne zmniejszenie średnicy i nieregularny obrys włókien mięśniowych; poprzeczne prążkowanie jest zachowane w niektórych tylko włóknach, w większości włókien jest ono nieregularne (strzałki), lub zupełnie niewidoczne; po lewej stronie fotografii nekrotyczne włókno mięśniowe. Preparat wykonany w parafinie, barwiony met. Mallory (opis procedury w pracy: Jakubiec-Puka i Laskowska-Bożek 1974). **b.** Obraz z mikroskopu elektronowego odnerwionego mięśnia podanego dodatkowo treningowi biernemu (Jakubiec-Puka i wsp. 2008). Ultrastruktura podobnych zmian, jakie wskazano strzałkami na ilustracji **a.** Aparat skurczu bardzo nieregularny z ubytkami i zagęszczeniami, tuż obok zachowanego regularnego w tym samym włóknie i w sąsiednim. Preparat przygotowywany metodą standardową. Jak widać, ciężko uszkodzone, a nawet nekrotyczne włókna mięśniowe mogą znajdować się w bezpośrednim sąsiedztwie włókien dobrze zachowanych, a poważne zaburzenia struktury kurczliwej tuż obok jej obszarów o regularnej budowie. Powiększenia: **(a)** 290x; **(b)** 3 600x. Fot. Anna Jakubiec-Puka.

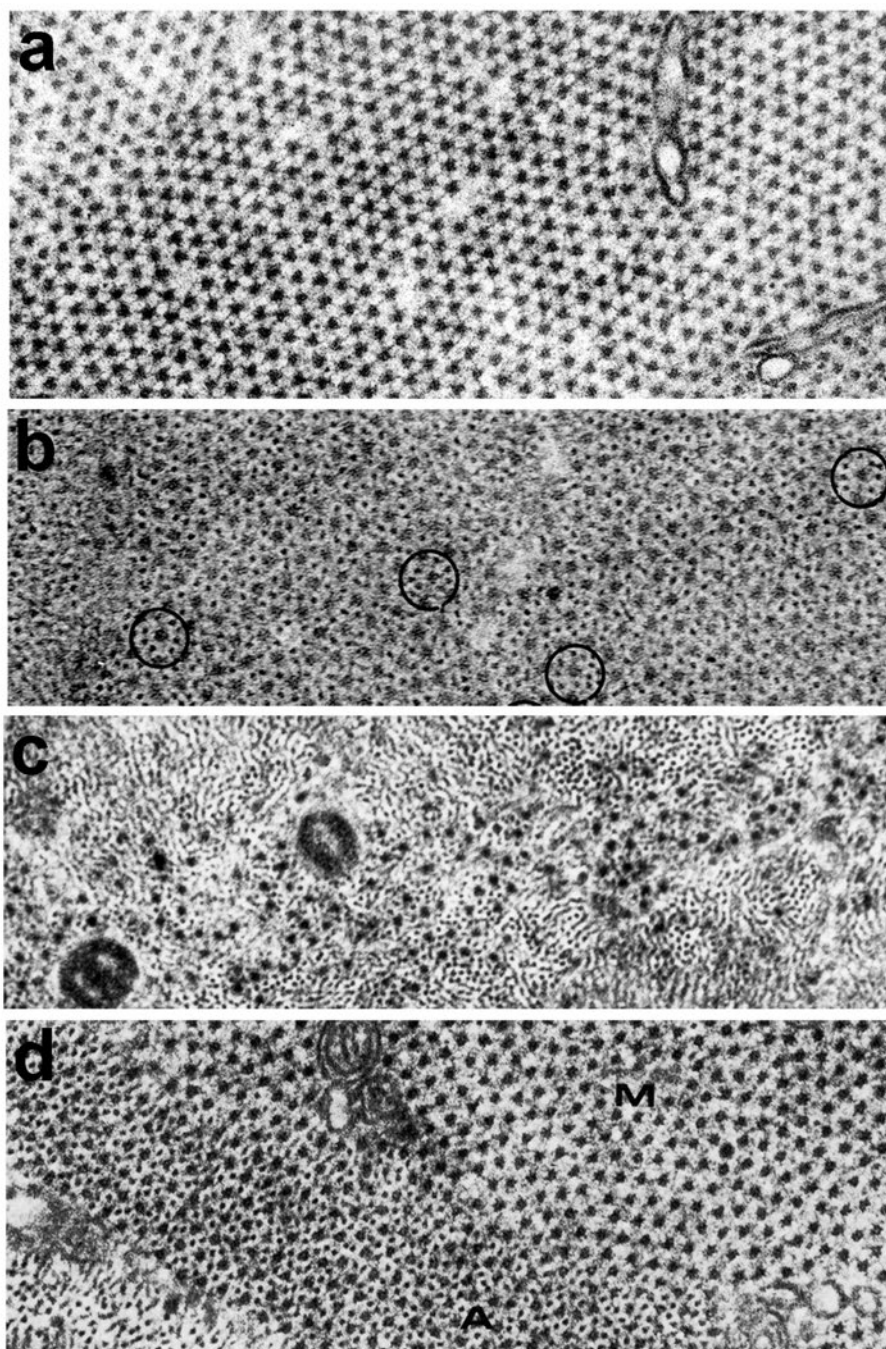


Fig. 5a-d Odnerwione mięśnie podudzia szczura: 3 dni (**a**, **b**), 14 dni (**c**) po odnerwieniu, oraz 27 dni po odwracalnym odnerwieniu, w tym 10 – 12 dni po re-innerwacji (**d**); przekroje poprzeczne przez miofibryle na poziomie prążka A. **a**. Puste miejsca w strukturze linii M po ubytku pojedynczych filamentów grubych z regularnego heksagonalnego układu (Jakubiec-Puka 1992). **b**. Zwiększona proporcja filamentów cienkich do grubych (zaznaczone kółkami) w wyniku wcześniejszego znikania w odnerwionym mięśniu filamentów grubych (Jakubiec-Puka i wsp. 1981). **c**. Nieregularny aparat skurczu: bardzo znaczne zmniejszenie ilości miofilamentów grubych i całkowity brak układu heksagonalnego (Jakubiec-Puka i wsp. 1981). **d**. Zwiększenie ilości oraz regularności rozmieszczenia miofilamentów (w porównaniu z elektromicrogramem **c**) w mięśniu odbudowującym się z atrofii odnerwiennej (Jakubiec-Puka i wsp. 1982). Preparaty przygotowywane metodą standardową. Powiększenia: (**a**) 84 000x; (**b**) 95 000x; (**c**) 53 000x; (**d**) 78 000x. Fot. Anna Jakubiec-Puka.

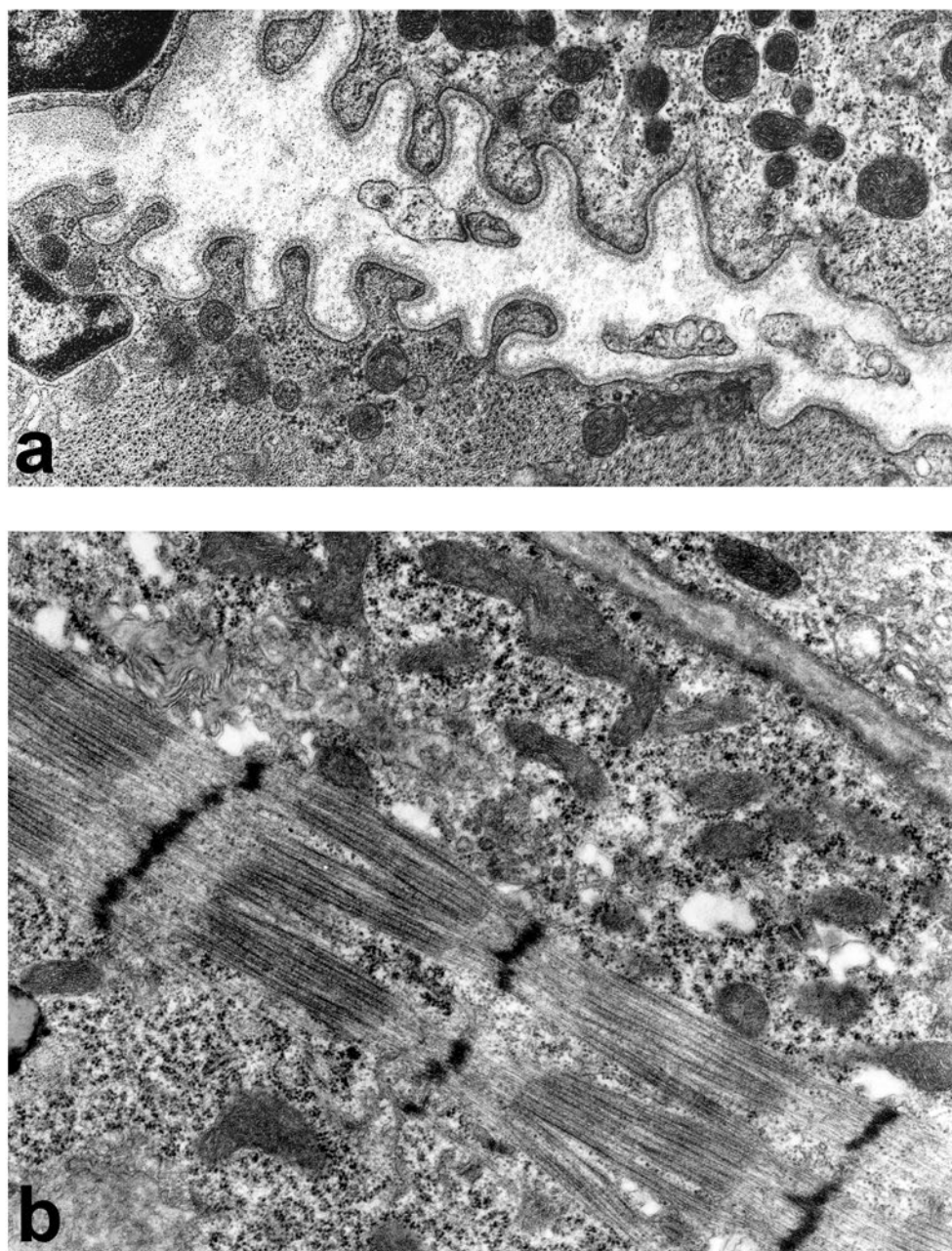


Fig. 6a-b Okolica błony komórkowej (sarkolemmy) w atroficznym i odbudowującym się włóknie mięśniowym. **a.** Atroficzny mięsień podudzie szczura 60 dni po odnerwieniu; przekrój poprzeczny. W dwóch sąsiadujących włóknach pofałdowana sarkolemma, której nadmiar jest skutkiem zmniejszenia się objętości atroficznej komórki. **b.** Odbudowujący się z atrofii odnerwiennej mięsień podudzia szczura, 19 dni po odwracalnym odnerwieniu, w tym 4 -5 dni po re-innerwacji; przekrój podłużny. Tworzące się nowe miofibryle, otoczone przez liczne polisomy i mitochondria; w prawym górnym rogu widoczna sarkolemma i sąsiednie włókno mięśniowe (Jakubiec-Puka i wsp. 1982). Preparaty przygotowywane metodą standardową. Powiększenie: **(a)** 26 000x; **(b)** 180 000x. Fot. Anna Jakubiec-Puka.

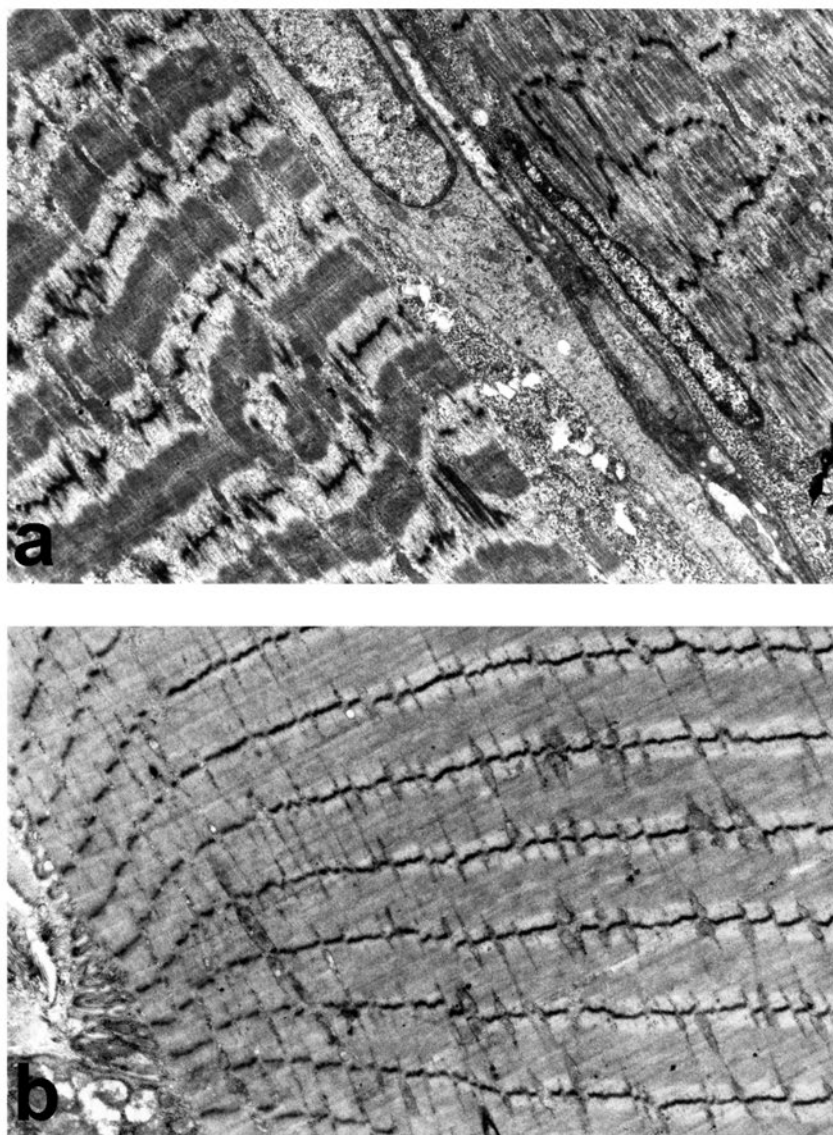


Fig. 7a-b Przebudowa struktury kurczliwej; przekroje podłużne. **a.** Odbudowujący się z atrofii odnerwiennej mięsień podudzia szczura, 19 dni po odwracalnym odnerwieniu, w tym 4-5 dni po re-innerwacji. Nieregularności linii Z, oraz płaszczyzn Z w dwóch sąsiednich włóknach mięśniowych, wskazujące na przeorganizowywanie aparatu skurczu; widoczne tworzące się „dodatkowe sarkomery” i formujące się nowe płaszczyzny Z. Obraz ten przypomina aparat skurczu przeorganizowujący się po zwiększeniu długości mięśnia (Jakubiec-Puka 1985). **b.** Unieruchomiony mięsień podudzia szczura stymulowany elektrycznie 6 godzin. Po lewej stronie elektronomikrogramu widoczne zmiany będące prawdopodobnie etapem w procesie eliminowania fragmentu aparatu skurczu: znaczne zagęszczenie płaszczyzn Z, zwężenie prążka A oraz brak prążka I; sarkolemma bardzo pofałdowana, co wskazuje na jej nadmiar na skutek skrócenia włókna mięśniowego. Po prawej stronie fotografii: wyglądający normalnie, regularny aparat skurczu, o prawidłowej długości sarkomerów. Od prawej strony ku lewej zwiększa się stopień zagęszczenia płaszczyzn Z. (Jakubiec-Puka i Carraro 1991). Preparaty przygotowywane metodą standardową. Powiększenia: **(a i b)** 4 500x. Fot. Anna Jakubiec-Puka.

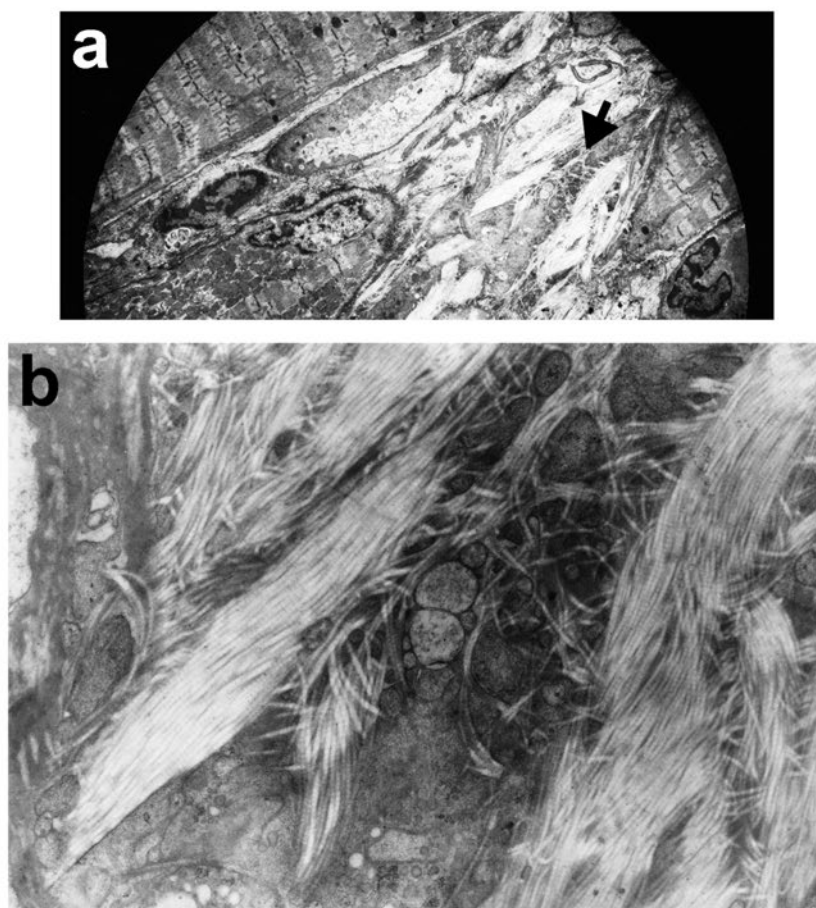


Fig. 8 a-b Mięsień podudzia myszy z dystrofią mięśniową, spowodowaną brakiem błonowego białka α -sarkoglikanu (składnik kompleksu białek związanych z dystrofią); przekrój podłużny. **a.** Elektronomikrogram ukazuje duże ilości kolagenu nieregularnie rozmieszczonego pomiędzy włóknami mięśniowymi o prawidłowym wyglądzie (w tym rejonie mięśnia zdrowej myszy występują jedynie nieznaczne ilości włókien kolagenowych). **b.** Powiększenie okolicy wskazanej strzałką na fotografii **a.** Nieregularne pęczki włókien kolagenu oraz chaotycznie rozrzucone pojedyncze włókna kolagenowe poprzecinane w różnych płaszczyznach: podłużnej, skośnej lub poprzecznej (Jakubiec-Puka i wsp. 2005; Danieli-Betto i wsp. 2005.) Preparat przygotowywany metodą standardową.

Powiększenia: **(a)** 1 600x; **(b)** 9 500x. Fot. Anna Jakubiec-Puka.

Piśmiennictwo

Danieli-Betto D., Esposito A., Germinario E., Sandona D., Martinello T., Jakubiec-Puka A., Biral D. i Betto R. (2005) *Deficiency of α -sarcoglycan differentially affects fast- and slow-twitch skeletal muscles.* „Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.”, **289**: R1328-R1337

Jakubiec-Puka A. i Laskowska-Bożek H. (1974) *Morphological changes of fast and slow skeletal rat muscle following denervation.* „Folia Histochem. Cytochem.”, **12 (3-4)**: 301-314

Jakubiec-Puka A. (1981) *Filamenty pośrednie (10 nm) włókien mięśniowych.* „Postępy Biochemii”, **27**: 319-325

Jakubiec-Puka A., Kulesza-Lipka D. i Krakewski K. (1981) *The contractile apparatus of striated muscle in the course of atrophy and regeneration. I. Myosin and actin filaments in denervated rat soleus.* „Cell Tiss. Res.”, **220**: 651-663

Jakubiec-Puka A., Kulesza-Lipka D. i Kordowska J. (1982) *The contractile apparatus of striated muscle in the course of atrophy and regeneration. II. Myosin and actin filaments in the mature rat soleus muscle regenerating after reinnervation.* „Cell Tiss. Res.”, **227**: 641-650

Jakubiec-Puka A. (1985) *Reconstruction of the contractile apparatus of striated muscle. I. Muscle maintained in extension.* „J. Muscle Res. Cell Motil.”, **6**: 385-401

Jakubiec-Puka A. Frosch D. i Rudel R. (1989) *Ultrastructure of the contractile apparatus of rat skeletal muscle embedded in an aqueous medium.* „Gen. Physiol. Biophys.”, **8**: 185-202

Jakubiec-Puka A. i Carraro U. (1991) *Remodelling of the contractile apparatus of striated muscle stimulated electrically in a shortened position.* „J. Anat.”, **178**: 83-100

Jakubiec-Puka A. (1992) *Changes in myosin and actin filaments in fast skeletal muscle after denervation and self-reinnervation.* „Comp. Biochem. Physiol.”. 102A (1): 93-98

Jakubiec-Puka A., Biral D., Krawczyk K. and Betto R. (2005) *Ultrastructure of diaphragm from dystrophic α -sarcoglycan-null mice.* „Acta Biochem. Polon.”, **52** (2): 453-460

Jakubiec-Puka A., Sławińska U., Rędownicz M. J., Biral D., Łapińska I., Chomontowska H., Karczewska E., Krawczyk K., Bilski H. i Pliszka B. (2008) *Influence of locomotor training on the structure and myosin heavy chains of the denervated rat soleus muscle.* „Neurol. Res.”, **30**: 170-178

Szczepanowska J., Borovikov Y. i Jakubiec-Puka A. (1987) *Effect of denervation, reinnervation and hypertrophy on the state of actin filaments in skeletal muscle fibres.* „Eur. J. Cell Biol.”, **43**: 394-402

Pierwszy w Polsce Mikroskop Konfokalny – Paweł Pomorski

Pierwszy w Polsce mikroskop konfokalny pojawił się w Instytucie Biologii Doświadczalnej tuż po pierwszej wojnie w zatoce Perskiej, w 1991 roku. Zbieżność ta nie była przypadkowa, gdyż wciąż obowiązywały wówczas ograniczenia CoCom, komisji kontroli wysokich technologii, które utrudniały dostawę komputera kontrolującego skaner mikroskopu.

Zakupionym urządzenie to był mikroskop Sarastro Phoibos 1000, produkowany przez Szwedzką firmę Sarastro w oparciu o mikroskop Optiphot firmy Nikon, wyposażony w obiektywy 63x oraz 100x o aperturze numerycznej 1.4. W trakcie procedury zakupu, firma Sarastro została wykupiona przez amerykańską spółkę Molecular Dynamics i mikroskop dostarczono jako MD Sarastro Phoibos 1000. Za wyborem tego a nie innego urządzenia stało bardzo zaawansowane oprogramowanie do rekonstrukcji 3D, chronione patentami przez firmę Sarastro, niedostępne w ówczesnych urządzeniach firmy BioRad. Pionierskie oprogramowanie pozwalało na obliczanie rzutów z serii skrawków konfokalnych metodami ma-

ksymalnej jasności oraz średniej jasności, proste rekonstrukcje powierzchniowe jak i tworzenie klasycznych przekroi w osi pionowej.

Mikroskop był bardzo prosty, jeśli porównać go z dzisiejszymi standardami. Składał się z ławy optyczną umieszczoną powyżej mikroskopu, wyposażonej w jeden laser argonowy, skaner i dwa fotopowielacze z możliwością ręcznej wymiany zwierciadeł dichroicznych i filtrów w drodze optycznej oraz standardowego mikroskopu optycznego. Całość była kontrolowana przez komputer Silicon Graphics Personal Iris, pracujący pod kontrolą systemu Unix, za pośrednictwem interfejsu GPIB. Ta egzotyczna konstrukcja powodowała, że mikroskop nie był urządzeniem bardzo przyjaznym dla użytkownika. Mimo, że elektronika służąca do obrazowania konfokalnego była sterowana z komputera, sam mikroskop optyczny pozostawał urządzeniem całkowicie manualnym. Sprzęt był prosty, pozwolił jednak na wizualizacje skomplikowanego zachowania cytoszkieletu otoczki jądrowej pierwotniaka *Amoeba proteus* jak i rozkładu cytoszkieletu towarzyszącego adhezji tego pierwotniaka do podłoża (Pomorski P. i Grebecka L. 1993, 1995; Grębecka L. i inn. 1997). Mikroskop pozwolił też na i pierwsze obrazowanie kompletnego układu nerwowego przywry *Diplostomum pseudospathaceum* (Niewiadomska K. i inn. 1999).

Mikroskop funkcjonował przez 10 lat w ramach Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, kierowanej przez prof. Elżbietę Wyrobę. Na skutek wyeksploatowania komputera sterującego mikroskop stał się zawodny na początku XXI wieku a pojawienie się znacznie lepszych i wygodniejszych urządzeń zmniejszyło zainteresowanie potencjalnych użytkowników.

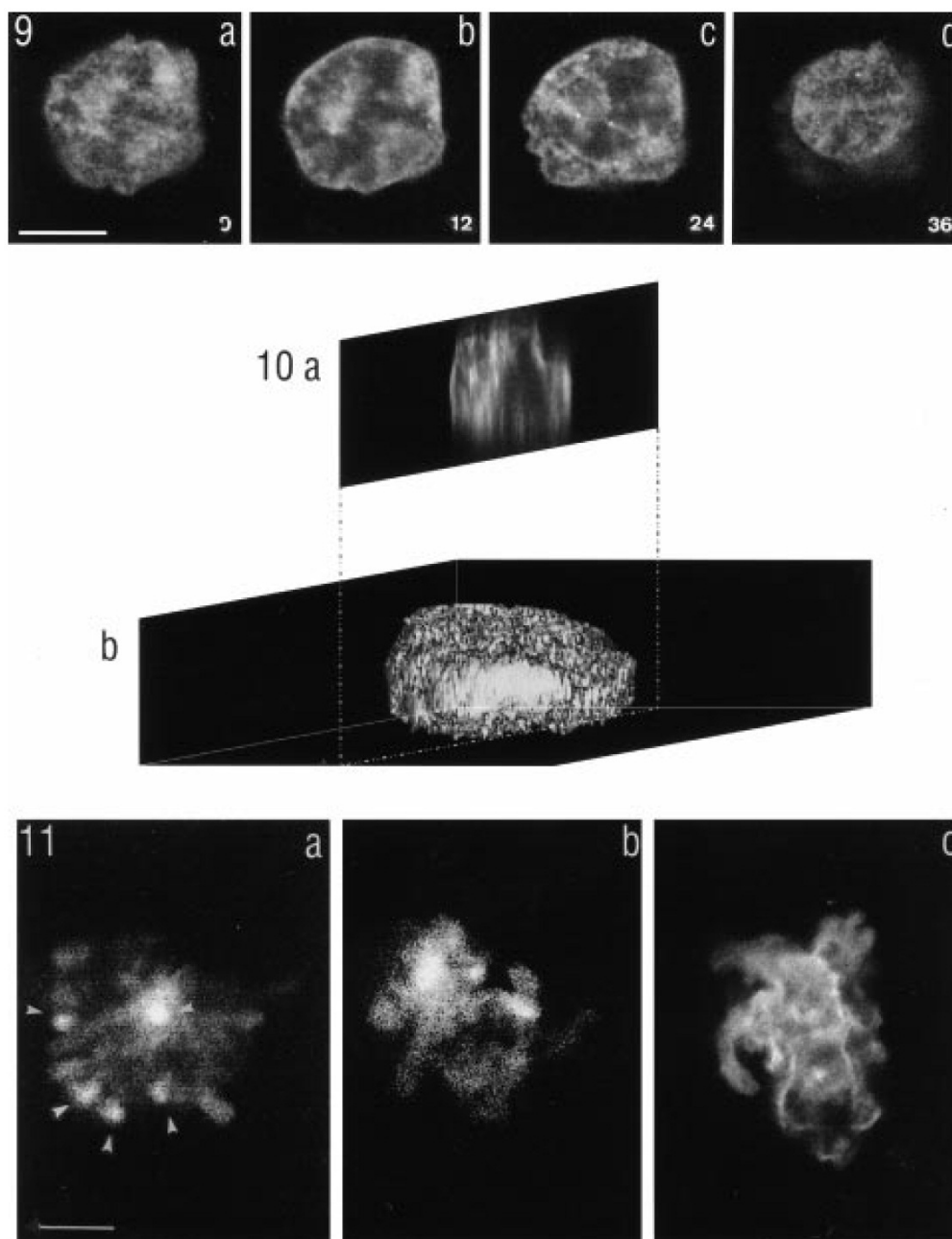


Fig. 1 (w oryginale 9). Skrawki optyczne przez bezjądrowy fragment komórki *Amoeba proteus* hodowanej przez 24 godziny na szkle pokrytym poli-L-lizyną. Proszę zwrócić uwagę na duże obszary bogate w aktynę znajdujące się przy powierzchni szkła, wyraźnie zaznaczony korteks aktynowy powyżej (12 μm) i nieregularny układ aktyny w skrawkach najdalszych od powierzchni podłoża (24 i 36 μm). Fot. Paweł Pomorski.

Fig. 2 (w oryginale 10). Przekrój pionowy (a) przez trójwymiarową rekonstrukcję rozkładu F-aktyny z serii skrawków pokazanych na Fig. 1. Widać ciągłość warstwy struktur aktynowych po brzusznej stronie komórki. Fot. Paweł Pomorski.

Fig. 3 (w oryginale 11). Skrawki optyczne wykonane na poziomie podłoża wykonane przez bezjądrowe fragmenty *Amoeba proteus* hodowane przez 24 godziny na szkle pokrytym konkanawaliną (a) i nie pokrywanym niczym. (c) skrawek wykonany w połowie grubości komórki przez fragment bezjądrowy inkubowany 72 godziny na powierzchni pokrywanej konkanawaliną. Główki strzałek pokazują nagromadzenie aktyny w rejonie frontalnych struktur adhezyjnych jak i w środkowej części komórki. Skala 50 μm . Fot. Paweł Pomorski.

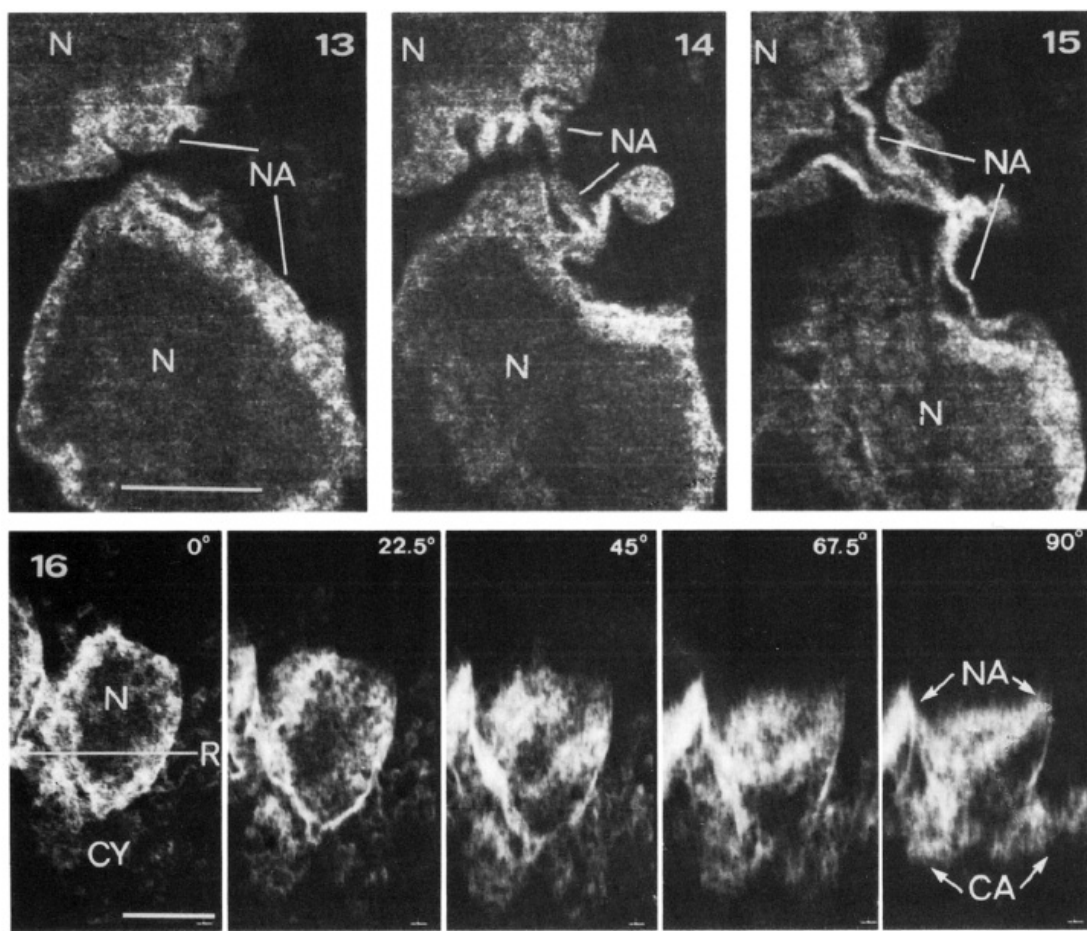


Fig. 4 (woryginale 13-15). Skrawki optyczne przez podwójne jądro *Amoeba proteus* wykonane w powyżej płaszczyzny mostka łączącego jądra potomne (13), na poziomie, gdzie mostek łączy się z otoczką jądrową (14) i w płaszczyźnie silnie poskręcanej struktury samego mostka (15). Warto zwrócić uwagę na grubą warstwę aktynową otaczającą jądro i pasma aktyny w mostku łączącym jądra. Skala 5 μm .). Fot. Paweł Pomorski.

Fig. 5 (woryginale 16). Trójwymiarowa rekonstrukcja obszaru okołojądrowego (N - jądro) z otaczającą je cytoplazmą (CY) obracana wokół osi poziomej (R) i pokazana pod pięcioma różnymi kontami. Proszę zwrócić uwagę na kontakt pomiędzy aktyną perinuklearną i podobłonną widoczny pod kontami 45° - 90°. Skala 10 μm . Fot. Paweł Pomorski.

Piśmiennictwo

Pomorski P. i Grebecka L. (1993) *Is actin involved in the nuclear division in Amoeba proteus?* „Cell Biol. Int.”, **17(5)**: 521-524

Pomorski P. i Grebecka L. (1995) *Nuclear-movements and nuclear actin in bilobed nuclei of Amoeba proteus.* „Europ. J. Protisto.”, **31(3)**: 260-267

Grebecka L., Pomorski P., Lopatowska A. i Grebecki A. (1997) *Adhesion-dependent F-actin pattern in Amoeba proteus as a common feature of amoebae and the metazoan motile cells.* „Cell Biol Int.”, **21(9)**: 565-573

Niewiadomska K., Czubaj A., Maślińska D. i Pomorski P. (1999) *A supplementary data on nervous system of daughter sporocyst of Diplostomum pseudospathaceum Niew., 1984 (Digenea).* „Acta Parasitol.”, **44(4)**: 281-84

Tintinnina i ich loriki – Anna Wasik

Jedną z najciekawszych, a nadal mało poznanych grup pierwotniaków są orzęski z podrzędu Tintinnina. Są to planktonowe organizmy kosmopolityczne, a więc występujące we wszystkich rodzajach wód (słone, słodkie, płynące, stojące) i we wszystkich strefach klimatycznych.

Cechą charakterystyczną tintinnidów jest to, iż ich protoplast otacza organiczna osłonka zwana loriką. Jej skamieliny pozwoliły stwierdzić, że grupa ta występowała na Ziemi już około 450 mln. lat temu.

W Instytucie Nenckiego przez wiele lat prowadzone były badania tintinnidów, zapoczątkowane dzięki współpracy z Stanisławem Rakusą-Suszczewskim¹. Grupa badawcza z Zakładu Biologii Komórki, Pracowni Fizjologii Ruchów Komórkowych kierowanej przez prof. L. Kuźnickiego, uczestniczyła w ekspedycji badawczej (1988-1989) w rejon Południowych Szetlandów (m.in. Wyspa Króla Jerzego, gdzie od 26 lutego 1977 roku znajduje się Polska Stacja Antarktyczna im. Arctowskiego) i Południowych Orkadów. Materiały przywiezione z wyprawy oraz przekazywane do badań przez polarników ze stacji Arctowskiego umożliwiły prowadzenie badań morfologicznych, ultrastrukturalnych oraz ekologicznych, badanie rocznej zmienności i liczebności gatunkowej

Jednym z problemów, z którymi stykają się badacze tintinnidów jest ich systematyka. Przez wiele lat tworzona była ona wyłącznie na podstawie kształtu i wielkości lorik, co doprowadziło do sztucznego rozbudowania systematyki. Rozwój mikroskopii elektronowej transmisyjnej i skaningowej, rozmaitych metod barwień, a także metod biologii molekularnej pozwolił na przedstawienie dowodów, iż tintinnidy charakteryzuje ogromny polimorfizm, a więc wiele gatunków opisanych dotychczas jako odrębne, jest jedynie formami polimorficznymi jednego gatunku.

Dzięki badaniom prowadzonym w Instytucie Nenckiego udało się wyjaśnić nie tylko jedną z takich systematycznych zagadek, ale także ustalić dominanta wód Zatoki Admiralicji oraz określić jego morfologię i ultrastrukturę. Gatunkiem tym okazał się *Cymatocylys affinis/convallaria* (**Fig. 1 a-c**).

Pierwotnie *C. affinis* i *C. convallaria*, różniące się stopniem wydłużenia dolnej części loriki, opisywane były jako odrębne gatunki, natomiast na podstawie szczegółowych analiz udało się przedstawić jednoznaczne dowody, iż mamy tu do czynienia jedynie z formami polimorficznymi. Ich zmienność jest ściśle związana z porą roku. *C. affinis* dominuje w czasie antarktycznej zimy, a *C. convallaria* – latem. Jesienią i wiosną pojawiają się formy przejściowe.

¹ Badania biologiczne w Antarktyce prowadzone przez Polaków zapoczątkowali Stanisław Rakusa-Suszczewski i Krzysztof Opaliński. Jesienią 1968 zostali oni przyjęci do Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego i tegoż roku włączeni do 14 SAE (Radzieckiej Ekspedycji Antarktycznej 1968/1969). W latach późniejszych badania polarne uległy rozszerzeniu, obejmując również pierwotniaki.

Badanie składu gatunkowego wykazały, iż gatunkami istotnie liczebnymi w tym rejonie są *Cymatocylis drągalski* (**Fig. 2**) i *Codonellopsis balechi* (**Fig. 3**).

W Instytucie prowadzone były także badania porównawcze lorik tintinnidów pochodzących z rozmaitych rejonów geograficznych (Bałtyk, Morze Białe, Zatoka Admiralicji). Loriki dzielą się na dwie grupy: hialinowe, nieposiadające na swej powierzchni cząstek oraz agglutynowane, czyli oblepione cząstkami mineralnymi i/lub organicznymi. Wykazano, iż dominantami Morza Bałtyckiego są *Helicostomella subulata* (lorika hialinowa) oraz *Tintinnopsis lobiancoi* (lorika agglutynowana) (**Fig. 4 a, b**).

Interesującym zagadnieniem było także badanie ultrastruktury lorik, których budowa związana jest ściśle z podziałem komórki. Po zakończeniu podziału dolna komórka popodziałowa (opist) pozostaje w starej, podczas gdy górna komórka popodziałowa (proter) tworzy nową lorikę, wykorzystując w tym celu zgromadzony w specjalnych granulach sekrecyjnych materiał. Do dziś jednak proces tworzenia się nowej loriki nie został zarejestrowany i szczegółowo prześledzony. W Instytucie podjęto próbę opisanie morfologii powierzchni lorik zarówno hialinowych, jak i agglutynowanych, a także przedstawienia wewnętrznej budowy ich ścian. Okazało się, iż tak morfologicznie odmienne, mają podobną mikroarchitekturę. Generalnie ściany lorik wszystkich badanych gatunków tintinnidów są trójwarstwowe, w budowie swej przypominające plaster miodu, co udowodniły badania przeprowadzone przy zastosowaniu mikroskopii transmisyjnej (**Fig. 4. c**) i skaningowej (**Fig. 5**). Ewentualne różnice dotyczą jedynie wielkości lub zwielokrotnienia poszczególnych elementów.

Uzyskanie prezentowanych wyników było możliwe dzięki wykorzystaniu mikroskopów: transmisyjnego i skaningowego, dostępnych w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Nenckiego.

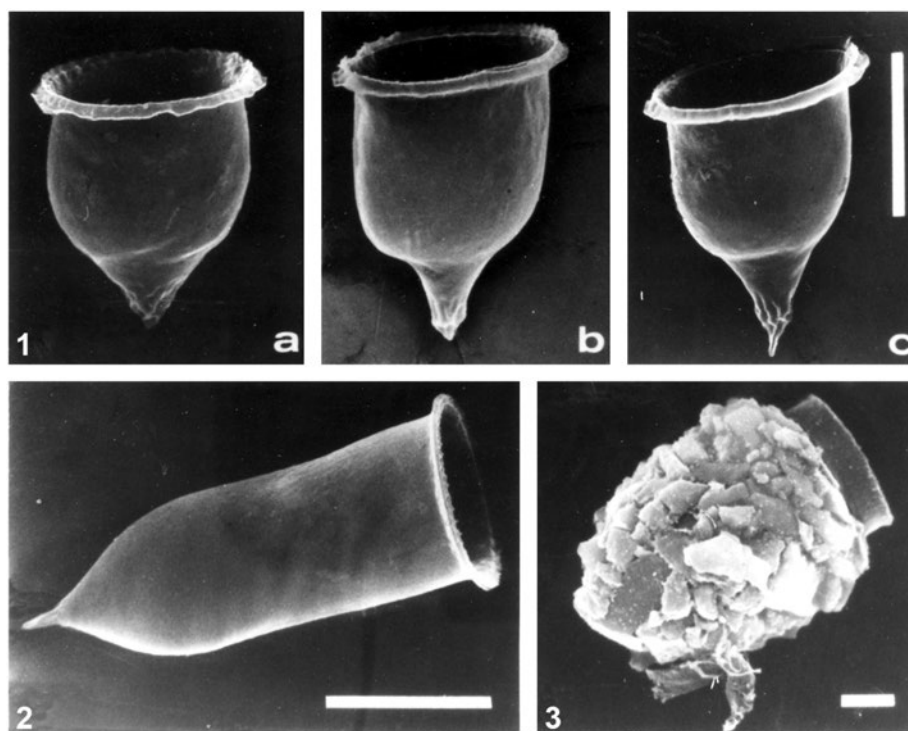


Fig. 1 Trzy formy *Cymatocylis affinis/convallaria*: **a.** *convallaria*, **b.** przejściowa, **c.** *affinis*. Skala – 10 μm .

Fig. 2 *Cymatocylis dragalski*. Skala – 100 μm .

Fig. 3 *Codonellopsis balechi*. Skala – 10 μm .

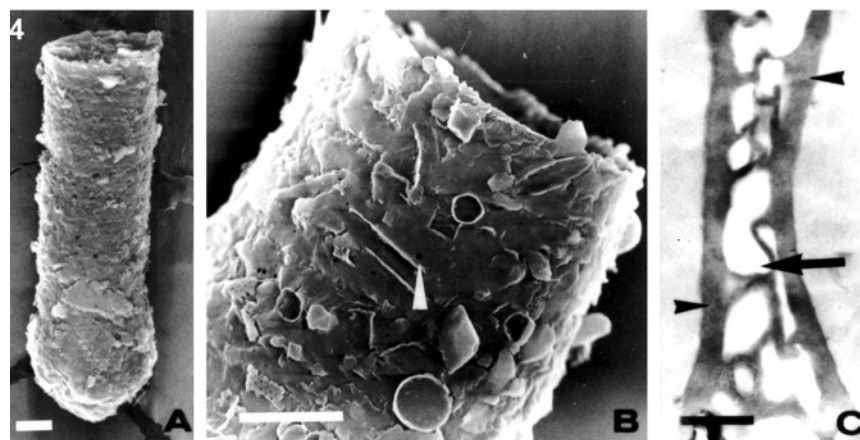


Fig. 4 **A.** *Tintinnopsis lobiancoi*, **B.** szyjka loriki, Skala, 10 μm . **C.** przekrój poprzeczny przez ścianę loriki, elektronowy mikroskop transmisyjny. Skala, 1 μm .

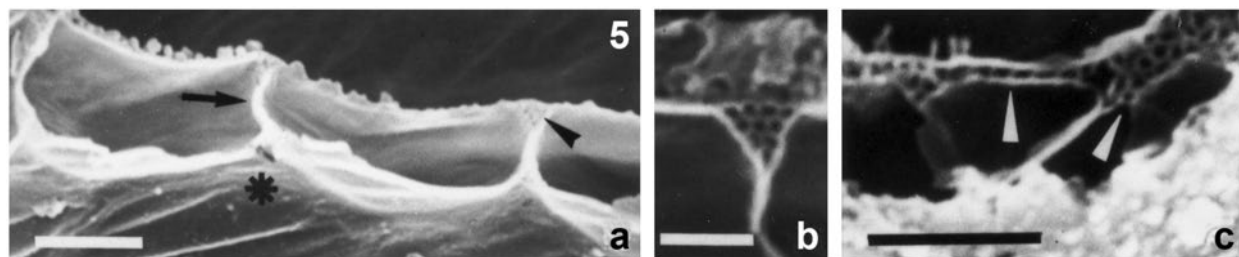


Fig. 5 *Parafavella denticulata*, mikroarchitektura ściany loriki. Skala, 1 μm . Fot. 1-5 Anna Wasik.

Orzęski jako przedmiot badań morfogenetycznych – Maria Jerka-Dziadosz

Badania nad procesami morfogenetycznymi zachodzącymi podczas regeneracji orzęsków po uszkodzeniu ciała rozpoczęła Stanisława Dembowska na początku działalności Instytutu Nenckiego w latach 20-tych ubiegłego stulecia. Jej wyniki opierały się na obserwacjach przyżyciowych prowadzonych z zastosowaniem klasycznego mikroskopu. Tradycja tych badań została podjęta w latach 50-tych i badania te rozwijały się z dużymi sukcesami aż do chwili rozwiązania Pracowni Regeneracji i Morfogenezы Pierwotniaków w roku 2009.

Do sukcesu tych badań w znacznym stopniu przyczynił się rozwój technik cytochemicznych pozwalających na uwidocznianie struktur rzęskowych oraz nowości techniczne takie jak mikroskopia transmisyjna i skanningowa, które badacze zaczęli stosować w latach 60-tych w Zakładzie Biologii Komórki, a rozwinęły się w latach 70-tych i są stosowane w Instytucie do chwili obecnej.

Wprowadzony przez Marię Jerka-Dziadosz do badań orzęsek *Paraurostyla weissei* posiada złożony układ rzęskowy (**Fig. 1**) na stronie brzusznej zbudowany z cirri – tzn. szczeci w których skład wchodzi od 16 do ponad 80 rzęsek zakotwiczonych w cytoplazmie przez ciała podstawowe – homologiczne do centrioli, powszechnie obecnej w świecie żywym. Ciała podstawowe są otoczone i współdziałają z wieloma rodzajami struktur cytoszkieletowych, które uczestniczą w procesie przekształcania matczynej struktury w struktury komórek potomnych bądź odtwarzanych w czasie regeneracji po fragmentacji komórek (Jerka-Dziadosz i Golińska 1977).

Wprowadzenie technik immuno-cytochemicznych do badań protozoologicznych opartych na wiązaniu specyficznych przeciwciał do antygenów zawartych w strukturach orzęsienia (rzęskach, ciałkach podstawowych oraz we włókienkach towarzyszących) umożliwiło szczegółowy opis dynamiki lokalizacji określonych białek w czasie cyklu komórkowego, oraz ich modyfikacji powodowanych przez mutacje (Strzyżewska-Jówko i wsp. 2003) w genach kodujących białka cytoszkieletalne i ich regulatory (**Fig. 2**).

Rozwój biologii molekularnej, zsekwencjonowanie genomów *Paramecium* i *Tetrahymena* (dwóch klasycznych obiektów badań w ciliatologii i biologii komórkowej), wprowadzenie znakowania sekwencji kodujących przez metki fluorescencyjne (GFP) pozwala obecnie na badanie lokalizacji komórkowej i dynamiki białek budujących ciała bazalne (Bld10, Cen2, Cen3, For20 oraz Sas6), oraz następstwa inaktywacji lub nadekspresji odpowiednich genów (**Fig. 3**). Wyniki tych badań (Jerka-Dziadosz et al 2010) przybliżają nas do poznania mechanizmów molekularnych regulujących powstawanie i przekazywanie organelli komórkowych do komórek potomnych, w szczególności ciałek podstawowych rzęsek, w których defekty u ludzi są przyczyną wielu chorób wrodzonych związanych z upośledzeniami rzęsek (*ciliopatie*).

Stałe unowocześnianie problematyki badawczej przez pracowników Pracowni Regeneracji i Morfogenezy Pierwotniaków oraz pozyskiwanie najnowocześniejszych metod wizualizacyjnych było możliwe dzięki intensywnej współpracy z wiodącymi ośrodkami naukowymi w U.S.A, Francji i Niemczech.

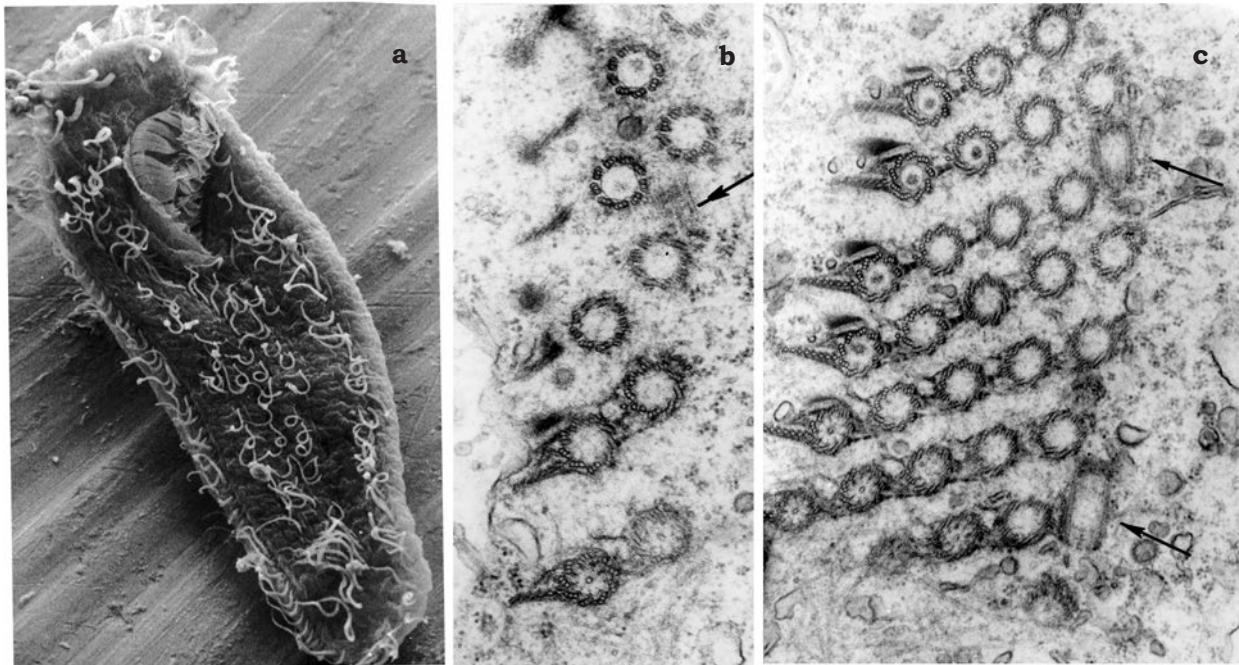


Fig. 1 Orzęsienie brzuszne zbudowane ze złożonych struktur rzęskowych (tzw. szczeci) *Paraostyla weissei* w mikroskopie skaningowym. W czasie morfogenezy struktury rzęskowe powstają z zawiązków zbudowanych z par ciałek bazalnych (**b** i **c** – elektronowa mikroskopia transmisyjna) do których dodawane są sukcesywnie nowe ciała bazalne (strzałki na **b** i **c**) i pomiędzy nimi budowane są połączenia fibrillarne. Fot. Maria Jerka-Dziadosz.

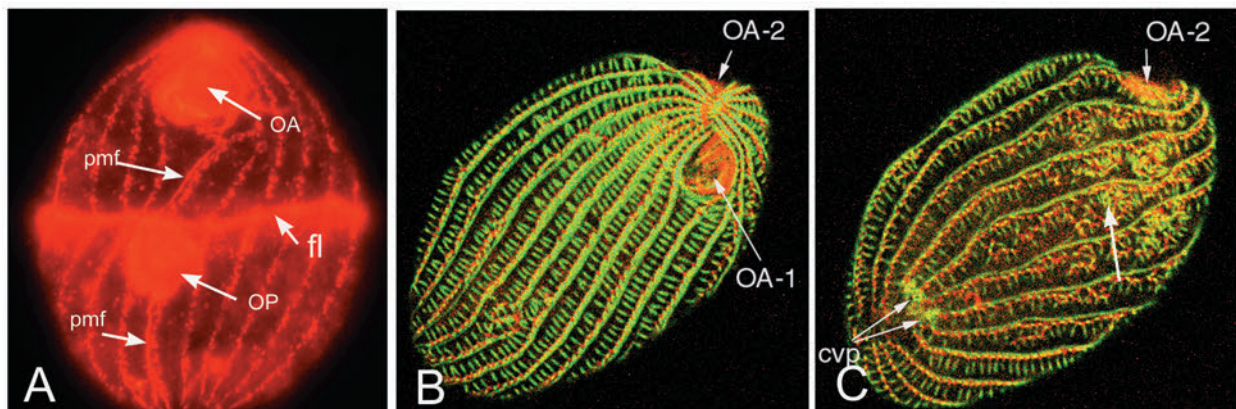


Fig. 2 *Tetrahymena thermophila*. Badania immunofluorescencyjne z zastosowaniem specyficznych przeciwciał wiążących się do powierzchniowych struktur cytoszkieletalnych (**A**) pozwoliło na opisanie nowych struktur definiujących polaryzację komórki (Strzyżewska i wsp. 2003) takich jak południkowy filament post-oralny (pmf) oraz linię podziałową (fl) rozdzielającą komórki potomne. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej umożliwiło doprecyzowanie cech fenotypowych mutantów morfogenetycznych w tym mutantu janus (**B**, **C**) u którego występuje zastąpienie strony grzbietowej drugą stroną brzuszną o lustrzanej symetrii. Fot. Izabela Strzyżewska-Jówko.

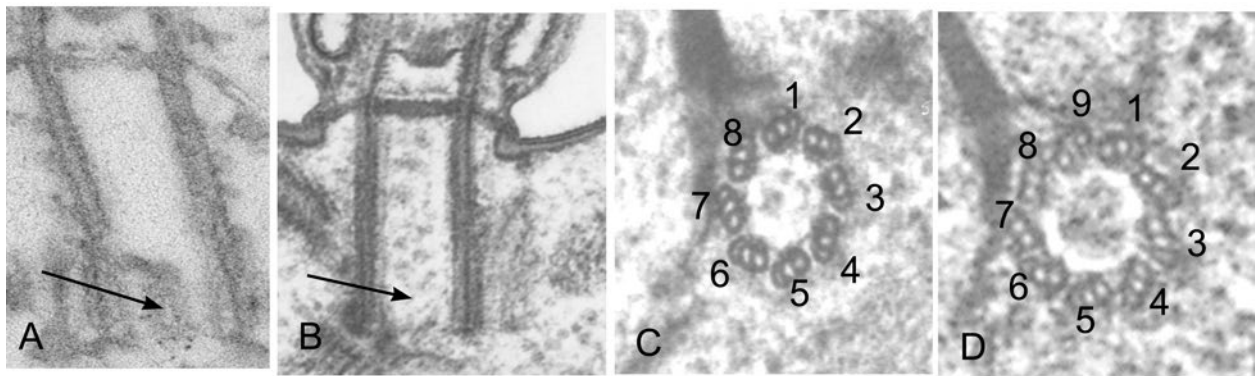


Fig. 3 *Paramecium tatraurelia*. Zsekwencjonowanie genomu pozwoliło na zbadanie roli korowych białek budujących ciało podstawowe takich jak np. Sas 6 (Jerka-Dziadosz i wsp. 2010). Inaktywacja genu, którego produkt znajduje się w proksymalnej części ciała podstawowego (**A** – znakowanie metki GFP przez drugorzędowe przeciwciało ze 5nm koloidalnym złotem), powoduje brak tej struktury (**B**) oraz nienormalne budowanie ciałek podstawowych z ograniczoną liczbą tripletów mikrotubularnych (**C**) w porównaniu do struktury zbudowanej z 9-ciu tripletów (**D**) co w powoduje śmierć komórki.

Fot. Maria Jerka-Dziadosz.

Piśmiennictwo

Jerka-Dziadosz M. i Golińska K. (1977) *Regulation of ciliary pattern in ciliates*. „J. Eukar. Microbiol.”, **24**: 19–26

Jerka-Dziadosz M., Gogendeau D., Klotz C., Cohen J., Beisson J. i Koll F. (2010) *Basal body duplication in Paramecium: the key role of Bld10 in assembly and stability of the cartwheel*. „Cytoskeleton”, **67**: 161–171

Strzyżewska-Jówko I., Jerka-Dziadosz M. i Frankel J. (2003) *Effect of alteration in the global body plan on deployment of morphogenesis-related epitopes labeled by the monoclonal antibody 12G9 in Tetrahymena thermophila*. „Protist”, **154**: 71-90

Zastosowanie fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej – Jakub Włodarczyk

Jednym z przykładów procesów intensywnie badanych w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, przy szerokim wykorzystaniu mikroskopii świetlnej, są procesy pamięci i uczenia się. Zdolność komórek nerwowych (neuronów) do tworzenia i zrywania połączeń synaptycznych oraz do zmiany siły tychże połączeń jest uważana za podstawową cechę mózgu pozwalającą mu na przechowywanie nowych informacji. Reorganizacja aktywności neuronalnej często związana jest z lokalnymi zmianami kształtu kolców dendrytycznych. Kolce dendrytyczne są to niewielkie wypustki błonowe, o rozmiarze rzędu mikrometrów, z komórek nerwowych (neuronów). Kolce dendrytyczne tworząc postsynaptyczną część synapsy, odbierają impulsy nerwowe z części presynaptycznej i transpor-

tuja je do ciała komórki nerwowej. Zmiany kształtu kolców dendrytycznych powiązane są ze zmianą zawartości receptorów postsynaptycznych (właściwych dla przekazywania impulsu nerwowego) wewnątrz synapsy. Część synaps na neuronach zanika w sposób dynamiczny, natomiast część ulega tworzeniu *de novo* i stabilizacji. Zmiany strukturalne kolców dendrytycznych, a w szczególności wzrost liczby synaps, formowanie nowych i zanikanie starych połączeń leży u podstaw procesów pamięci i uczenia. Mikroskopia fluorescencyjna (mikroskopia świetlna wykorzystująca zjawisko fluorescencji) stanowi doskonale narzędzie pozwalające badać funkcję i strukturę synaps, ich formowanie i stabilizację. Zmiany zachodzące w komórkach nerwowych, w których jej elementy (organelle lub białka) wyznakowane są fluoroforami bądź białkami fluorescencyjnymi zdolnymi do emisji fluorescencji o zadanej barwie w wyniku wzbudzenia światłem, mogą być z powodzeniem monitorowane przy użyciu fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej. Technika ta dzięki zastosowaniu niewielkiego otworu umieszczonego przed detektorem fluorescencji a służącego do eliminacji emisji fluorescencji spoza płaszczyzny ogniskowej preparatu, pozwala przewyciężyć ograniczenia klasycznej mikroskopii świetlnej szerokiego pola zwiększając kontrast i rozdzielczość uzyskanych obrazów, która w tym wypadku wynosi setki nanometrów. Dalszy rozwój technik mikroskopowych w szczególności szeroko pojęta mikroskopia superrozdzielcza pozwala na obrazowanie subkomórkowej struktury neuronu. Zastosowanie technik superrozdzielczych takich jak mikroskopii STED (bazującej na zjawisku emisji wymuszonej) pozwala przewyciężyć ograniczenie dyfrakcyjne mikroskopii konfokalnej i wgląd w strukturę synapsy z rozdzielczością sięgającą rzędu kilkudziesięciu nanometrów.

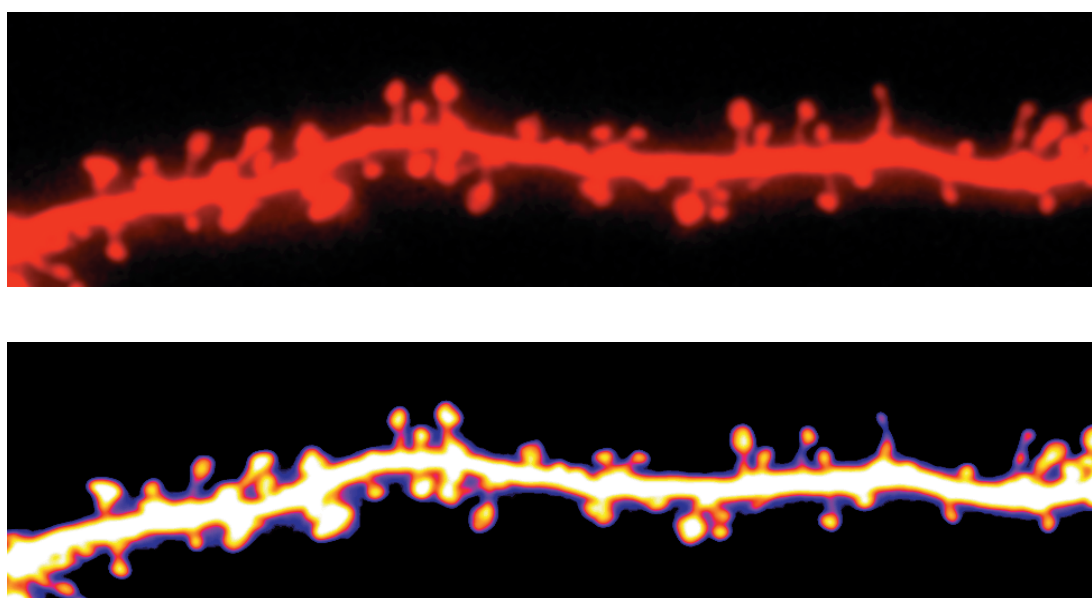


Fig. 1 Komórka nerwowa. Obraz z fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. Fot. Jakub Włodarczyk.

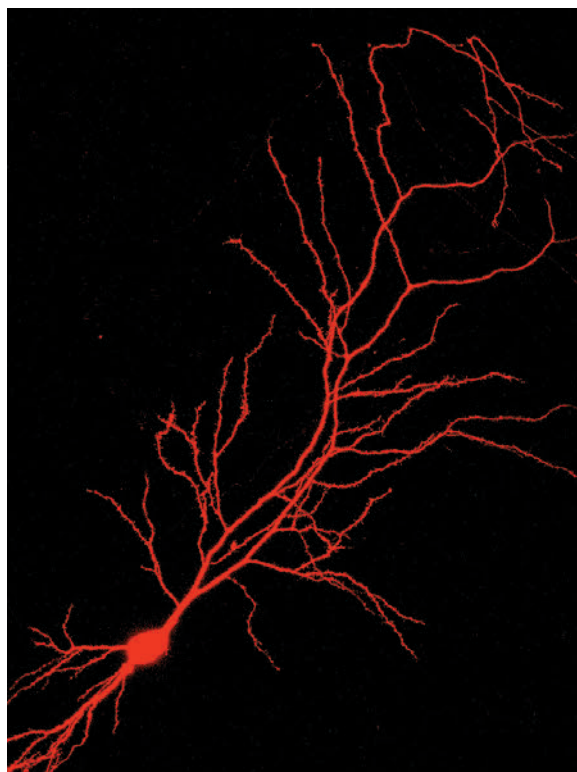


Fig. 2 Dendryt z kolcami dendrytycznymi. Obraz z fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. Fot. Jakub Włodarczyk.

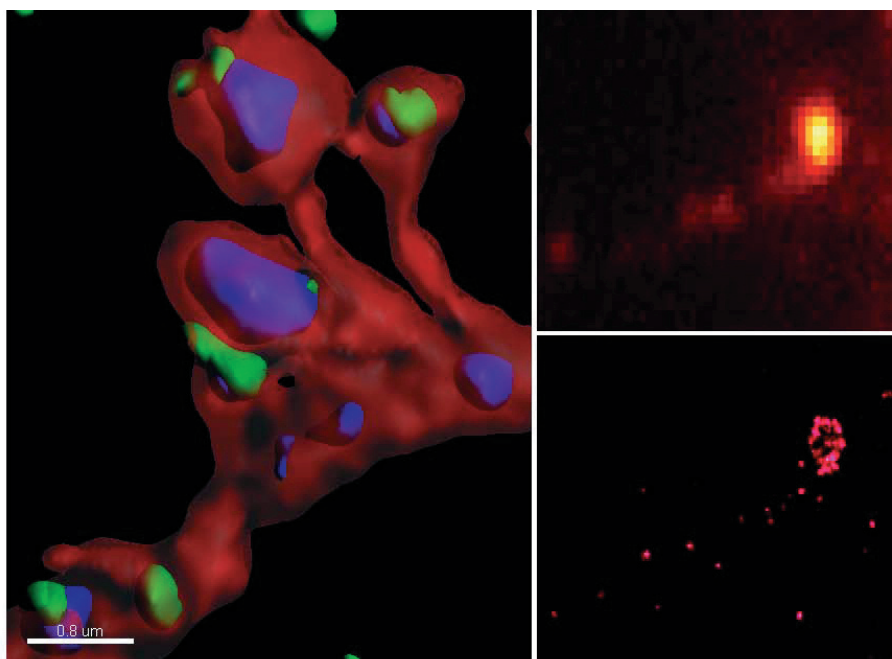


Fig. 3 Kolec dendrytowy. **Lewy panel;** Trójwymiarowa rekonstrukcja kolca dendrytycznego uzyskana w wyniku złożenia obrazu wielu przekrojów optycznych preparatu. Kolor zielony reprezentuje część presynaptyczną synapsy, kolor niebieski reprezentuje część postsynaptyczną. **Prawy panel;** Rozkład receptorów postsynaptycznych w błonie kolca dendrytycznego. Obraz uzyskany za pomocą klasycznego mikroskopu szerokiego pola (**prawy górny panel**) oraz z mikroskopu superrozdzielczego (**prawy dolny panel**). Fot. Zsuzsanna Szepesi (Pracownia Neurobiologii).

Zastosowanie zaawansowanego laserowego mikroskopu konfokalnego – Grzegorz Wilczyński

Mikroskopia świetlna jest podstawową metodą badawczą stosowaną w naukach biomedycznych. Przełomem technologicznym, który dokonał się pod koniec ubiegłego wieku, było wprowadzenie do „powszechnego” użytku laserowego mikroskopu konfokalnego (ang. laser scanning confocal microscope). Jest to mikroskop fluorescencyjny, w którym źródłem światła jest wiązka lasera przemiatająca (skanująca) preparat punkt po punkcie; wzbudzona fluorescencja jest rejestrowana przez czuły detektor; co szczególnie istotne, na drodze wzbudzonego światła, przed detektorem znajduje się specjalna przesłona konfokalna, która przepuszcza tylko fotony pochodzące z płaszczyzny ogniskowej obiektywu. Dzięki tej przesłonie obraz odbierany w detektorze ma zwiększoną ostrość, kontrast i rozdzielczość. Dodatkowe zalety tego urządzenia to a) użycie spójnego światła laserowego, co pozwala na wybiórcze wzbudzanie fluorescencji określonych substancji, oraz b) możliwość rekonstrukcji ostrego obrazu z całej objętości preparatu, na poziomie komórkowym (**Fig. 1, 2**) i subkomórkowym (**Fig. 3**). Użycie mikroskopów konfokalnych wprowadziło zupełnie nową jakość w badania biologicznych i pozwoliło na dokonanie szeregu nowych odkryć. Instytut Nenckiego jest wyposażony w dwa nowoczesne mikroskopy konfokalne.

Mimo ogromnej przewagi nad zwykłym mikroskopem, dotychczas produkowane mikroskopy konfokalne podlegają, podobnie jak zwykły mikroskop, ograniczeniu rozdzielczości przestrzennej, wynikającemu z praw fizyki falowej, co nie pozwala na obrazowanie struktur mniejszych niż ok. 250 nm (tzw. limit Abbe). Jest to duży mankament utrudniający lub uniemożliwiający prowadzenie szeregu badań w wielu dziedzinach nauk biomedycznych w tym w neurobiologii. Rozmiary szeregu istotnych struktur wewnątrzkomórkowych zawierają się w granicach od 10 do 200 nm, co sprawia że w mikroskopie świetlnym, w najlepszym przypadku, mają postać rozmytych plam, najczęściej są jednak zupełnie niedostrzegalne. Ostatnio, do Instytutu Nenckiego został zakupiony zaawansowany system do mikroskopii konfokalnej (Leica TCS SP5) wyposażony w moduł STED (ang. **S**timulated **E**mission **D**epletion). Umożliwia on obrazowanie z rozdzielczością poniżej limitu dyfrakcji. STED został wynaleziony przez niemieckiego fizyka Stefana Hella (<http://www.mpibpc.mpg.de/groups/hell/>).

W odróżnieniu od tradycyjnej mikroskopii konfokalnej oprócz wiązki wzbudzającej pochodzącej ze zwykłego lasera, STED wykorzystuje dodatkową, pierścieniową wiązkę, która ma za zadanie wygaszenie fluorescencji na brzegu wzbudzonego punktu (**Fig. 4**). Przyczynia się to do zdecydowanej poprawy rozdzielczości. System STED, znajdujący się w naszym instytucie umożliwia obrazowanie z rozdzielczością 70 nm, co zostało sprawdzone i potwierdzone przy pomocy kulek fluorescencyjnych (**Fig. 4**). Pomimo tego, że obecnie dostępne systemy STED umożliwiają zbieranie obrazów tylko z jednego kanału, to obrazy

z pozostałych kanałów mogą być zbierane sekwencyjnie ze zwykłą rozdzielczością. Taka technika obrazowania umożliwia porównanie struktur zobrazowanych przy pomocy STED'a z pozostałymi elementami komórek (**Fig. 5**). Innym rodzajem mikroskopu superrozdzielczego jest PALM/STORM, o rozdzielczości rzędu 20 nm, do którego dostęp mamy dzięki współpracy z Centrum Obrazowania w Bordeaux (**Figura 3**).

Pomimo ogromnego postępu mikroskopii świetlnej, nadal największy poziom rozdzielczości w obrazowaniu biologicznym daje transmisyjna mikroskopia elektronowa (**Fig. 6**).

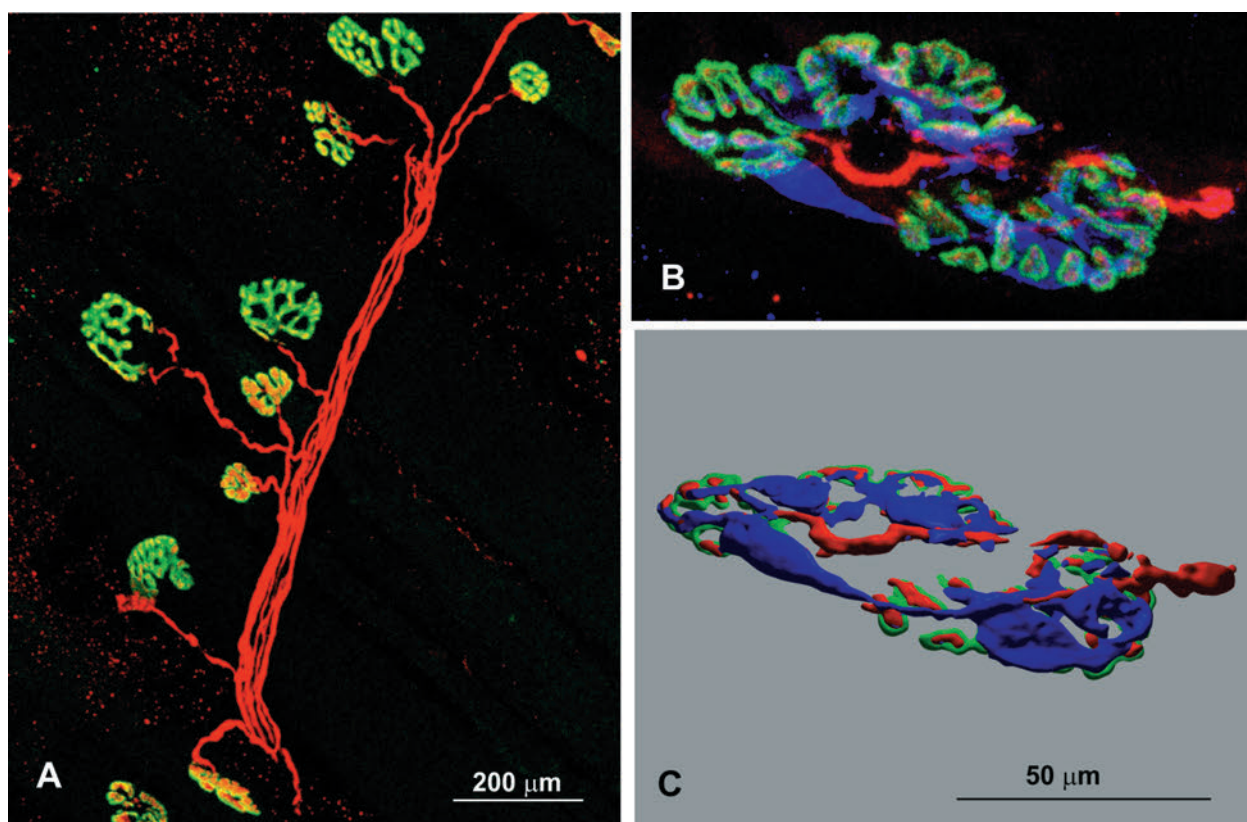


Fig. 1 A-C Obraz synaps nerwowo-mięśniowych szczura w mikroskopie konfokalnym, w małym (**a**) i dużym powiększeniu (**B, C**). Kolor czerwony – znacznik włókien nerwowych, kolor zielony – znacznik receptorów acetylocholinowych, kolor niebieski – znacznik komórek glejowych. (**C**) stanowi trójwymiarową rekonstrukcję synapsy przedstawionej w (**B**).
Fot. Grzegorz Wilczyński.

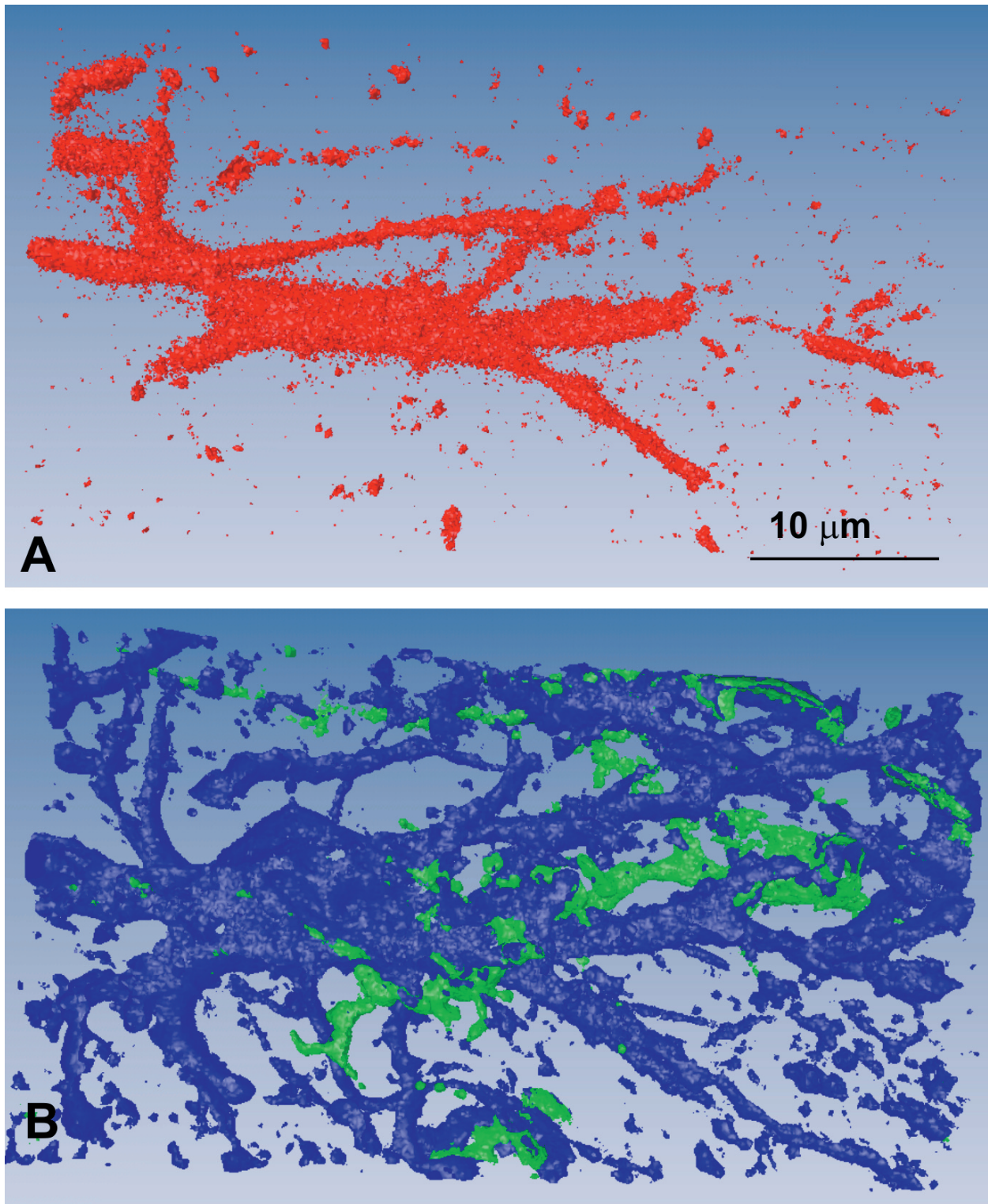


Fig. 2 A-B Rekonstrukcja komórek glejowych: astrocyt – niebieski, fragmenty mikrogleju – zielone, z mózgu szczura, ukazująca trójwymiarowe rozmieszczenie enzymu MMP-9 – czerwone. Fot. Grzegorz Wilczyński.

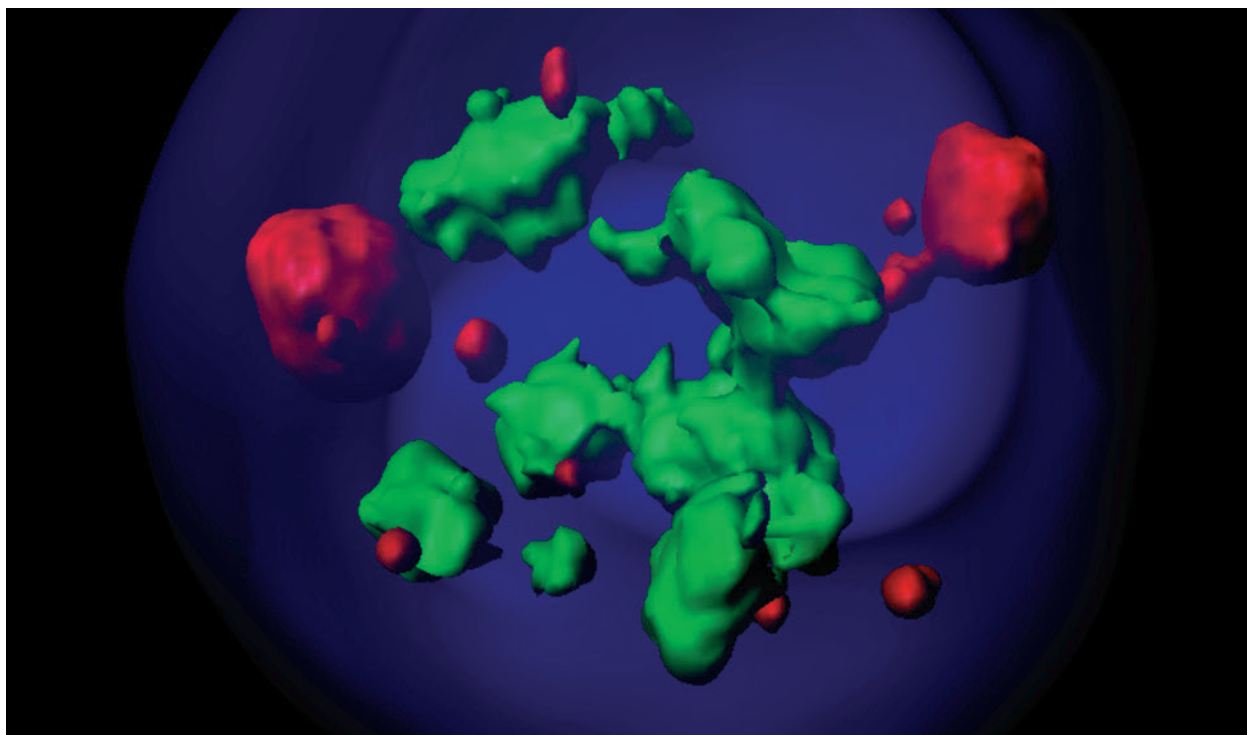


Fig. 3 Rekonstrukcja trójwymiarowa jądra komórkowego neuronu : niebieskie – chromatyne, zielone – spliceosomy, czerwone – jąderka. Fot. Grzegorz Wilczyński.

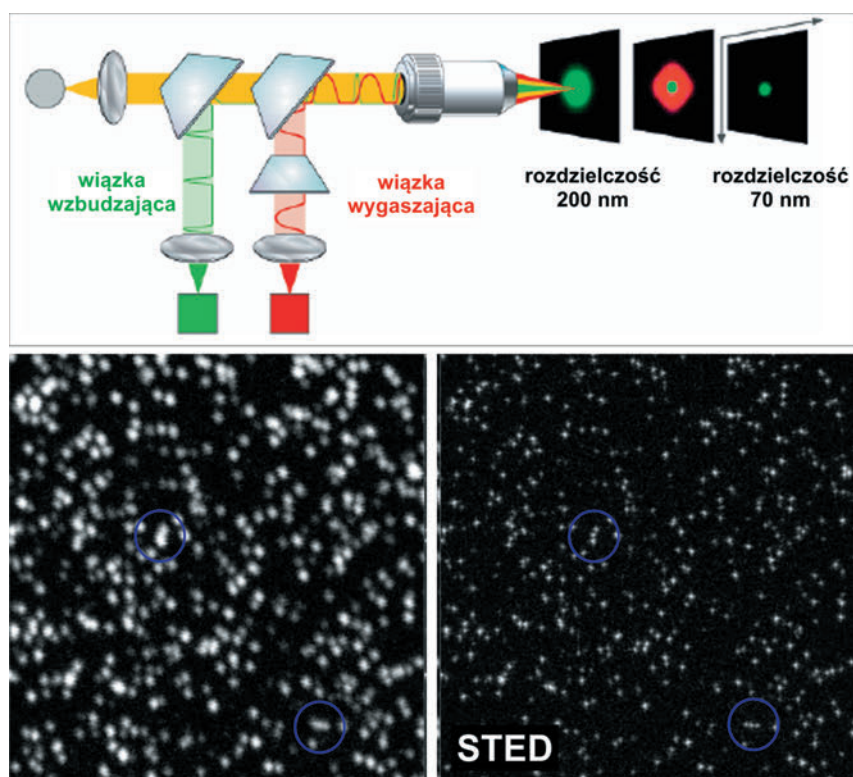


Fig. 4 Zasada działania mikroskopu STED (wg materiałów firmy Leica, zmodyfikowane); poniżej przedstawiono przykładowe obrazy kulek fluorescencyjnych o średnicy 40 nm w konwencjonalnym obrazowaniu konfokalnym (**po lewej**) oraz przy włączonej przystawce STED (**po prawej**). Fot. Grzegorz Wilczyński.

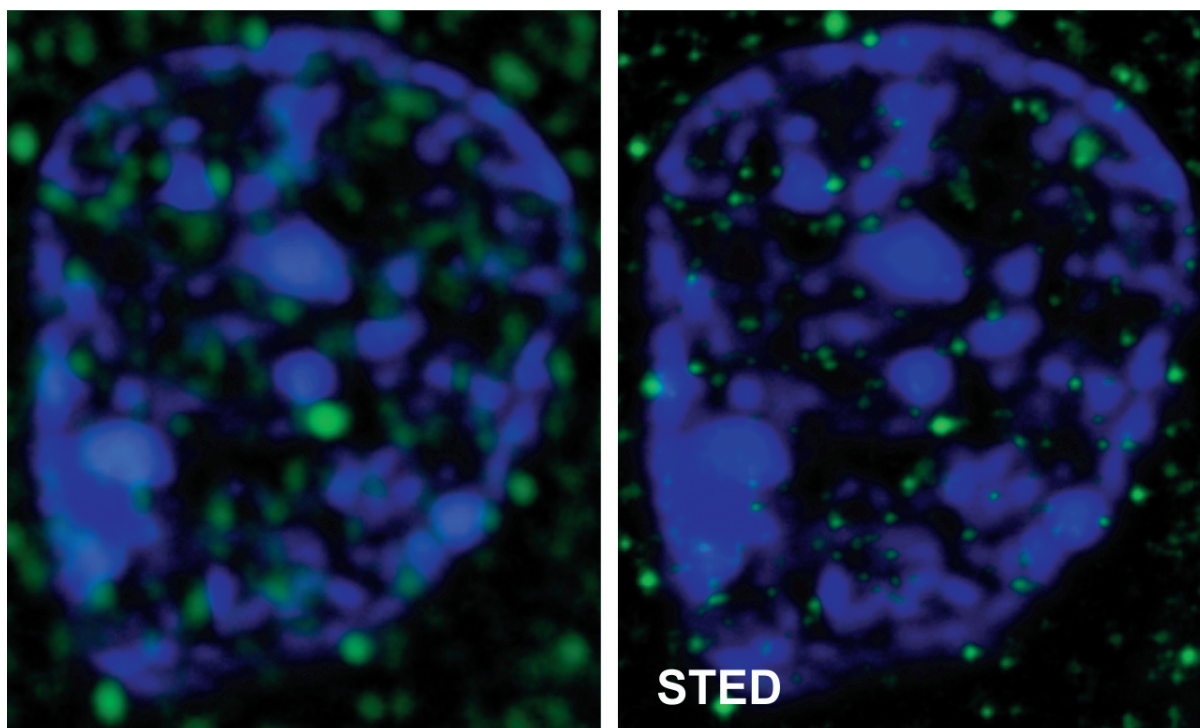


Fig. 5 Zastosowanie mikroskopu STED do badania jądra komórkowego. **Po lewej stronie** konwencjonalny obraz konfokalny reakcji immunofluorescencyjnej na metylowany histon H3 (zielone) w jądrze neuronu. **Po prawej** obraz w którym do obrazowania histonu użyto przystawki STED. Na niebiesko pokazano fluorescencję barwnika specyficznego dla DNA (obraz konwencjonalny w obu przypadkach). Fot. Grzegorz Wilczyński.

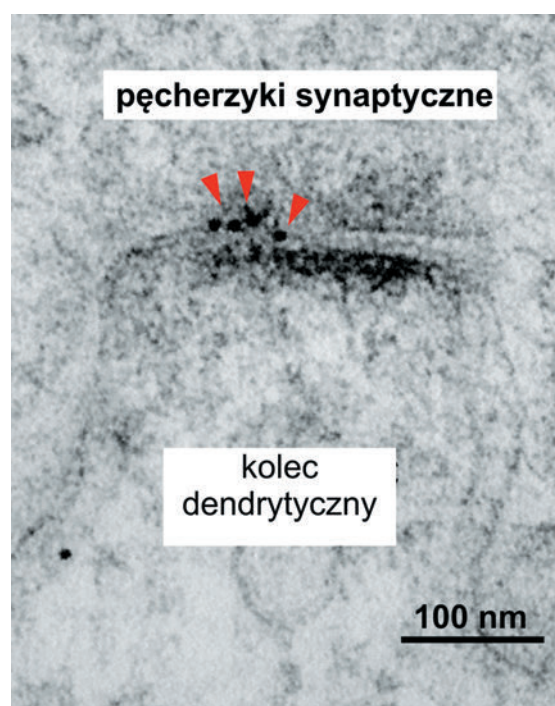


Fig. 6 Obraz synapsy w mikroskopie elektronowym, reakcja immunocytochemiczna; obecność enzymu MMP-9 w szczelinie synaptycznej wskazują przeciwciała sprzężone z ziarnami złota koloidalnego zaznaczone czerwonymi strzałkami. Fot. Grzegorz Wilczyński.

Mikroskopia całkowitego wewnętrznego odbicia – Andrzej Kasprzak

W naukach biologicznych jest często korzystne badanie zachowania pojedynczych makrocząsteczek zamiast uzyskiwania informacji o średnich wartościach w ich populacji. Współczesna biofizyka rozwinęła narzędzia o wystarczającej czułości, aby wykrywać fotony emitowane przez pojedynczy fluorofor w środowisku wodnym. Jednakże fluorescencja tła roztworu otaczającego ten fluorofor jest o rząd wielkości wyższa niż ta mierzona. W rezultacie emisja pojedynczego fluoroforu nie jest obserwowalna przy użyciu zwykłego mikroskopu fluorescencyjnego. W celu przezwycięzenia tej przeszkody wynaleziono i w ciągu ostatnich 15 lat rozwinięto, nową technikę mikroskopową – mikroskopię fluorescencyjną całkowitego wewnętrznego odbicia (mikroskopię TIRF), w której znakowana fluorescencyjnie próbka jest oświetlana na granicy faz szkło-woda. W oświetleniu TIRF światło przechodzi z ośrodka o wyższym współczynniku załamania światła (szkło) do ośrodka o niższym współczynniku (woda). Jeśli wiązka światła pada pod kątem mniejszym od krytycznego, ulega załamaniu, jeśli większym – prawie całe światło jest odbite na granicy faz do pierwszego ośrodka (szkła). Jednakże w tym drugim przypadku zjawisku temu towarzyszy utworzenie tzw. strefy zanikania, tj. cienkiej eksponencjalnie zanikającej warstwy o grubości ok. 100 nm w drugim ośrodku, która jest oświetlana. Jeśli w tej warstwie umieścimy obiekty fluoryzujące ich obraz będzie pozbawiony tła. Oprócz tego, wyświecanie fluoroforów (*photobleaching*) będzie niezwykle małe, jak również nie będą zachodzić reakcje fotochemiczne, często spotykane przy oświetlaniu silną wiązką lasera. W większości przypadków można obserwować pojedyncze cząsteczki znakowane fluorescencyjnie.

W Pracowni Białek Motorycznych mikroskopia TIRF jest używana do badań Ncd, kinezy z grupy 14. Motor ten bierze udział w organizowaniu mikrotubul w strukturach, takich jak wrzeciono mitotyczne. Ponieważ Ncd jest motorem, który generuje ruch w kierunku minus na mikrotubuli natomiast pełni swoją funkcję w pobliżu końców plus mikrotubul, sugerowano, że kinezyzna ta jest transportowana przez białko EB1. Operacje tej wieloskładnikowej maszyny molekularnej można śledzić przy pomocy mikroskopii TIRF. (**Fig. 1 i 2**).

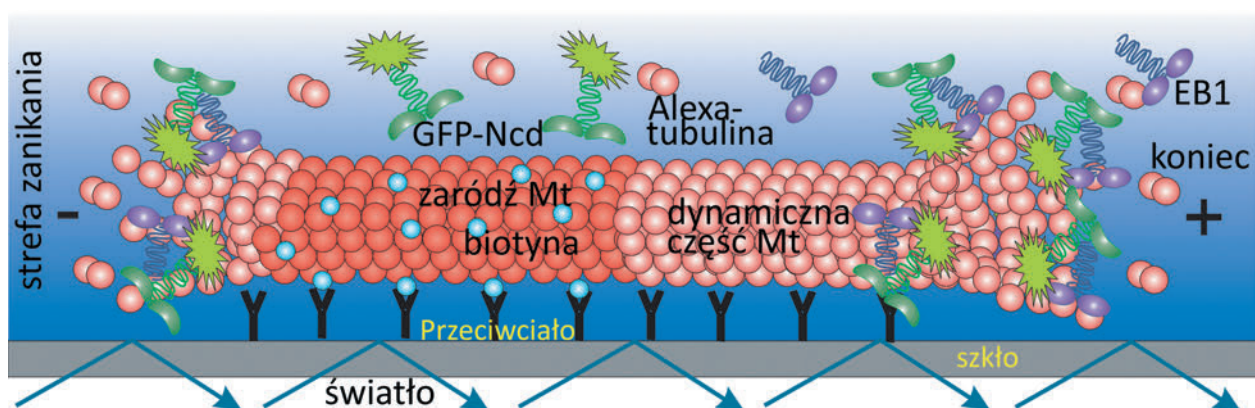


Fig. 1 Biotynylowana zaródź mikrotubuli jest przyłączona do szkła za pomocą przeciwciał. Wzrost mikrotubul rozpoczyna się w momencie dodania GTP i tubuliny znakowanej Alexa-647. Następnie dodane zostają GFP-Ncd i EB1 i obserwowany jest jednoczesny wzrost mikrotubuli i ruch GFP-Ncd na koniec plus, używając dwukanałowej rejestracji obrazu z oświetleniem TIRF (TIRF3 –Axio Observer Z.1, Zeiss). Autorami ryciny są: S. Bajer i A. A. Kasprzak.

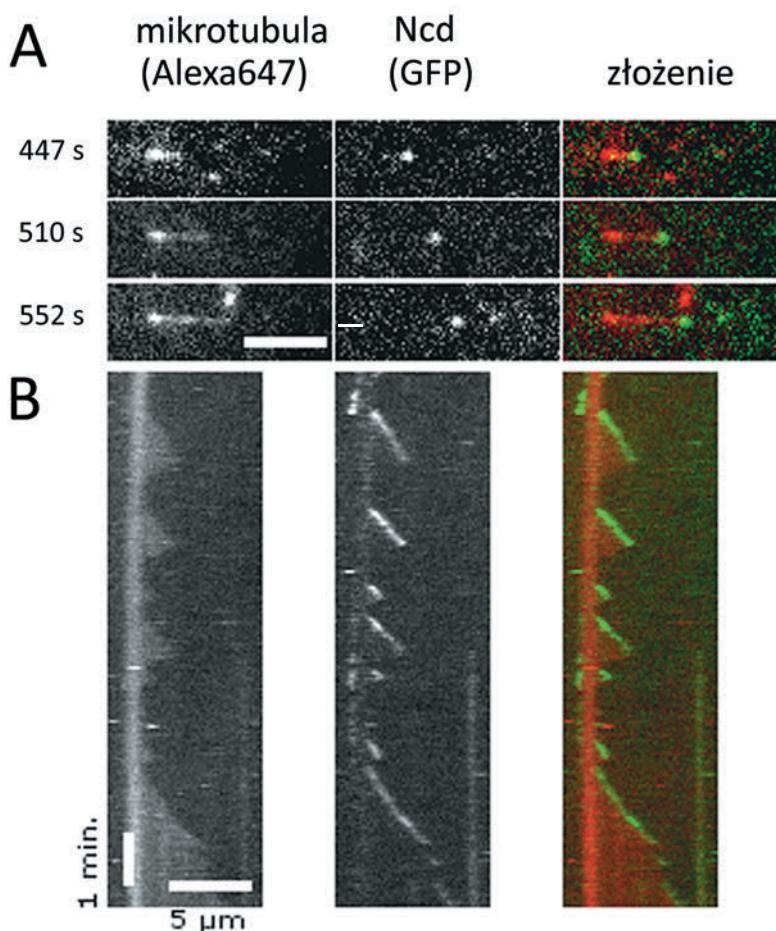


Fig. 2 Panel A. N-końcowa domena kinezy-14 Ncd połączona z GFP (40 nM) „surfuje” (porusza się) na końcu dynamicznej mikrotubuli znakowanej Alexa-647 i obserwowana w mikroskopie TIRF. Śledzenie końców plus mikrotubul przez Ncd zachodzi wyłącznie w obecności białka EB1 (400 nM). **Panel B.** Kimografy pokazujące długość mikrotubul i lokalizację N-końcowej domeny Ncd w pobliżu końców plus mikrotubul. Autorami ryciny są: S. Bajer i A. A. Kasprzak.

Obrazowanie mikrogleju w procesach patologicznych w ośrodkowym

układzie nerwowym – Bożena Kamińska, Małgorzata Zawadzka, Kinga Szydłowska, Aleksandra Ellert-Miklaszewska, Konrad Gabrusiewicz, Małgorzata Sielska

Badania morfologii komórek mikrogleju w modelach neurodegeneracji i guzów mózgu *in vitro* i *in vivo* technikami mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej rozpoczęte zostały w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego na początku 2000 roku i są prowadzone do chwili obecnej.

Mikroglej i jego funkcje w układzie nerwowym w warunkach prawidłowych

Mikroglej stanowi około 20% całej populacji komórek glejowych. Ze względu na brak metod odróżniających różne typy komórek, bardziej właściwe byłoby określenie „makrofagi mózgowe”, gdyż populacja obejmuje komórki mikrogleju, infiltrujące makrofagi, pericyty i okołonaczyniowe makrofagi. Wyniki badań metodami cytometrii przepływowej wskazują, że mikroglej charakteryzuje się określonym profilem antygenów: CD68⁺, CD45^{low}, CD11b⁺, CD11c^{high}, MHC class II⁺, CD14, cząsteczki CR3b oraz cząsteczki galaktozy wiążące lektyny.

Komórki mikrogleju są pochodzenia mieloidalnego i jako progenitory mikrogleju pochodzące z płodowego woreczka żółtkowego zasiedlają mózg w trakcie rozwoju embrionalnego i płodowego. Druga fala progenitorów mikrogleju pochodzi z komórek monocytarnych szpiku i kolonizuje układ nerwowy we wczesnym okresie postnatalnym u gryzoni (P0–P15) lub tuż przed urodzeniem u człowieka. Infiltracja leukocytów do parenchymy mózgu jest ściśle kontrolowana przez barierę krew-mózg i choć może dochodzić do odnowienia puli mikrogleju, pericytów i makrofagów okołonaczyniowych przez infiltrujące monocyty z krwi obwodowej, wymiana zachodzi niezwykle rzadko.

W prawidłowym mózgu mikroglej występuje zarówno w istocie szarej jak i białej, przy czym w dojrzałym układzie nerwowym więcej komórek mikrogleju znajduje się w istocie szarej mózgu. Najwięcej komórek mikrogleju u myszy występuje w takich regionach jak: hipokamp, kresomózgowie, zwoje podstawy mózgu oraz istota czarna. W warunkach prawidłowych, „spoczynkowy” (ang. *resting, ramified*) mikroglej charakteryzuje się długimi i rozgałęzionymi wypustkami rozchodzącymi się we wszystkich kierunkach. Nimmerjahn i współautorzy za pomocą wizualizacji z użyciem mikroskopu 2-fotonowego pokazali, że w warunkach prawidłowych mikroglej aktywnie penetruje swoje sąsiedztwo przy użyciu licznych wypustek. Poszczególne komórki mikrogleju kontrolują własne terytorium i nie kontaktują się ze sobą za pomocą wypustek. Ze względu na stałą aktywność wypustek mikrogleju zaproponowano określanie go mianem mikrogleju nadzorującego (ang. *surveying*).

Komórki mikrogleju są komórkami immunokompetentnymi, należącymi do układu wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Są one często określane jako „czujniki stanów patologicznych w mózgu”, ponieważ ich reakcja na uszkodzenia tego organu jest wyjątkowo szybka. Taki sposób oddziaływania mikrogleju jest możliwy dzięki obecności na jego powierzchni szerokiego spektrum sensorów, począwszy od kanałów jonowych, poprzez receptory neurotransmiterów, receptory typu TLR (ang. *Toll-like receptors*), receptory dla składników układu dopełniacza (głównie CR1 i CR3), receptory dla fragmentu Fc przeciwciał, receptory typu SR (ang. *sca-venger receptors*) oraz cząsteczki głównego kompleksu zgodności tkankowej. Podstawowym zadaniem licznych receptorów obecnych na komórkach mikrogleju, określanych jako PRRs (ang. *pattern recognition receptors*) jest rozpoznawanie i usuwanie patogenów, toksycznych, nieprawidłowo sformowanych białek (włókna amyloidu, agregaty synuklein, białka prionowe) oraz komórek apoptotycznych pojawiających się w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym.

W prawidłowym układzie nerwowym mikroglej pełni funkcje ochronne i uczestniczy w utrzymaniu homeostazy tkankowej. W trakcie rozwoju myszy neurony i ich połączenia powstają w nadmiarze i ich liczba jest później precyzyjnie dostosowywana poprzez selektywną eliminację synaps i neuronów, co jest niezbędne do powstania funkcjonalnych połączeń neuronalnych. Kaskada dopełniacza naznacza synapsy, które muszą być eliminowane i działa poprzez receptor dopełniacza C3 na mikrogleju. Mikroglej reaguje też na zmiany aktywności neuronalnej. Wyniki badań ultrastrukturalnych pokazały, że po ekspozycji na światło po deprivacji wzrokowej w korze wzrokowej zmienia się położenie i morfologia wypustek mikrogleju oraz ich położenie w szczelinie synaptycznej i wokół synaps. W czasie deprivacji wzrokowej mikroglej staje się mniej mobilny i lokuje się w sąsiedztwie dużych kolców dendrytycznych, które się kurczą. Wyniki te wskazują na subtelny udział mikrogleju w reorganizacji synaps w zależności od doświadczenia plastyczności synaptycznej.

Rola mikrogleju w rozwoju stanu zapalnego w ośrodkowym układzie nerwowym

Stan zapalny jest wspólnym wyznacznikiem wielu chorób neurodegeneracyjnych o różnej etiologii i szereg danych wskazuje, że rozwój zapalenia w mózgu może być krytycznym mechanizmem odpowiedzialnym za postępującą neurodegenerację. Kluczowa rola w inicjacji i progresji tego procesu przypada komórkom mikrogleju, gdyż w wyniku uszkodzenia neuronów lub zahamowania aktywności neuronalnej, następuje prozapalna aktywacja mikrogleju. Chroniczna i niekontrolowana aktywacja mikrogleju pobudzanego przez toksyny środowiskowe, nieprawidłowe agregaty białek oraz śmierć neuronalną w wyniku ekscytotoksyczności, powoduje uruchomienie produkcji toksycznych substancji, które przyczyniają się do uszkodzeń w ośrodkowym układzie nerwowym. W warunkach patologicznych dochodzi do aktywacji mikrogleju, czemu towarzyszy hipertrofia ciała komórki i retrakcją wypustek (**Fig. 1**). Do akumulacji reaktywnego mikrogleju dochodzi także w regionach mózgu zmienionych w wyniku niedokrwienia.

Aktywacja mikrogleju charakteryzuje się zmianą morfologii komórkowej i przekształceniem z formy rozgałęzionej w ameboidalną, dochodzi do zaniku wypustek, a ciało komórki mikrogleju powiększa się tworząc formę ameboidalną (**Fig. 1, 2**). Proces ten można imitować w komórkach mikrogleju hodowanych *in vitro* i stymulowanych lipopolisacharydem. Komórki mikrogleju stają się ameboidalne i dochodzi w nich do aktywacji szlaków sygnałowych i ekspresji genów (**Fig. 2b**). Cytoszkielek aktywny zbudowany jest z filamentów aktynowych, o średnicy około 6 nm, które dzięki ich zdolności do interakcji z wieloma białkami strukturalnymi i funkcjonalnymi tworzą w komórkach złożone układy przestrzenne takie jak sieć aktynowa, włókna naprężeniowe oraz wypustki powierzchniowe (lamellipodia, filopodia i pofałdowania błon). Cytoszkielek aktywny ulega dynamicznym zmianom w aktywowanym mikrogleju.

Czasowe zamknięcie tętnicy środkowej mózgu powoduje przejściowe niedokrwienie, w wyniku którego dochodzi do uszkodzenia prążkowiec, kory mózgowej oraz innych struktur mózgu, które są zaopatrywane w krew przez tętnicę środkową mózgu. Aby uwidocznić i ocenić ilościowo komórki umierające, wykonano detekcję fragmentacji DNA *in situ* metodą TUNEL. Reakcja TUNEL polega na przyłączeniu do wolnych końców 3'-OH małych fragmentów DNA (180-200 par zasad lub ich wielokrotność) nukleotydów znakowanych fluoresceiną. Reakcja ta jest katalizowana przez enzym – terminalną transferazę (TdT), a zabarwieniu ulegają tylko komórki, które mają pofragmentowaną chromatynę. Preparaty po barwieniu były skanowane za pomocą laserowego cytometru skaningowego. Po obliczeniu średniej wielkości jąder komórkowych wybarwionych barwnikiem DAPI i przeliczeniu intensywności fluorescencji TUNEL, można było precyzyjnie określić liczbę komórek umierających. W mózgu zwierząt z operacją pozorowaną nie wykrywano fragmentacji DNA (**Fig. 3a**). Barwienie metodą TUNEL wykazało obecność licznych komórek z pofragmentowanym DNA w 24 godziny po wywołaniu niedokrwienia.

Cytokiny wydzielane przez mikroglej mogą aktywować inne komórki glejowe – astrocyty, które odgrywają ważną rolę w zachowaniu integralności tkanki po uszkodzeniu mózgu. Wiele toksycznych bodźców aktywuje astrocyty powodując zwiększoną proliferację i silną hipertrofię ciała komórki, jądra i wypustek, zwiększony poziom kwaśnego włókienkowego białka astrocytów – GFAP. W korze mózgowej po niedokrwieniu dochodzi do proliferacji i hipertrofii astrocytów, co uwidoczniono za pomocą przeciwciała rozpoznającego GFAP. (**Fig. 1, 3b**). Aktywowane astrocyty produkują czynniki wzrostowe, cytokiny, tlenek azotu i neuropeptydy o różnorodnych neurotroficznym lub neurotoksycznym właściwościach. Zmiany morfologiczne astrocytów mogą być obrazowane w hodowli pierwotnej astrocytów stymulowanych mieszaniną cytokin prozapalnych: interleukiną 1 beta (IL-1 β), czynnikiem nekrozy nowotworu alfa (TNF α), interferonem gamma (IFN γ) (**Fig. 3c**). Odpowiedź gleju może także być korzystna w uszkodzeniach układu nerwowego, jednakże rozległa glicja może przynosić szkodę, gdyż aktywacja gleju i formacja blizny mogą opóźnić lub zahamować regenerację.

Mikroglej w patologii glejaków

Wyniki badań klinicznych oraz doświadczalnych wskazują, że nowotwory są heterogenne i w ich mikrośrodkowisku znajduje się wiele komórek układu odpornościowego. Wśród rekrutowanych komórek hematopoetycznych są m.in. monocyty, makrofagi, granulocyty, komórki tuczne, komórki dendrytyczne i mieloblastyczne komórki supresorowe. U pacjentów z złośliwymi glejakami (guzy mózgu pochodzenia astrocytarnego) dochodzi do akumulacji licznych komórek mikrogleju (do 30% wszystkich komórek znajdujących się w masie guza) mimo iż nie towarzyszy temu aktywna odpowiedź przeciwnowotworowa ani klasyczna odpowiedź prozapalna. Obserwacje morfologii mikrogleju w ludzkich glejakach wykazały, iż w glejakach o III i IV-tym stopniu złośliwości występuje aktywny, ameboidalny mikroglej. Wyniki naszych badań w mysim modelu glejaka z użyciem cytometrii przepływowej wskazują na migrację mikrogleju we wczesnym okresie po implantacji glejaka, a następnie na infiltrację obwodowych makrofagów. Infiltrujące guz mikroglej i makrofagi zamiast uczestniczyć w odpowiedzi przeciwnowotworowej, pełnią kluczową rolę w regulacji jego wzrostu, przerzutowania i odpowiedzi na terapię. Jednocześnie, w celach naprawczych makrofagi indukują tworzenie się naczyń krwionośnych oraz przebudowę tkanki łącznej. Komórki mikrośrodkowiska mają też swój udział w powstaniu środowiska immunosupresyjnego, umożliwiającego ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru układu odpornościowego.

Opracowane w Pracowni Regulacji Transkrypcji modele doświadczalne w postaci współhodowli komórek mikrogleju i glejaka, lub implantacja znakowanych GFP komórek glejaka GL261 do mózgu myszy, dobrze odzwierciedlają zjawiska obserwowane w guzach ludzkich. Zarówno *in vitro* jak w modelu zwierzęcym obserwujemy zmiany morfologiczne, wzrost ruchliwości oraz aktywację procesów biochemicznych i molekularnych charakterystycznych dla alternatywnie i proinwazyjnie aktywowanego mikrogleju.

Postulujemy, że mikroglej i makrofagi, które akumulują się w glejakach uzyskują fenotyp M2 cechujący się m.in.: ekspresją receptorów błonowych, receptora fragmentu Fc immunoglobuliny IgG typu 2 (Fc-R2, CD23), receptora mannozowego (MR), receptora CD14, receptorów typu „scavenger”; wydzielaniem cytokin przeciwzapalnych IL-10, TGF- β , brakiem aktywności cytotoksycznej, zwiększoną ekspresją arginazy 1 (Arg-1). Opisane cechy wskazują na przeciwzapalne właściwości komórek typu M2 i hamowanie przeciwnowotworowej odpowiedzi odpornościowej. Wyniki badań w modelu doświadczalnych glejaków pokazują, że niskocząsteczkowe inhibitory szlaków przekazywania o działaniu przeciwzapalnym, takie jak cyklosporyna A i antybiotyk minocyklina, lub użycie agonisty A1AR (receptor nukleotydów adeninowych) hamują infiltrację i aktywację mikrogleju/makrofagów w glejakach, znoszą ich proinwazyjne działanie, co prowadzi do zahamowania neowaskularyzacji i progresji nowotworu.

Podsumowanie

Mikroglej pełni ważną rolę w utrzymywaniu homeostazy ośrodkowego układu nerwowego, wydziela czynniki neuroprotektoryjne, wpływa na jego prawidłowy rozwój i różnicowanie, moduluje plastyczność neuronalną u organizmów dorosłych.

Uszkodzenia mózgu o różnej etiologii indukują kaskadę patologicznych zmian, na którą składa się śmierć neuronów, aktywacja mikrogleju typu M1, reaktywna astroglia oraz uruchomienie uogólnionej odpowiedzi układu odpornościowego. W stanach patologicznych aktywny mikroglej produkuje cytokiny prozapalne i toksyczne oraz liczne mediatory stanu zapalnego, które aktywują śmierć kolejnych komórek pogłębiając uszkodzenie mózgu. Jednakże całkowita eliminacja mikrogleju zwykle ma działanie niekorzystne, gdyż pewne jego funkcje są niezbędne dla procesów protekcyjnych i naprawczych. Liczne dane wskazują, że można farmakologicznie blokować aktywację mikrogleju i w ten sposób zmieniać poziom ekspresji cytokin prozapalnych, a co za tym idzie, charakter odpowiedzi komórek glejowych w obszarze uszkodzenia. Badania ostatnich lat pokazują też alternatywną aktywację mikrogleju, która w przypadku glejaków wspiera inwazyjność i hamuje odpowiedź immunologiczną. Lepsze poznanie funkcji i mechanizmów molekularnych aktywacji mikrogleju, może umożliwić subtelne przełączanie jego funkcji w zależności od pożądanego efektu. Zjawiska prozapalnej i proinwazyjnej aktywacji mikrogleju można obrazować w dobrze zdefiniowanych modelach *in vitro* i *in vivo*.

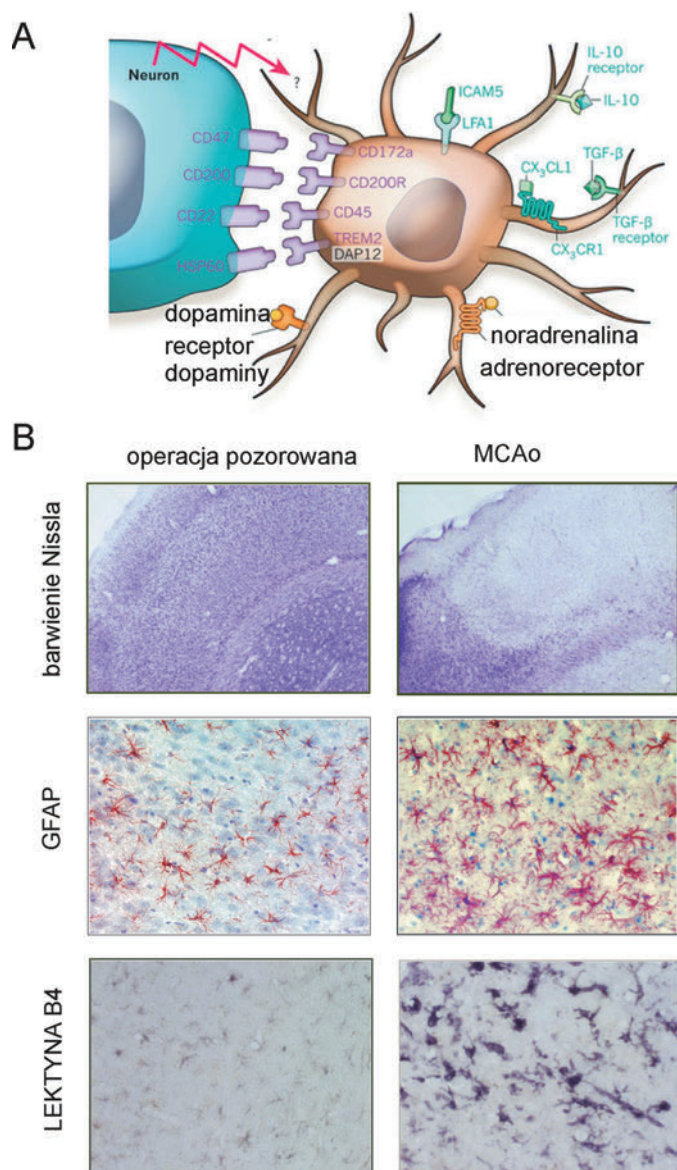


Fig. 1 A-B. Interakcje neuron-mikroglej i obrazowanie jego aktywacji w mózgu po niedokrwieniu. **A.** Schemat obrazuje, w jaki sposób stan spoczynkowy mikrogleju utrzymywany jest przez sygnały dostarczane przez neurony, takie jak CX₃C-chemokine ligand 1 (CX₃CL1), ICAM-5 (ang. *intercellular adhesion molecule-5*), glikoproteiny błonowe CD47, CD200 i CD22, które oddziałują z właściwymi receptorami na mikrogleju. W hamowaniu aktywności mikrogleju ważną rolę pełnią oddziaływania neuroprzekaźników z ich receptorami: dopaminy z receptorami dopaminy (D1, D2, D3 i D4) i noradrenaliny z adrenoceptorem oraz aktywność elektryczna neuronów poprzez nieznaną jeszcze mechanizm. Na mikrogleju znajdują się też receptory cytokin immunosupresyjnych IL-10 oraz TGF β (ang. *transforming growth factor β*). **B.** Zmiany morfologii komórek mikrogleju i astrocytów w korze mózgowej po uszkodzeniu wywołanym przejściowym niedokrwieniem uwidocznione w badaniach immunohistochemicznych: obszar uszkodzenia i śmierci neuronów zobrażowano wykonując barwienie Nissla. Mikroglej znakowany był lektyną B4 (brązowy kolor), natomiast astrocyty obrazowano przeciwciałem rozpoznającym kwaśne włóknikowe białko astrocytów GFAP (czerwony kolor), jądra komórkowe zabarwiono hematoksyliną. Przejściowe niedokrwienie wywoływano przez zamknięcie na 90 minut tętnicy środkowej mózgu (*middle cerebral artery occlusion, MCAo*), co powoduje silne uszkodzenie mózgu i śmierć neuronów. Preparaty przygotowane metodą standardową. (Fot. i opis szczegółowy: Zawadzka M. i Kamińska B. 2005).

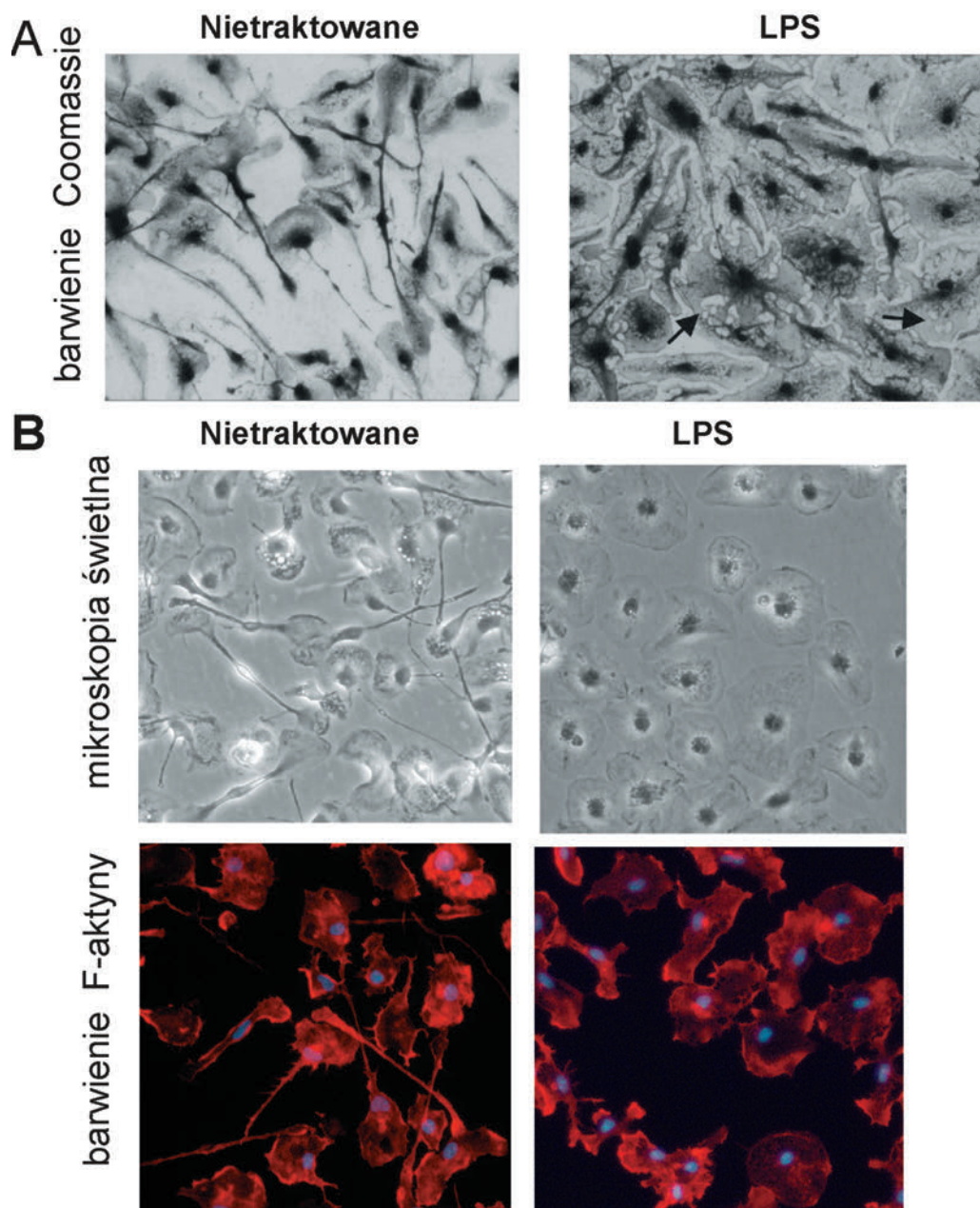


Fig. 2 A-B. Zmiany morfologiczne mikrogleju stymulowanego lipopolisacharydem.

A. Hodowle pierwotne mikrogleju przygotowywano z 1-dniowych osesków szczurzych. Komórki mikroglejowe po wysianiu na szalki pozostawiano na 48 godz., a następnie stymulowano 100 ng/ml lipopolisacharydem (LPS) lub tylko zmieniano pożywkę. W 24 godz. po podaniu LPS wykonano barwienie w roztworze Coomassie Brilliant Blue R-250. Zdjęcie pokazuje bipolarny kształt niestymulowanego mikrogleju i zmiany morfologii komórek w kierunku ameboidalnym po podaniu LPS: utratę wypustek, wzrost ciała komórki, powiększenie jądra komórkowego. Preparaty przygotowane metodą standardową (opis szczegółowy: Kamińska B. i inn. 2009). **B.** Zdjęcie z mikroskopu świetlnego pokazuje bipolarny kształt niestymulowanego mikrogleju i zmiany morfologii komórek w kierunku ameboidalnym po podaniu LPS. Barwienie F-aktyny za pomocą rodaminy z barwnikiem fluorescencyjnym TRIC ujawnia strukturę cytoszkieletu komórek, barwienie DAPI uwidocznia jądra komórkowe. Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego Olympus OX70 pokazuje bipolarny kształt niestymulowanego mikrogleju i ameboidalny kształt komórek w po podaniu LPS. Preparaty przygotowane metodą standardową. (Fot. i opis szczegółowy: Kwiatkowska A. i inn. 2011, Zawadzka M. i inn. 2012).

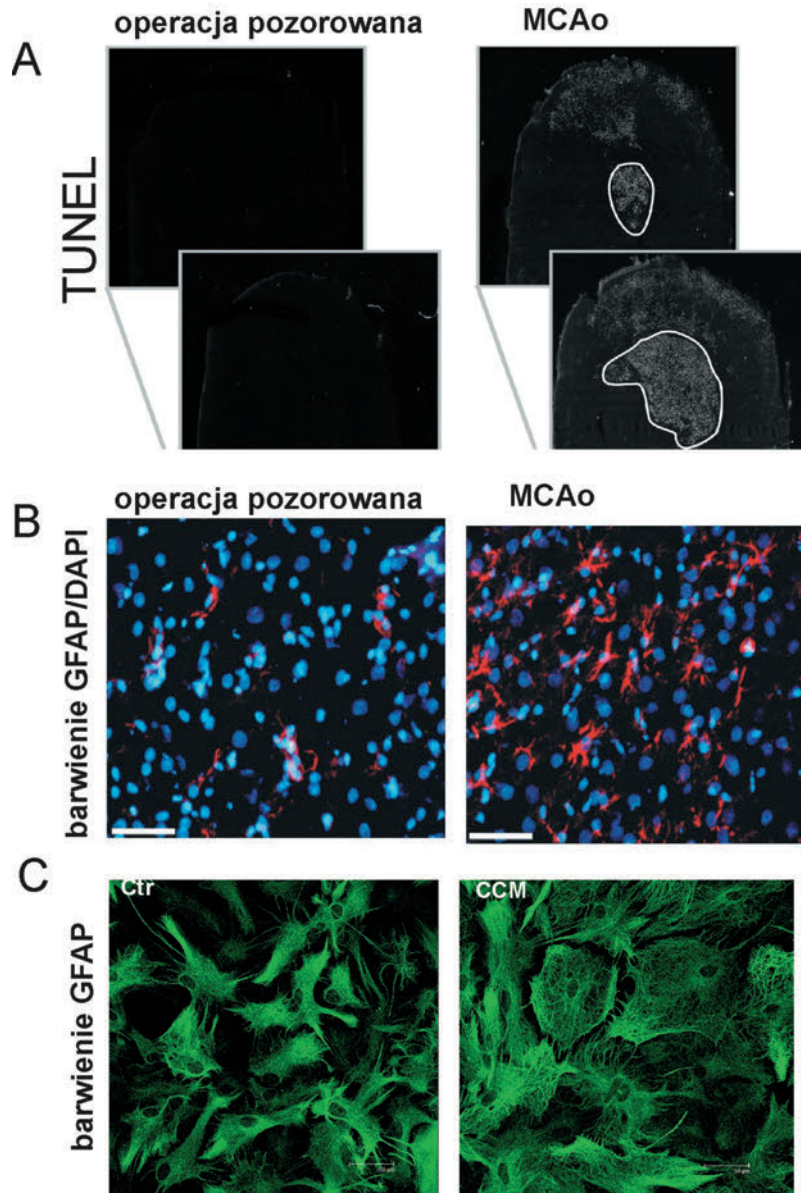


Fig. 3 A-C. Aktywacja astrocytów w obszarze neurodegeneracji wywołanej przejściowym niedokrwieniem. **A.** Komórki umierające z pofragmentowanym DNA uwidoczniono wykonując detekcję fragmentacji DNA *in situ* metodą TUNEL. W mózgu zwierząt z operacją pozorowaną nie wykrywano fragmentacji DNA. W 24 godziny od wywołania 90 min niedokrwienia (MCAO) w mózgu zwierząt obserwowano silną fragmentację DNA (zwłaszcza w ognisku uszkodzenia – prążkowiu). Znakowane fluorescencyjnie preparaty analizowano przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. Preparaty przygotowane metodą opisaną szczegółowo: Szydłowska K. i inn. 2010). **B.** Aktywacja i zmiany morfologiczne astrocytów w korze mózgowej uwidocznione za pomocą barwienia fluorescencyjnego. Wykonano podwójne barwienie z przeciwciałem rozpoznającym GFAP, które jest markerem astrocytów (kolor czerwony) i ze znacznikiem fluorescencyjnym DAPI (kolor niebieski). Preparaty przygotowane metodą opisaną szczegółowo: Szydłowska K. i inn. 2006). **C.** Aktywacja i zmiany morfologiczne astrocytów pod wpływem cytokin prozapalnych *in vitro*. Hodowle pierwotnych astrocytów stymulowano przez 24 godz. mieszaniną cytokin prozapalnych: IL-1 β , IFN γ , TNF α (50 ng/ml). Wykonano barwienie fluorescencyjne z przeciwciałem rozpoznającym GFAP, które jest markerem astrocytów. Zdjęcie pokazuje hipertrofię ciała komórki i wzrost włóknienkowatych struktur zawierających GFAP. Skala, 50 μ m. Fot. Kinga Szydłowska.

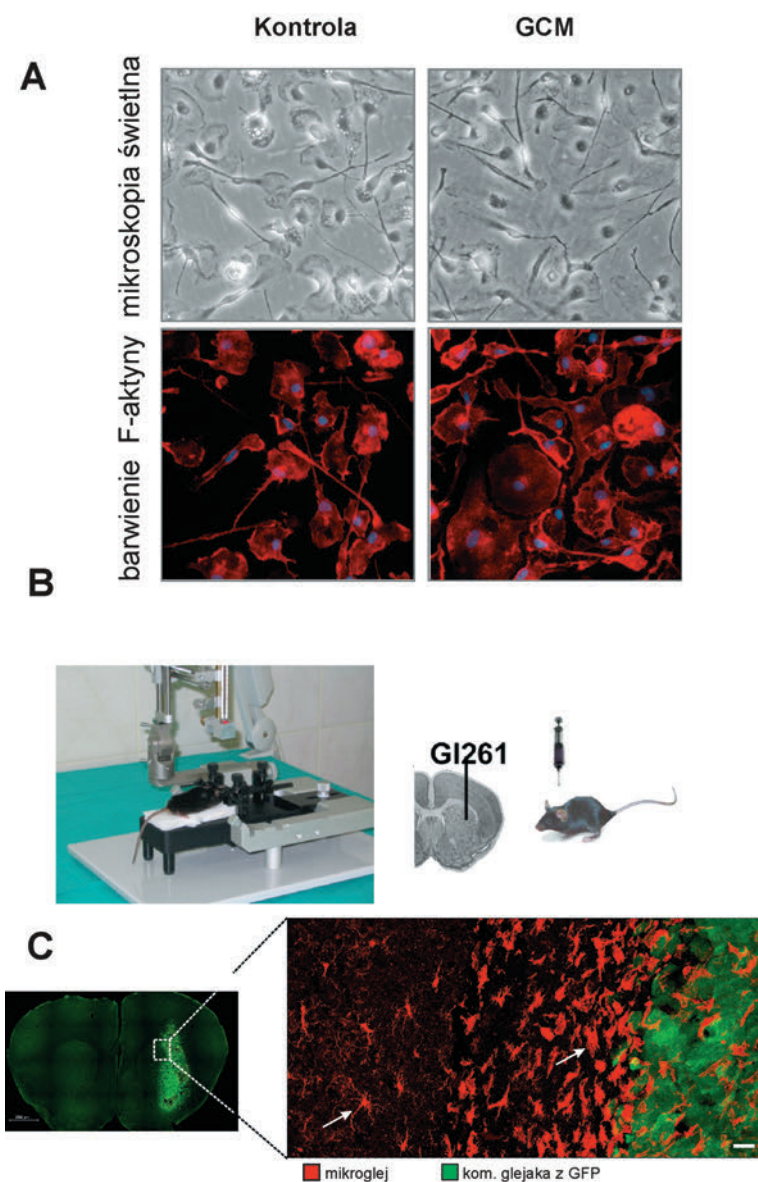


Fig. 4 A-C. Akumulacja i aktywacja mikrogleju pod wpływem czynników wydzielanych przez glejaka w modelach doświadczalnych.

A – Pierwotne hodowle szczurzego mikrogleju były ekspozowane na pożywkę z nad glejaka (GCM, glioma conditioned medium). Zmiany morfologiczne obrazowano po 24 godz. za pomocą mikroskopii świetlnej lub fluorescencyjnej po barwieniu F-aktyny z falloidyną-TRIC; jądra komórkowe barwiono barwnikiem fluorescencyjnym DAPI. Preparaty przygotowane metodą standardową (opis szczegółowy: Kwiatkowska A i inn. 2011).

B – Schemat doświadczenia z implantacją znakowanych na zielono komórek glejaka pEGFP-N1 GL261 za pomocą aparatu stereotaktycznego umożliwiającego precyzyjną implantację do prądkowia myszy.

C – Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują skrawki mózgu w 15 dni po implantacji glejaka pEGFP-N1 GL261 do prądkowia myszy. Mikroglej i makrofagi akumulujące się w guzie wybarwiono przeciwciałem rozpoznającym Iba1. Barwienie to nie rozróżnia mikrogleju i napływających z obwodu makrofagów. Obserwowano akumulację komórek Iba1⁺ oraz silne zmiany morfologiczne, zwłaszcza w pobliżu komórek glejaka (strzałki wskazują słabo i silnie powiększone, ameboidalne komórki mikrogleju). Skala: lewe zdjęcie – 1000 μ m, prawe zdjęcie – 20 μ m. Preparaty przygotowane metodą standardową. Fot. i opis szczegółowy: Gabrusiewicz K. i inn. 2011.

Piśmiennictwo

Gabrusiewicz K., Ellert-Miklaszewska A., Lipko M., Sielska M., Frankowska M. i Kaminska B. (2011) *Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas*. „PLOS One”, **6**: e23902

Kaminska B., Gozdz A., Zawadzka M., Ellert-Miklaszewska A. i Lipko M. (2009) *MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target*. „Anatomical Record”, **292**: 1902–1913

Kwiatkowska A., Kijewska M., Lipko M., Hibner U. i Kaminska B. (2011) *Down-regulation of Akt and FAK phosphorylation reduces invasion of glioblastoma cells by impairment of MT1-MMP shuttling to lamellipodia and downregulates MMPs expression*. „Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.” **1813**: 655-667

Szydłowska K., Zawadzka M. i Kaminska B. (2006) *Neuroprotectant FK506 inhibits glutamate-induced apoptosis of astrocytes in vitro and in vivo*. „J. Neurochem.”, **99**: 965-75

Szydłowska K., Gozdz A., Dabrowski M., Zawadzka M. i Kaminska B. (2010) *Prolonged activation of ERK triggers glutamate-induced apoptosis of astrocytes: neuroprotective effect of FK506*. „J. Neurochem.”, **113**: 904-918

Zawadzka M. i Kaminska B. (2005) *A novel mechanism of FK506 mediated neuroprotection: down-regulation of cytokine expression in glial cells*. „Glia”, **49**: 36-51

Zawadzka M., Dabrowski M., Gozdz A., Szadujkis B., Sliwa M., Lipko M. i Kaminska B. (2012) *Early steps of microglial activation are directly affected by neuroprotectant FK506 in both in vitro inflammation and in rat model of stroke*. „J. Mol. Med.”, **90**: 1459-1471

Pracownia Mikroskopii

Konfokalnej – Jarosław Korczyński, Wanda Kłopocka

Pracownia Mikroskopii Konfokalnej powstała w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w 2002 roku jako laboratorium środowiskowe. Wyposażona była wówczas w dwa mikroskopy: fluorescencyjny DMI 6000 firmy Leica oraz Mikroskop Konfokalny TCS SP2 również firmy Leica. Mikroskopy te umożliwiały obrazowanie głównie utrwalonych preparatów, mimo to już samo zastosowanie do wizualizacji systemu konfokalnego stworzyło możliwości badawcze do tej pory w Polsce nieosiągalne.

W roku 2008 w pracowni zainstalowano system konfokalny TCS SP5 STED firmy Leica, wyposażony w komorę środowiskową, skaner rezonansowy oraz moduł STED umożliwiający wizualizację obrazów w dużej rozdzielczości. Mikroskop ten był wówczas jedynym tego typu urządzeniem w Polsce i Europie Środkowo-Wschodniej. Następnym krokiem w rozwoju pracowni było dokupienie obiektywów o długim dystansie pracy oraz komory środowiskowej do mikroskopu TCS SP2. Dzięki temu wyposażeniu użytkownicy pracowni uzyskali szerokie możliwości prowadzenia badań przyżyciowych.

Do roku 2007 pracownią kierował dr Antoni Wrzosek. W 2008 roku kierownictwo przejęła dr hab. Wanda Kłopocka. Pracownia zatrudnia obecnie dwóch specjalistów, Jarosława Korczyńskiego (biolog) oraz Artura Wolnego (informatyk), którzy współpracują z użytkownikami mikroskopów, pomagając im osiągnąć jak najlepszej jakości wyniki obrazowania. Pracownia ponadto umożliwia kompletną analizę i obróbkę uzyskanych obrazów mikroskopowych wykorzystując zaawansowane programy graficzne, jak np. AutoQuant, Imaris, MetaMorph, Huygens.

Mikroskopy konfokalne Leica TCS SP2 oraz TCS SP5 STED są wyposażone w zestaw laserów pozwalający na wzbudzenie barwników fluorescencyjnych w całym zakresie światła widzialnego i podczerwonego (tj. wzbudzenie od 458 do 633 nm). Dodatkowo każdy system posiada wielofotonowy laser femtosekundowy Mai Tai firmy Spectra Physics emitujący światło w zakresie dalekiej podczerwieni (710-990 nm). Fale światła o takiej długości, w połączeniu z możliwością dwufotonowego wzbudzania fluorochromów, pozwalają na penetrację preparatów tkankowych na głębokość poniżej 200 μm , umożliwiając np. badanie neuronów głębokich warstw korowych mózgu u zwierząt doświadczalnych. Przy tego typu eksperymentach wykorzystywane są obiektywy o długim dystansie pracy (powiększenia 5x, 10x, 20x, 63x, będące na wyposażeniu systemów konfokalnych pracowni. Dodatkowo zainstalowane w mikroskopach komory środowiskowe zapewniają odpowiednią temperaturę, wilgotność oraz stężenie dwutlenku węgla podczas prowadzenia obserwacji przyżyciowych. W przypadku badań *in vivo*, tak wyposażony mikroskop pozwala śledzić np. powolne zmiany plastyczności w skrawkach organotypowych z mózgu nawet przez kilka tygodni.

Zaletą mikroskopu konfokalnego jest dokładna wizualizacja preparatów w osiach X, Y oraz Z

Fig. 1, (Pracownia Mikroskopii Konfokalnej). Obraz powstały w ten sposób pozwala na tworzenie trójwymiarowej rekonstrukcji badanej próbki przy użyciu takich programów jak Imaris czy Image Pro Plus. Powstałe rekonstrukcje mogą zostać poddane procesowi dekonwolucji w programach Huygens lub AutoQuant, który eliminuje zakłócenia obrazu wywołane fizycznymi ograniczeniami optyki mikroskopowej, w ten sposób stają się niemal rzeczywistym odzwierciedleniem badanych mikroskopijnych obiektów.

Warto w tym miejscu dodać, że mikroskop Leica TCS SP5 jest wyposażony w innowacyjny moduł STED (ang. *Stimulation Emission Depletion*) umożliwiający obrazowanie z rozdzielczością w osiach XY poniżej 90 nm, a więc ponad dwa razy większą niż w konwencjonalnych mikroskopach konfokalnych. Pozwala to na dokładniejszą analizę preparatów barwionych fluorescencyjnie, m.in. szczegółowe pomiary kształtu i lokalizacji wybarwionych struktur, a tym samym bardziej precyzyjne określenie ich ko-lokalizacji w preparacie. Natomiast z drugiej strony, przy badaniu dużych obiektów biologicznych, mikroskop Leica TCS SP5, dzięki zastosowaniu zmotoryzowanego stolika, pozwala wykonać i połączyć ze sobą w jedną całość obrazy z sąsiadujących z sobą pól widzenia

Fig. 2, (Pracownia Neurobiologii). Przy prowadzeniu badań przyżyciowych, parametrem, na który warto zwrócić uwagę jest również rozdzielczość czasowa mikroskopu. Z jednej strony mikroskop Leica TCS SP5, dzięki zastosowaniu

dodatkowego skanera rezonansowego, może zbierać do 25 obrazów konfokalnych na sekundę, co pozwala badać bardzo szybkie procesy zachodzące w żywych komórkach, jak np. sygnał wapniowy. Z drugiej strony automatyzacja stolika mikroskopowego, możliwość utrzymywania stałych warunków otoczenia próbki, jak i dodatkowe oprogramowanie Live Data Mode, pozwalają na długotrwałe obserwacje powolnych zjawisk w badanym materiale (np. migracja i podziały komórek na szalce).

Poza wspomnianym obrazowaniem struktur komórkowych, mikroskopy konfokalne w pracowni pozwalają również na badanie właściwości próbki oraz procesów w niej zachodzących. Są to m.in.: technika FRET (ang. *Forster Resonance Energy Transfer*) używana do potwierdzania interakcji pomiędzy wyznakowanymi cząsteczkami, czy też technika FRAP (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*), dzięki której uzyskujemy informacje o wielkości i ruchliwości frakcji mobilnych cząsteczek w próbce. Dodatkowo mikroskop Leica TCS SP2 posiada przystawkę do pomiaru czasów zaniku fluorescencji (FLIM – ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*). Nieinwazyjna technika FLIM, pomaga badać z wysoką rozdzielczością czasowo-przestrzenną parametry środowiska, w którym znajduje się cząsteczka fluorochromu, takie jak: stężenie jonów wapnia, pH, czy też interakcje pomiędzy cząsteczkami (technika FRET – FLIM).

Aparatura znajdująca się w pracowni pozwala na prowadzenie badań zarówno komórek utrwalonych, jak też żywych z użyciem nowoczesnych znaczników fluorescencyjnych. Możliwe jest nie tylko śledzenie zmian na poziomie strukturalnym **Fig. 3**, (Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych), ale poznawanie molekularnych podstaw procesów odpowiedzialnych m.in. za: przemiany zachodzące w toku formowania się nowych połączeń synaptycznych (także w stanach chorobowych, np. epilepsja), przekazywanie sygnałów i odpowiedź komórek eukariotycznych na bodźce, regulację cyklu komórkowego, programowaną śmierć komórek, endo- i egzocytozę, transport wewnątrzkomórkowy, homeostazę jonową, a także procesów prowadzących do zmian patologicznych, takich jak transformacje nowotworowe, stres oksydacyjny czy insulinooporność. Pracownia Mikroskopii Konfokalnej stanowi w Instytucie Nenckiego centrum obrazowania. Wymienione aplikacje mikroskopów znajdujących się w pracowni sprawiają, że zastosowanie mikroskopii konfokalnej jest już nieodzownym elementem w badaniach cytologicznych oraz molekularnych prowadzonych przez niemal wszystkie zespoły badawcze Instytutu Nenckiego. Wśród nich znajdują się takie zagadnienia jak:

1. Molekularne mechanizmy procesów plastyczności neuronalnej, które ma zasadnicze znaczenie dla zrozumienia zjawisk pamięci i uczenia się, a także powstawania uzależnień oraz mechanizmów chorób neurodegeneracyjnych.

– Badano syntezę i funkcjonowanie metaloproteaz w macierzy zewnątrzkomórkowej w plastyczności synaps i tworzeniu nowych połączeń nerwowych. W obrazowaniu przyżyciowym, monitorując zmiany kształtów kolców dendrytycznych wykazano, że endogenna aktywność metaloproteaz (MMP) wywołuje wzrost kolców dendrytycznych oraz zależne od MMP tworzenie podklasy kolców dendry-

tycznych tzw. (z ang.) *spine head protrusions* (Pracownia Neurobiologii) (Michałuk P. i inn. 2011).

Mikroskopia konfokalna umożliwiła obrazowanie pojedynczych kolców dendrytycznych w kulturach neuronów **Fig. 4**, (Pracownia Biofizyki Komórki).

– Badając rolę zewnątrzkomórkowej proteolizy w patogenezie padaczki pokazano istotne znaczenie metaloproteazy MMP-9 w epileptogenezie (dwóch farmakologicznie wywołanych modelach epilepsji). Mikroskopia konfokalna umożliwiła wizualizację związku tej metaloproteazy z synapsami na kolcach dendrytycznych komórek hipokampa (Pracownia Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej). Wilczynski G. i inn. (2008)

– Pokazano zmiany w architekturze jądra komórkowego powstające na skutek impulsów nerwowych wywołujących epilepsję. (rozkład chromatyny i białek biorących udział w transkrypcji). Walczak A. i inn. (2013).

2. Interakcje głąk-mikrogłąk jako cel nowych terapii.

– Analiza obrazów skrawków mózgu pokazała zmiany w mikrogłąku w bezpośrednim sąsiedztwie guza **Fig. 5**, (Pracownia Regulacji Transkrypcji)

– Wykazano wpływ komórek mikrogłąku na hamowanie inwazyjności i migrację komórek głąka poprzez cyklosporynę A. (Gabrusiewicz K. i inn. 2011).

3. Transport i fizjologiczna rola karnityny oraz jej pochodnych w komórkach układu nerwowego, zjawiska bardzo istotne w funkcjonowaniu bariery krew – mózg.

– Zastosowanie mikroskopii konfokalnej umożliwiło określenie lokalizacji transporterów karnityny w komórkach mózgu: astrocytach, neuronach, komórkach śródbłona, stanowiących model *in vitro* (Pracownia Procesów Transportu w Błonach Biologicznych). (Czeredys M. i inn 2008, Samluk Ł. i inn. 2012).

4. Zmiany w organizacji i strukturze mitochondriów **Fig. 6**, (Pracownia Bioenergetyki Błon Biologicznych) wywoływane przez stres czy mutacje w mitochondrialnym DNA i analiza zmian w funkcjonowaniu tych organelli w aspekcie chorób neurodegeneracyjnych, kardiomiopatii, nowotworów czy procesów starzenia.

– Badano mechanizm oddziaływania mitochondriów z błonami innych organelli komórkowych np. współdziałanie błon: plazmatycznej, mitochondrialnej i siateczki śródplazmatycznej.

– Rolę mitochondriów w apoptozie i starzeniu się komórek. (Wojewoda M. i inn. 2011).

5. Wpływ aktywności kanałów jonowych na funkcje mitochondriów oraz oddziaływania modulatorów kanałów potasowych z białkami mitochondrialnymi

– Charakterystyka mitochondrialnych kanałów potasowych w mięśniach szkieletowych oraz w mózgu (Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych). (Skalska J. i inn. 2008, 2009; Kajma A. i Szewczyk A. 2012).

6. Regulacja cyklu komórkowego i rola punktu kontroli naprawy DNA i punktu kontroli mitozy w kancerogenezie, starzeniu komórkowym oraz apoptozie. Procesy prowadzące do starzenia się i śmierci komórek leżą w centrum zainteresowania licznych ośrodków badawczych na świecie. Ich mechanizmy oraz indu-

kujące je ścieżki sygnałowe są podobne do zmian prowadzących do nowotworzenia oraz neurodegeneracji.

– Śledzono indukowane pęknięcia nici DNA **Fig. 7**, (Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia). (Korwek Z. i inn. 2012).

7. Zależności strukturalno-funkcjonalne w ramach rodziny homologicznych białek wiążących jony wapnia i błony biologiczne.

– Badano udział gelsoliny i aneksyn w regulacji szkieletu aktynowego komórek **Fig. 8**, (Pracownia Biochemii Lipidów).

8. Miozyny niekonwencjonalne w procesach migracji komórek i transportu wewnątrzkomórkowego organelli oraz innych struktur błonowych.

– Zarejestrowano zmiany w lokalizacji miozyny VI w rozmaitych komórkach, w różnych warunkach doświadczalnych.

– Pokazano dystrybucję miozyny VI w złączy nerwowo-mięśniowym **Fig. 9**, (Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych). (Karolczak J. i inn. 2012).

9. Funkcje białek podobnych do fosducyny w fałdowaniu aktyny i tubuliny u pierwotniaków i w unieśmiertelionych komórkach ssaków.

– Pokazano lokalizację badanych białek oraz wzór ułożenia ciałek podstawowych u *Tetrahymena thermophila* w komórkach o fenotypie dzikim oraz w mutantach **Fig. 10**, (Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych).

– Mikroskopia konfokalna umożliwiła także przeprowadzenie szczegółowej analizy zmian struktury cytoszkieletu mikrotubularnego w komórkach mutantów *Tetrahymena thermophila* **Fig. 11**, (Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych).

10. Organizacja cytoszkieletu w typie dzikim i morfogenetycznych mutantach orzęsków: *Paramecium tetraurelia* i *Tetrahymena thermophila* **Fig. 12**, (Pracownia Regeneracji i Morfogenezy Protozoa).

– Badano m.in. biogenezę i ruchliwość rzęsek. Sharma N. i inn. (2007)

11. Molekularne mechanizmy przekazywania sygnału przez receptory błonowe komórek układu odpornościowego, takich jak FcγRIIA i TLR4 (Pracownia Receptorów Błony Komórkowej). (Szymańska E. i inn. 2009, Kleveta G. i inn. 2012).

12. Lokalizacje i funkcje białka CacyBP/SIP w chorobach neurodegeneracyjnych. (Pracownia Białek Wiążących Wapń).

– Wykazano interakcję i kolokalizację białka CacyBP/SIP z tubuliną i białkiem tau oraz jego udział w oligemeryzacji tubuliny. (Filipek A. i inn. 2008).

W Pracowni Mikroskopii Konfokalnej Instytutu Nenckiego prowadzone są badania naukowe na poziomie światowym. Jedną z najprężniej rozwijających się obecnie technik badawczych jest mikroskopia świetlna. Zainteresowanie obrazowaniem i technikami mikroskopowymi zaowocowało udziałem Instytutu Nenckiego w wielu krajowych i międzynarodowych inicjatywach badawczych.

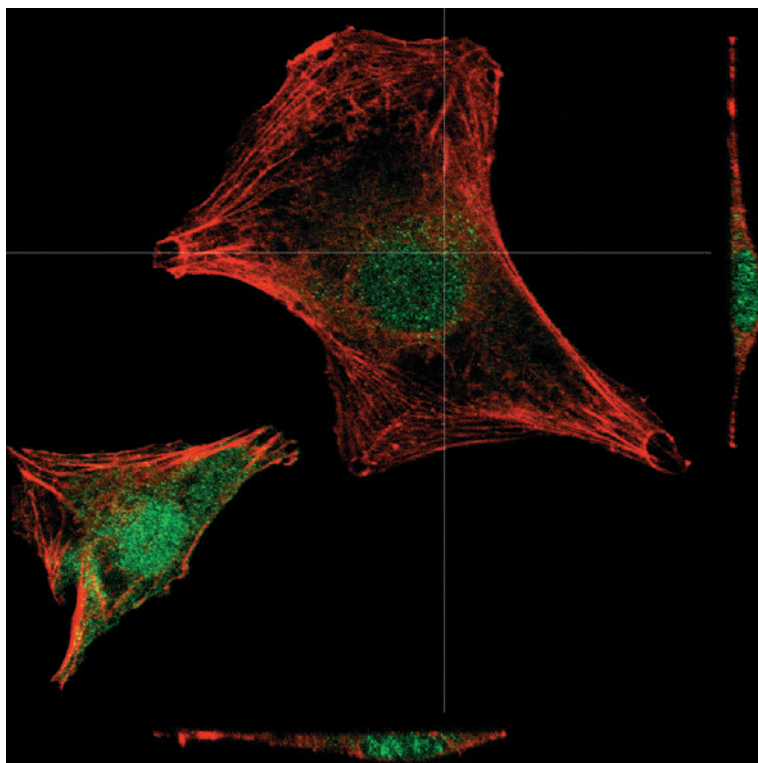


Fig. 1 Projekcja 3D komórek glejaka C6. Wyznakowane filamenty aktynowe (czerwony) oraz ufosforylowana kofilina (zielony). Fot. J. Korczyński – Pracownia Mikroskopii Konfokalnej.

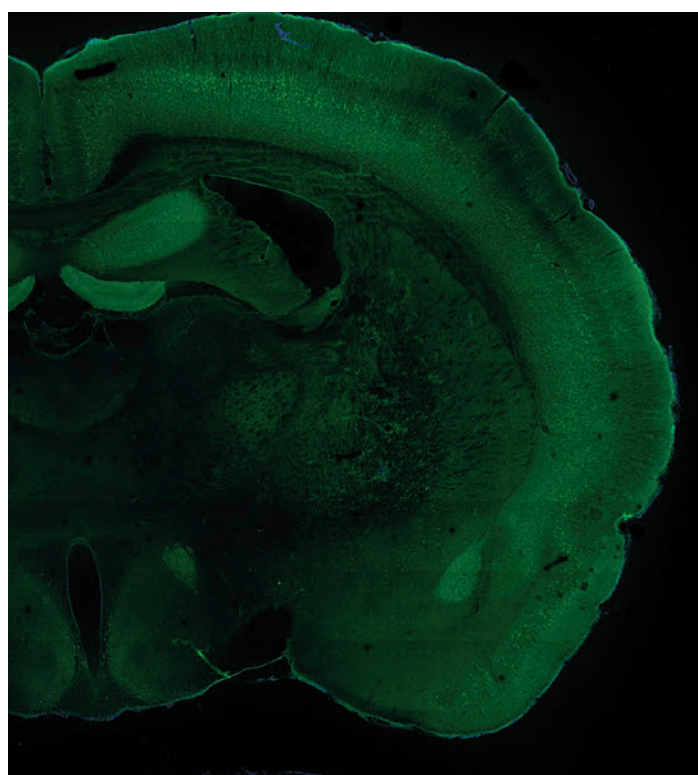


Fig. 2 Przekrój przez mózg szczura transgenicznego. Ekspresja GFP pod neurospecyficznym promotorem Thy-1. Zdjęcie wykonane za pomocą skanu mozaikowego. Fot. M. Stefaniuk – Pracownia Neurobiologii.

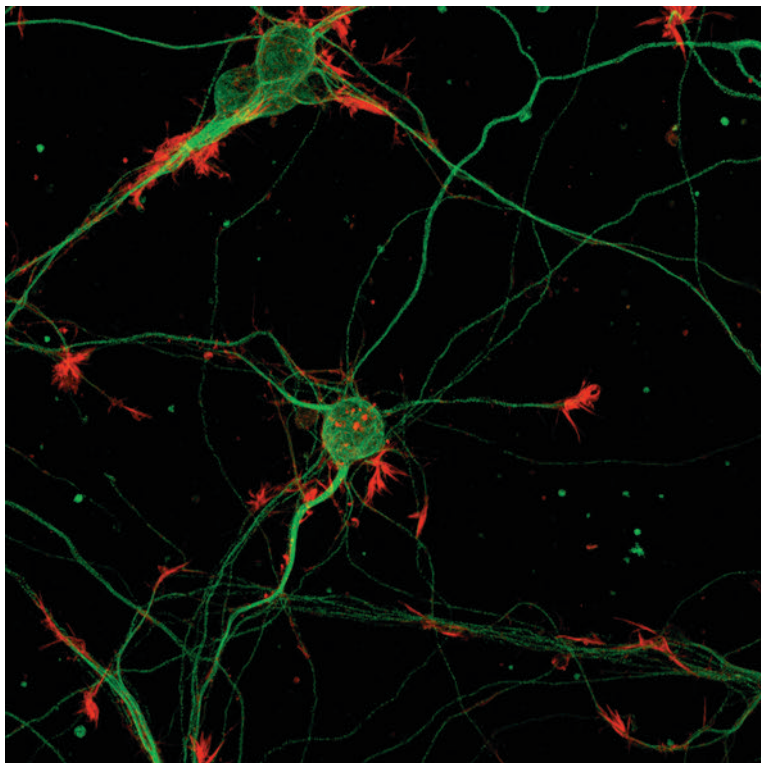


Fig. 3 Neurony korowe myszy z wybarwionymi filamentami aktynowymi w stożkach wzrostu neurytu (czerwony) oraz mikrotubulami (zielony). Fot. T. Zajkowski – Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych.

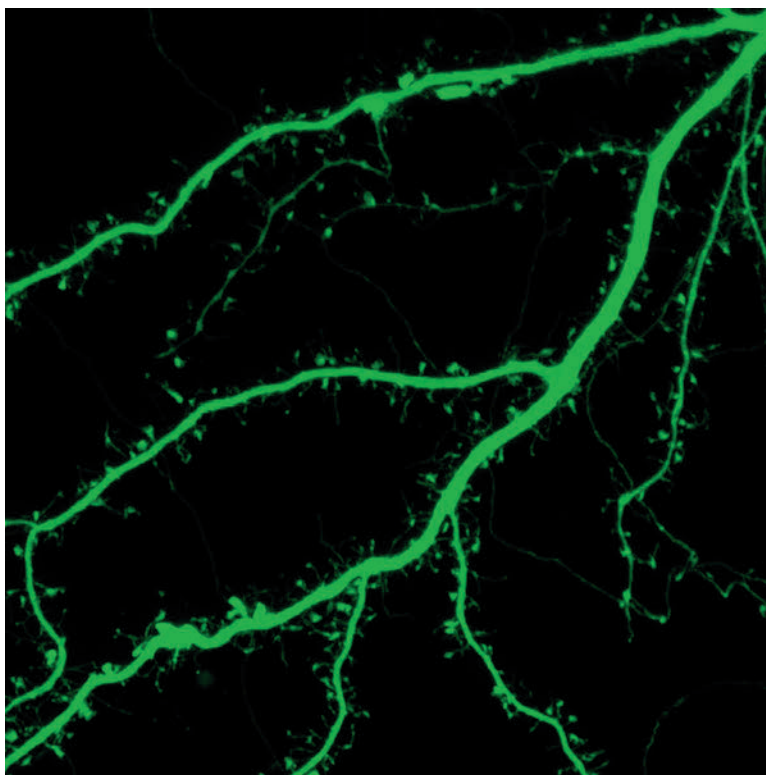


Fig. 4 Obserwacja zmian w morfologii kolców dendrytycznych w neuronach szczura. Fot. M. Pyskaty – Pracownia Biofizyki Komórki.

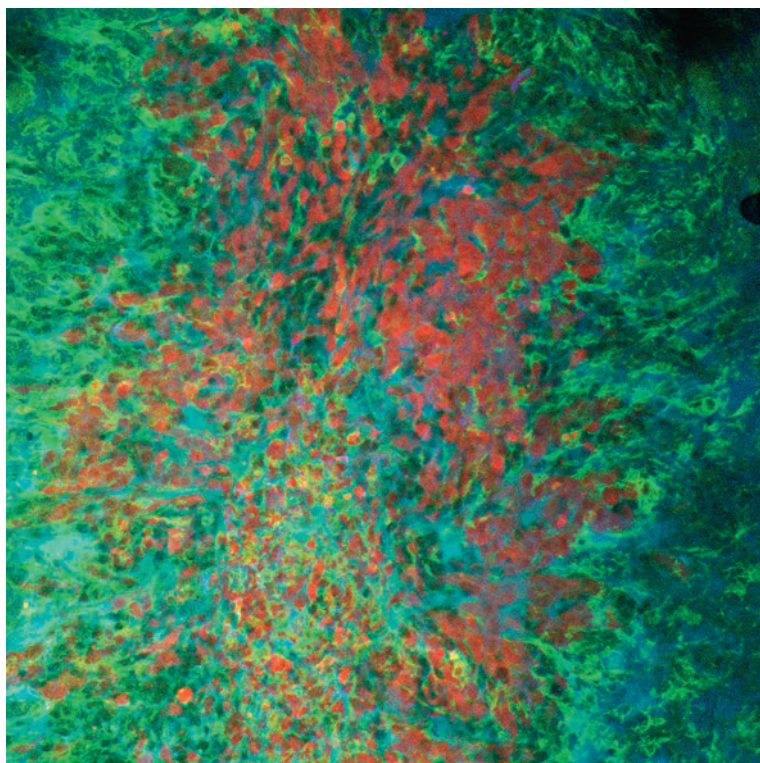


Fig. 5 Mikroglej (zielony) gromadzący się w pobliżu guza glejaka GL261 (czerwony) w mózgu myszy. Dodatkowe barwienie (niebieski) pokazuje immunosupresyjny fenotyp mikrogleju wspierający wzrost glejaka. Fot. M. Sielska – Pracownia Regulacji Transkrypcji.

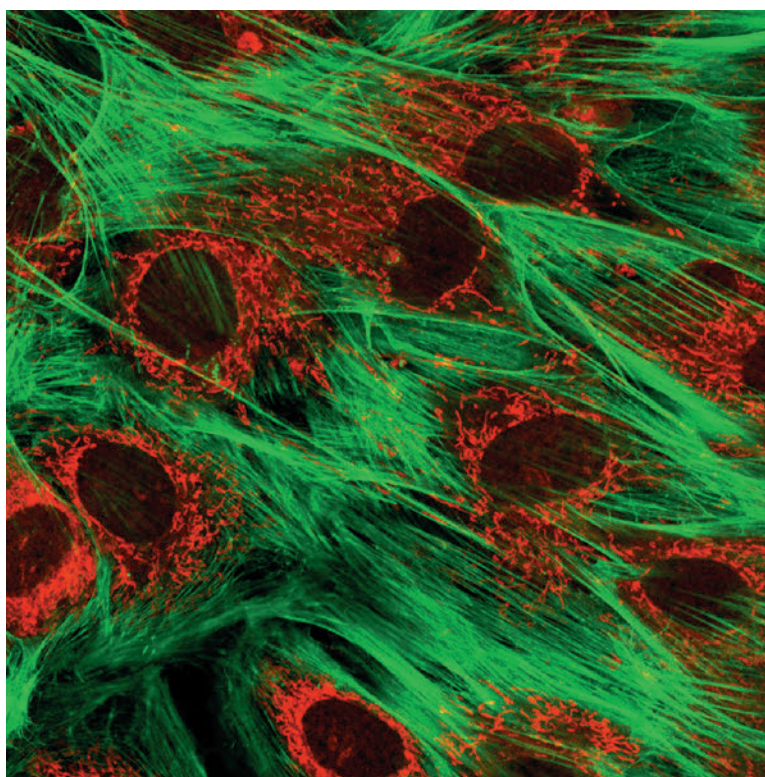


Fig. 6 Mioblasty z wyznakowanymi filamentami aktynowymi (zielony) i mitochondriami (czerwony). Fot. J. Szczepanowska – Pracownia Bioenergetyki i Błón Biologicznych.

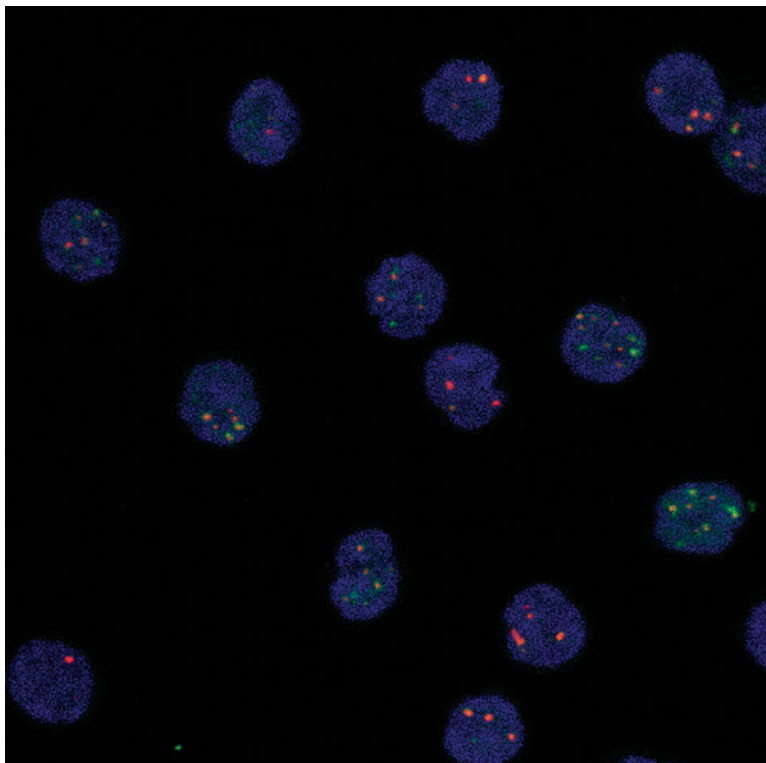


Fig. 7 Jądro komórkowe prawidłowego ludzkiego limfocyty T, w którym w wyniku działania związku uszkodzającego DNA, powstają skupiska białek γ H2AX (zielony) i 53BP1 (czerwony). Ich współwystępowanie świadczy o pęknięciu obu nici DNA. Fot. Z. Korwek – Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia.

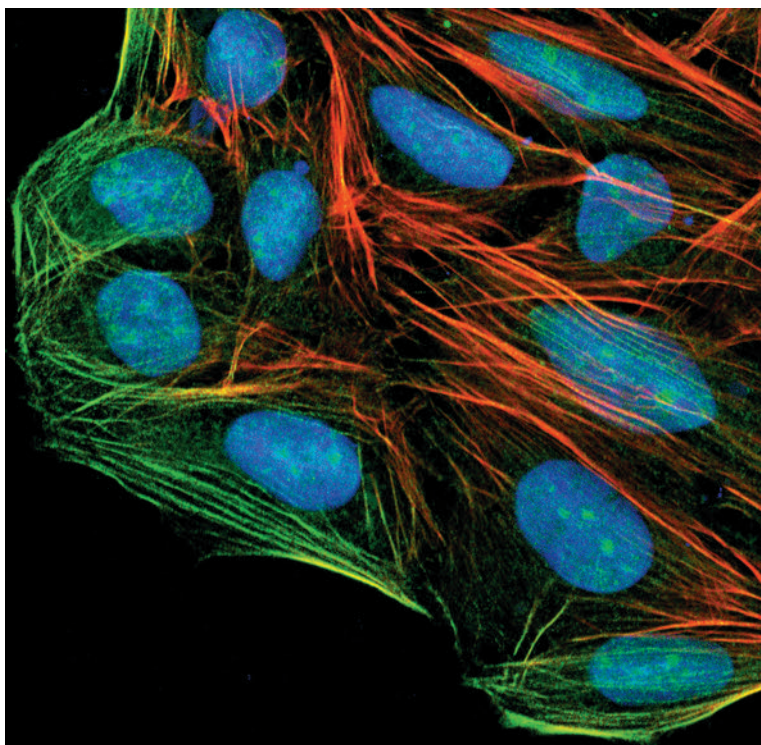


Fig. 8 Komórki ludzkiego mięsaka kościopochodnego Saos-2 z wybarwionymi filamentami aktynowymi (czerwony), gelsoliną (zielony) i jądrem komórkowym (niebieski). Fot. A. Ćmoch – Pracownia Biochemii Lipidów.

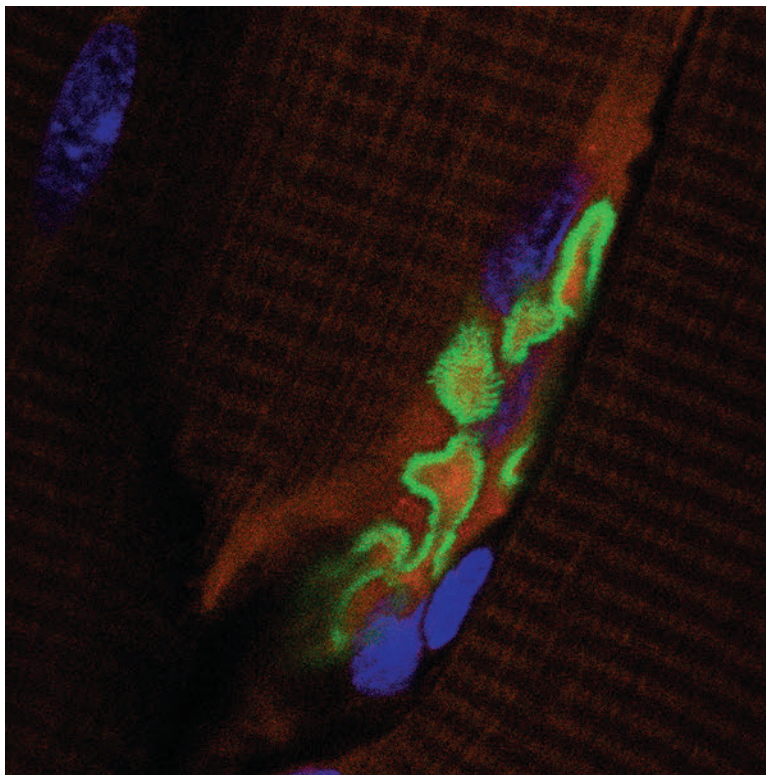


Fig. 9 Rozkład miozyny VI (czerwony) w synapsie nerwowo-mięśniowej na preparacie z mięśnia szkieletowego szczura. Fot. J. Karolczak – Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych (Histochem Cell Biol 2012, *in press*).

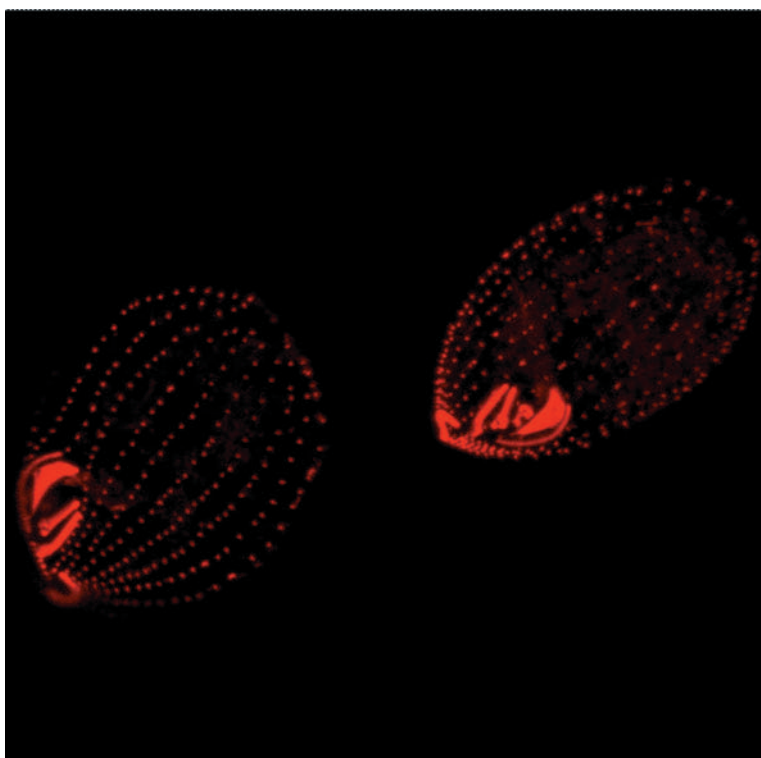


Fig. 10 Wzór ułożenia ciałek podstawowych (wyznakowana na czerwono centryna) w komórkach *Tetrahymena*. Fot. C. Bregier (praca doktorska) – Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych.

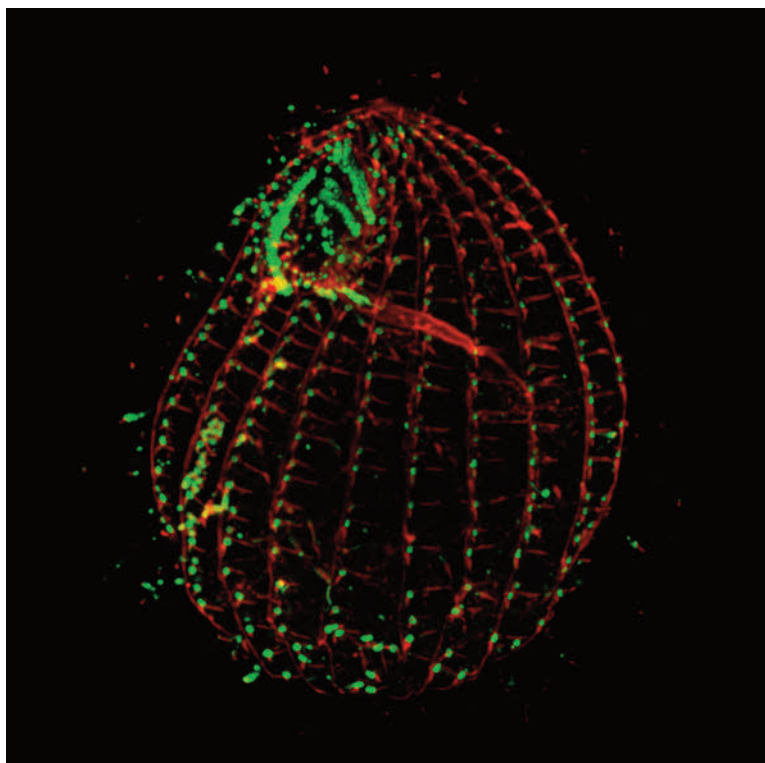


Fig. 11 Orzęsek *Tetrahymena thermophila* z wybarwionymi mikrotubulami (czerwony) oraz białkiem oddziaływującym z mikrotubulami (zielony). Fot. E. Waclawek – Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych.

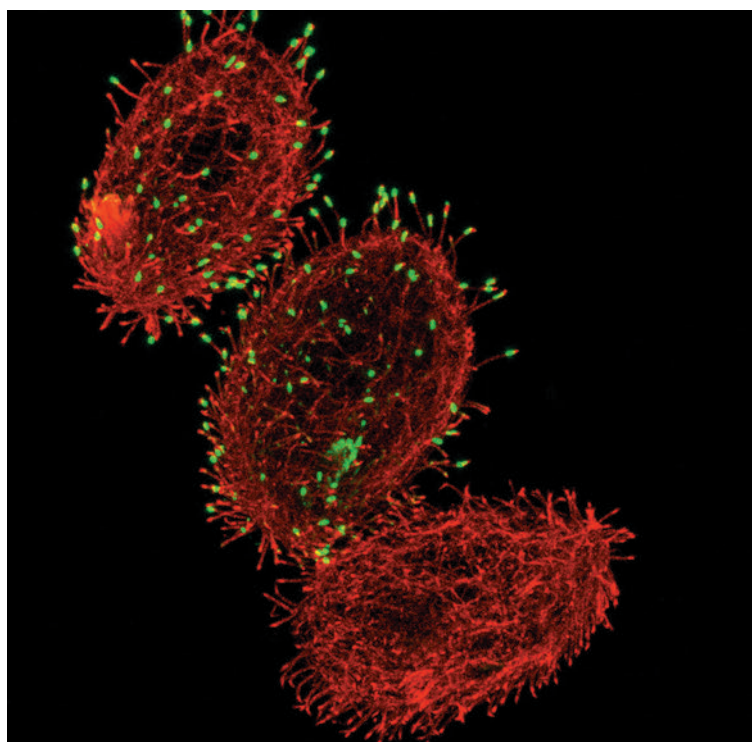


Fig. 12 Komórki *Tetrahymena thermophila* znakowane przeciwciałem poliklonalnym na tubulinę (czerwony – cytoszkielet powierzchniowy i rzęski). Dwie górne komórki zostały transformowane konstruktem genu TTLL z metką GFP (zielony – białko wiążące się na czubkach rzęsek). Fot. M. Dziadosz – Pracownia Regeneracji i Morfogenezy Pierwotniaków.

Piśmiennictwo

Czeredys M., Mysiorek C., Kulikova N., Samluk Ł., Berezowski V., Cecchelli R., Nałęcz K.A. (2008) *A polarized localization of amino acid/carnitine transporter B^{0,+} (ATB^{0,+}) in the blood-brain barrier.* „Biochem. Biophys. Res. Commun.”, **376**: 267-270

Filipek A., Schneider G., Mietelska A., Figiel I. i Niewiadomska G. (2008) *Age-dependent changes in neuronal distribution of CacyBP/SIP: comparison to tubulin, and the tau protein.* „J. Neural. Trans.”, **115(9)**: 1257-1264

Gabrusiewicz K., Ellert-Miklaszewska A., Lipko M., Sielska M., Frankowska M. i Kaminska B. (2011) *Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas.* „PLoS ONE”, **6(8)**: e23902

Kajma A. i Szewczyk A. (2012) *A new pH-sensitive rectifying potassium channel in mitochondria from the embryonic rat hippocampus.* „Biochim. Biophys. Acta”, **1817**: 1867-1878

Karolczak J., Sobczak M., Majewski Ł., Yeghiazaryan M., Jakubiec-Puka A., Ehler E., Sławińska U., Wilczyński G. i Rędownicz M.J. (2013) *Myosin VI in skeletal muscle: its distribution in the sarcomere, neuromuscular junction and muscle nuclei.* „Histochem. Cell Biol.”, **139**: 873-885

Kleveta G., Borzęcka K., Zdioruk M., Czerkies M., Kuberczyk H., Sybirna N., Sobota A. i Kwiatkowska K. (2012) *LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility.* „Histochem Cell Biol.”, **139**: 873-885

Korwek Z., Sewastianik T., Bielak-Zmijewska A., Mosieniak G., Alster O., Moreno-Villaneuva M., Burkle A. i Sikora E. (2012) *Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells.* „DNA Repair”, **11(11)**: 864-873

Michaluk P., Wawrzyniak M., Alot P., Szczot M., Wyrembek P., Mercik K., Medvedev N., Wilczek E., DeRoo M., Zuschratter W., Muller D., Wilczynski G.M., Mozrzymas J.W., Stewart M.G., Kaczmarek L. i Włodarczyk J. (2011) *Influence of matrix metalloproteinase, MMP-9 on dendritic spine morphology.* „J. Cell Sci.”, **124**: 3369-3380

Samluk Ł., Czeredys M., Skowronek K. i Nałęcz K.A. (2012) *Protein kinase C regulates amino acid transporter ATB(0,+).* „Biochem. Biophys. Res. Commun.”, **422**: 64-69

Sharma N., Bryant J., Wloga D., Donaldson R., Davis R.C., Jerka-Dziadosz M. i Gaertig J. (2007) *Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia.* „J. Cell Biol.”, **178**: 1065-1079

Skalska J., Piwońska M., Wyroba E., Surmacz L., Wiczorek R., Koszela-Piotrowska I., Zielińska J., Bednarczyk P., Dołowy K., Wilczynski G.M., Szewczyk A. i Kunz W.S. (2008) *A novel potassium channel in skeletal muscle mitochondria.* „Biochim. Biophys. Acta”, **1777**: 651-659

Skalska J., Bednarczyk P., Piwońska M., Kulawiak B., Wilczynski G., Dołowy K., Kudin A.P., Kunz W.S. i Szewczyk A. (2009) *Calcium ions regulate K(+) uptake into brain mitochondria: The evidence for a novel potassium channel.* „Int. J. Mol. Sci.”, **10(3)**: 1104-1120

Szymańska E., Korzeniowski M., Raynal P., Sobota A. i Kwiatkowska K. (2009) *Contribution of PIP-5kinase Ia to raft-based FcγRIIA signaling*. „Exp. Cell Res.”, **315**: 981-995

Walczak A., Szczepankiewicz A.A., Ruszczycki B., Magalska A., Zamlynska K., Dzwonek J., Wilczek E., Zybura-Broda K., Rylski M., Dabrowski M., Szczepinska T., Pawlowski K., Pyskaty M., Włodarczyk J., Malinowska M., Szczerbal I., Switonski M., Cremer M., Wilczynski G.M. (2013) *Novel higher-order epigenetic regulation of Bdnf gene upon seizures*. „J. Neurosci.”, **33**: 2507-2511

Wilczynski G.M., Konopacki F.A., Wilczek E., Lasińska Z., Gorlewicz A., Michaluk P., Wawrzyniak M., Malinowska M., Olkusiński P., Kolodziej L.R., Konopka W., Duniec K., Mioduszevska B., Nikolaev E., Walczak A., Owczarek D., Gorecki D.C., Zuschratter W., Ottersen O.P. i Kaczmarek L. (2008) *Important role of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in epileptogenesis*. „J. Cell Biol.”, **180**: 1021-1035

Wojewoda M., Duszyński J. i Szczepanowska J. (2011) *NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation*. „Int. J. Bioch. Cell Biol.”, **43**: 1178-1186

Cytometria przepływowa w Instytucie Nenckiego – Katarzyna Piwocka

Cytometria przepływowa – trochę historii i współczesność

Cytometria przepływowa to technika umożliwiająca ocenę różnych parametrów zarówno w żywej jak i utrwalonej pojedynczej komórce. Zasada pomiaru jest analiza rozproszenia światła oraz fluorescencji komórek przepływających jedna za drugą w laminarnym strumieniu cieczy przez system detektorów, która swoje początki ma w latach trzydziestych XX wieku, kiedy to Andrew Moldavian opisał urządzenie służące do pomiaru krwinek płynących przez kapilarę umieszczoną na stoliku mikroskopu a tym samym przedstawił pierwszą teoretyczną koncepcję urządzenia (Moldavian A. 1934). Przez kolejne lata, dzięki pojawiającym się rozwiązaniom dotyczącym regulacji przepływu komórek, pomiaru sygnału i mikroskopii fluorescencyjnej i spektrofotometrii, technologia ta rozwijała się doprowadzając do powstania pierwszego cytometru przepływowego. W 1972 roku wprowadzono nazwę FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) dla określenia technologii sortowania komórek na podstawie ich fluorescencji a sześć lat później uznano termin „cytometria przepływowa” jako generalną nazwę tej techniki. Początkowo cytometry zawierały jeden laser, najczęściej było to laser emitujący światło o długości fali 488 nm. Podstawowymi aplikacjami, do których początkowo wykorzystywana była cytometria przepływowa, była ocena receptorów powierzchniowych komórek układu immunologicznego (immunofenotypowanie), oraz analiza zawartości DNA w komórkach wybarwionych barwnikami wiążącymi się stechiometrycznie z łańcuchem DNA. Jednocześnie intensywnie rozwijały się badania komórek ulegających apoptozie, czyli programowanej śmierci komórkowej (Kerr J. F i inn. 1972). Odmianą cytometru przepływowego jest sorter komórkowy, który potrafi nie tylko zbierać i analizować dane dotyczące przepływających przez system komórek, ale

także wysortować określone subpopulacje komórkowe, z bardzo wysoką wydajnością i czystością umożliwiającą dalsze badanie lub hodowle uzyskanych populacji komórek. Dzięki temu wykorzystywany jest w badaniach rzadkich populacji komórek, na przykład komórek macierzystych.

Wraz ze zwiększeniem dostępnych fluorochromów oraz z rozwojem technologii optycznych, pojawiła się możliwość tworzenia cytometrów wielolaserowych, a co za tym idzie detekcji wielu parametrów w jednej komórce jednocześnie. Cytometria wieloparametrowa zwiększyła znacznie wykorzystanie tej metodologii w badaniach biologii komórki. Unikalna cecha, jaką jest możliwość jednoczesnego pomiaru wielu parametrów w jednej komórce dała nieograniczone niemal możliwości analityczne i poznawcze.

Obecnie metody cytometryczne wykorzystywane są w badaniach różnych parametrów związanych z funkcją i biologią komórki takich jak: przeżywalność, różne parametry apoptozy, uszkodzenia DNA, dystrybucja cyklu komórkowego, synteza DNA, immunocytochemiczne oznaczenia poziomu białek wewnątrzkomórkowych jak i powierzchniowych, immunofenotypowanie komórek układu immunologicznego. Przykładowe zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach apoptozy przedstawiono na **Fig. 1**. Dużo dostępnych sond fluorescencyjnych pozwala na pomiar aktywnych procesów, zachodzących w żywej komórce. Przykładem jest pomiar produkcji różnego typu reaktywnych form tlenu, w tym specyficzny pomiar produkcji nadlenku wodoru (**Fig. 2**). Inne dostępne obecnie sondy umożliwiają pomiar poziomu jonów wapnia, potencjału błony mitochondrialnej, pH, aktywności różnych enzymów. Osobną kategorię stanowią badania oparte na metodach, które nie były pierwotnie dedykowane cytometrii, ale zostały przemodyfikowane na jej potrzeby, np. badania z wykorzystaniem technologii FRET.

Pracownia Cytometrii w Instytucie Nenckiego

Pierwsze badania z wykorzystaniem cytometrii w Instytucie Nenckiego pojawiły się w latach 90-tych i dotyczyły analizy poszczególnych subpopulacji komórek układu odpornościowego, analizy cyklu komórkowego i apoptozy oraz procesu starzenia komórkowego (Sikora E. i inn. 1997, Radziszewska E. i inn. 1999, Jaruga E. i inn. 2000, Piwocka K. i inn. 2001). Prowadzone były początkowo we współpracy z innymi jednostkami, m. in. Instytutem Leków w Warszawie, który posiadał cytometr przepływowy. Pierwszy cytometr – FACSCalibur firmy Becton Dickinson pojawił się w Instytucie w 2000 roku w zespole kierowanym przez prof. Ewę Sikorę. Z biegiem czasu i rozwojem możliwości, jakie niesie cytometria, wykorzystanie tej techniki stało się coraz powszechniejsze. Jednocześnie, coraz więcej naukowców z innych jednostek korzystało z naszej pomocy. Stało się jasne, że konieczne jest wydzielenie osobnej jednostki o charakterze środowiskowym, która dzięki zatrudnieniu wysokiej klasy specjalistów, zapewniłaby zarówno fachowy serwis i pomoc, zadbała o bazę sprzętową jak i umożliwiła prowadzenie szerszej zakrojonych badań naukowych z wykorzystaniem technik cytometrycznych. W czerwcu 2010 roku powstała w Instytucie Pracownia Cytometrii pod kierownictwem dr Katarzyny Piwockiej. Pracownia początkowo dysponowała cytometrem przepływowym BD FACSCalibur (**Fig. 3A**) oraz trzy-laserowym sorterem komórkowym BD

FACSaria (**Fig. 3B**), oba z firmy Becton Dickinson. Ze względu na duże zainteresowanie, wiek sprzętu i chęć zwiększenia oferty prowadzonych badań, rozpoczęliśmy intensywne starania o zdobycie funduszy na nową aparaturę. W 2011 roku uzyskaliśmy grant Funduszu Nauki i Technologii Polskiej na stworzenie Stanowiska do Analizy Cytometrycznej. Dzięki temu Pracownia wzbogaciła się o nowy, najnowocześniejszy cztero-laserowy analizator LSR Fortessa (**Fig. 3C**) oraz własną hodowlę komórkową. Takie wyposażenie umożliwia prowadzenie wszelkich badań i analiz bez żadnych ograniczeń technicznych. Od tego momentu Pracownia rozwinięła intensywną działalność opartą na współpracach z innymi zespołami w Instytucie, innymi instytutami i uczelniami, krajowymi i zagranicznymi (Książek K. I. i inn. 2006, Koziel R. i inn. 2010, Mikuła-Pietrasik J. i inn. 2012) oraz działalność komercyjną. Kolejnym aparatem, który wzbogacił sprzętowo Pracownię Cytometrii był przepływowy cytometr kapilarny Guava EasyCyte, który kupiony został w ramach grantu 7 Programu Ramowego EU BioImagine realizowanego w Instytucie. Ten cytometr dedykowany jest do głównie do przesiewowych badań apoptozy i cytotoxycywności i umożliwia stworzenie oferty dla firm biofarmaceutycznych lub innych jednostek prowadzących badania o charakterze przedklinicznym. Naszym celem jest też tworzenie nowych narzędzi badawczych i wprowadzanie nowych rozwiązań o charakterze aplikacyjnym. Część z tych prac dotyczy modyfikacji i ulepszania metod izolacji i sortowania komórek progenitorowych z różnych tkanek. Jednocześnie, Pracownia Cytometrii, wykorzystując między innymi metody cytometryczne, prowadzi własny program badań koncentrujący się wokół poznania zagadnień związanych z molekularnymi mechanizmami odgrywającymi rolę w rozwoju białaczek oraz nabywaniu oporności na terapię (Wolanin K. i inn. 2006, 2010; Kusio-Kobialka M. i inn. 2012a, b). Badania te prowadzone są we współpracy z partnerami zagranicznymi i finansowane w ramach różnych grantów badawczych.

Pracownicy Pracowni Cytometrii włączają się też istotnie w działania o charakterze dydaktycznym i edukacyjnym. Prowadzimy coroczne kursy cytometrii dla studentów studium doktoranckiego Instytutu, dla studentów Studium Medycyny Molekularnej oraz innych zainteresowanych. Organizujemy pokazy sprzętu oraz inne wydarzenia o charakterze naukowym, w części z nich biorą udział międzynarodowi eksperci. Organizujemy także praktyki dla stypendystów Krajowego Funduszu na Rzecz Dzieci i staże naukowe dla studentów różnych uczelni.

Nasze działania mają na celu stworzenie pracowni środowiskowej o dużej renomie i rozpoznawalności. Obecnie wielu naukowców z różnych ośrodków zwraca się do nas z propozycją współpracy w ramach realizowanych lub składanych grantów. Nasze działania są silnie wspierane przez międzynarodowe towarzystwo naukowe ISAC (International Society for Advancement of Cytometry), którego stypendystką jest dr Piwocka (ISAC Scholar Fellow 2012-2016). W ciągu dwóch lat swojej działalności Pracownia Cytometrii stała się doskonale wyposażoną jednostką, rozwinięła swoje możliwości i ekspertyzę, nawiązała liczne kontakty naukowe i obecnie posiada bardzo duży potencjał, który zamierzamy wykorzystać w kolejnych latach.

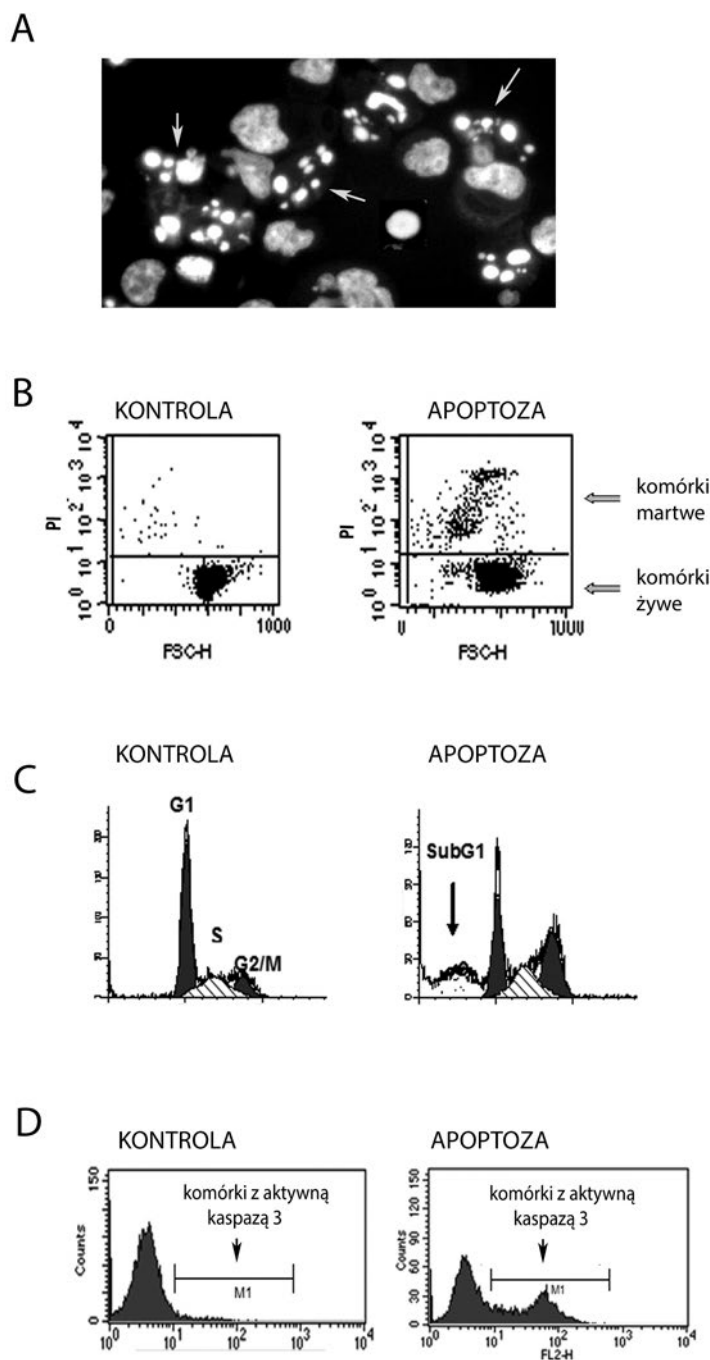


Fig. 1 A-D Detekcja komórek apoptotycznych z wykorzystaniem technik cytometrycznych. **A.** – morfologia jądra komórkowego komórek ulegających apoptozie, strzałki wskazują typową dla apoptozy fragmentację jąder komórkowych i powstawanie tzw. ciałek apoptotycznych. Komórki po utrwaleniu w etanolu barwiono barwnikiem Hoechst 33258. **B.** – pomiar przeżywalności z wykorzystaniem testu wyłączenia jodku propidyny (PI). Zaznaczono komórki żywe, które aktywnie wypompowują barwnik i mają niską fluorescencję, oraz komórki martwe z uprzuszczalną błoną komórkową, zabarwione na czerwono. **C.** – detekcja tzw. populacji SubG1, czyli komórek apoptotycznych z pofragmentowanym DNA; zaznaczono fazy G1, S i G2/M cyklu komórkowego oraz SubG1. **D.** – detekcja komórek apoptotycznych z aktywną kaspazą 3, z wykorzystaniem przeciwciała sprzężonego z fluorochromem, rozpoznającego tylko aktywną formę kaspazy 3. Zaznaczono frakcję komórek charakteryzujących się podwyższoną fluorescencją, czyli obecnością aktywnej kaspazy 3.

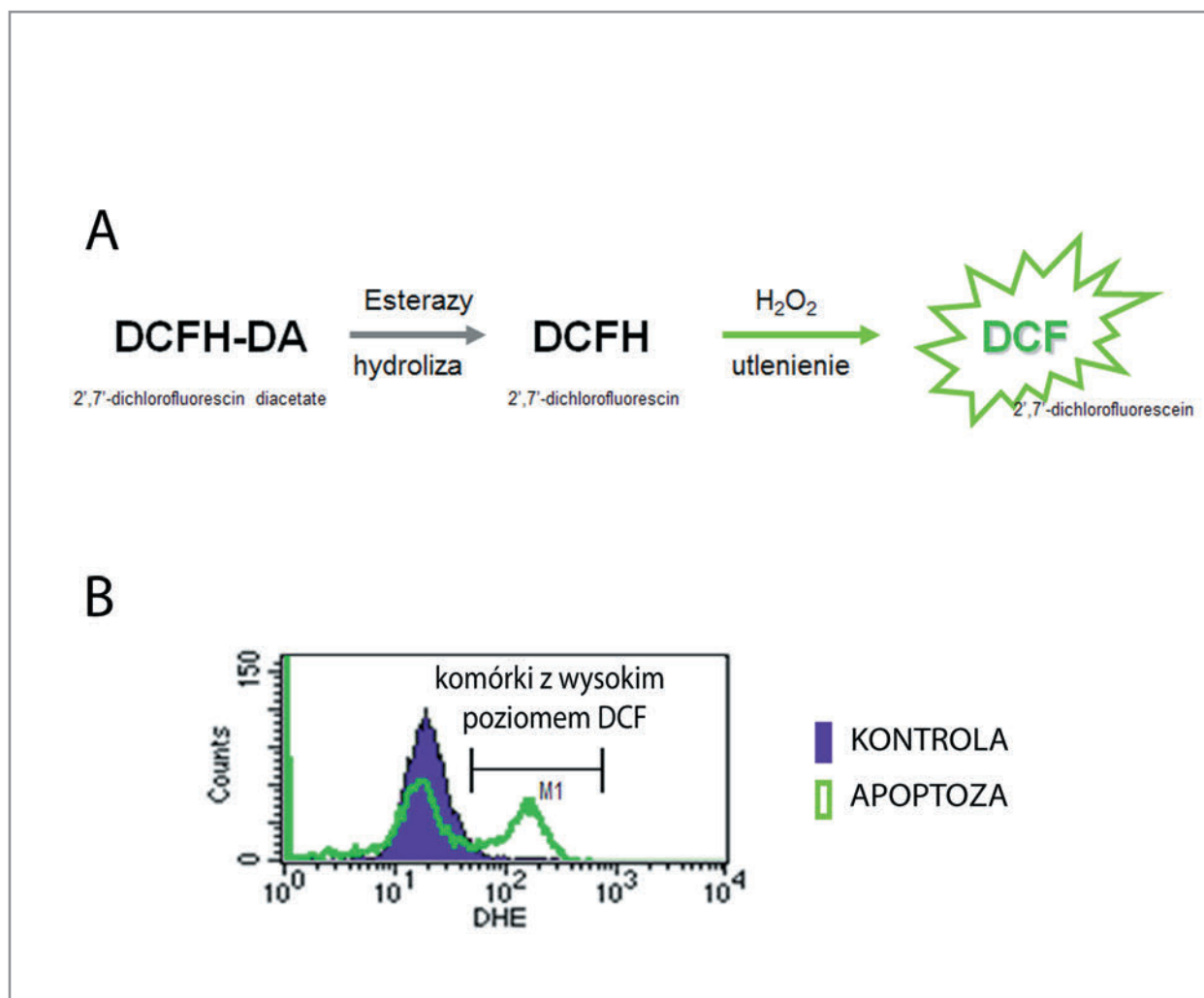


Fig. 2 Detekcja produkcji H₂O₂ w żywych komórkach z wykorzystaniem przyżyciowej sondy DCFH-DA.

A, schemat pomiaru H₂O₂ z wykorzystaniem sondy DCFH-DA, która po wejściu do komórek na zasadzie dyfuzji ulega hydrolizie, a po utlenieniu przekształcana jest we fluorescencyjny związek DCF (dichlorofluoresceinę), który jest mierzony z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. **B**, pomiar produkcji H₂O₂ w komórkach kontrolnych i apoptotycznych, zaznaczono frakcję komórek apoptotycznych z podwyższonym poziomem H₂O₂.

A



B



C



Fig. 3 A-C Część urządzeń stanowiących wyposażenie Pracowni Cytometrii Instytutu Nencykiego. **A** – cytometr przepływowy BDS FACSCalibur, wyposażony w laser 488 nm i czerwoną diodę 635 nm. **B** – analizator BD LSR Fortessa wyposażony w lasery 355 nm, 405 nm, 488 nm i 635 nm. **C** – sorter komórkowy BD FACSria wyposażony w lasery 405 nm i 488 nm oraz lampę UV. Fot. Katarzyna Piwocka.

Piśmiennictwo

Jaruga E., Skierski J., Radziszewska E. i Sikora E. (2000) *Replicative senescence of interleukin-2-dependent human T lymphocytes. Flow cytometric characteristics of phenotype changes.* „Ann. N. Y. Acad. Sci.”, **908**: 310-314

Kerr J.F., Wyllie A.H. i Currie A.R. (1972) *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* „Br. J. Cancer.”, **26(4)**: 239-257

Koziel R., Szczepanowska J., Magalska A., Piwocka K., Duszyński J. i Zablocki K. (2010) *Ciprofloxacin inhibits proliferation and promotes generation of aneuploidy in Jurkat cells.* „J. Physiol. Pharmacol.”, **61(2)**: 233-239

Książek K., Piwocka K., Brzezińska A., Sikora E., Zabel M., Breborowicz A., Jörres A. i Witowski J. (2006) *Early loss of proliferative potential of human peritoneal mesothelial cells in culture: the role of p16INK4a-mediated premature senescence.* „J. Appl. Physiol.”, **100(3)**: 988-995

Kusio-Kobialka M., Wolanin K., Podrzywałow-Bartnicka P., Sikora E., Skowronek K., McKenna S. L., Ghizzoni M., Dekker F. J. i Piwocka K. (2012a) *Increased acetylation of lysine 317/320 of p53 caused by BCR-ABL protects from cytoplasmic translocation of p53 and mitochondria-dependent apoptosis in response to DNA damage.* „Apoptosis”, **17(9)**: 950-963

Kusio-Kobialka M., Podrzywałow-Bartnicka P., Peidis P., Glodkowska-Mrowka E., Wolanin K., Leszak G., Seferyńska I., Stokłosa T., Koromilas A. E. i Piwocka K. (2012b) *The PERK-eIF2 α phosphorylation arm is a pro-survival pathway of BCR-ABL signaling and confers resistance to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia cells.* „Cell Cycle”, **11(21)**: 4069-4078

Mikuła-Pietrasik J., Kuczmarska A., Rubiś B., Filas V., Murias M., Zieliński P., Piwocka K. i Książek K. (2012) *Resveratrol delays replicative senescence of human mesothelial cells via mobilization of antioxidative and DNA repair mechanisms.* „Free Radic. Biol. Med.”, **52(11-12)**: 2234-2245

Moldavian A. (1934) *Photo-electric technique for the counting of microscopical cells.* „Science”, **80**:188-189

O'Sullivan-Coyne G., O'Sullivan G. C., O'Donovan T. R., Piwocka K. i McKenna S. L. (2009) *Curcumin induces apoptosis-independent death in oesophageal cancer cells.* „Br J. Cancer.”, **101(9)**:1585-1595

Piwocka K., Jaruga E., Skierski J., Gradzka I. i Sikora E. (2001) *Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in Jurkat cells.* „Free Radic. Biol. Med.”, **31(5)**: 670-678

Radziszewska E., Piwocka K., Skierski J. i Sikora E. (1999) *UVC-induced cell death of IL-2-dependent human lymphocytes.* „Cell Biol Int.”, **23(2)**: 97-103

Sikora E., Bielak-Zmijewska A., Piwocka K., Skierski J. i Radziszewska E. (1997) *Inhibition of proliferation and apoptosis of human and rat T lymphocytes by curcumin, a curry pigment.* „Biochem. Pharmacol.”, **54(8)**: 899-907

Wolanin K., Magalska A., Mosieniak G., Klinger R., McKenna S., Vejda S., Sikora E. i Piwocka K. (2006) *Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells.* „Mol Cancer Res.”, **4(7)**: 457-469

Wolanin K., Magalska A., Kusio-Kobialka M., Podrzywałow-Bartnicka P., Vejda S., McKenna S. L., Mosieniak G., Sikora E. i Piwocka K. (2010) *Expression of oncogenic kinase Bcr-Abl impairs mitotic checkpoint and promotes aberrant divisions and resistance to microtubule-targeting agents.* „Mol. Cancer. Ther.”, **9(5)**: 1328-1338

Laserowa Cytometria Skaningowa – Joanna Szczepanowska

Laserowa Cytometria Skaningowa (LSC) jest techniką pozwalającą na szybką i obiektywną analizę ilościową i jakościową zdarzeń zachodzących w komórkach żyjących i utrwalonych. Laserowy Cytometr Skaningowy typu *iCys* automatycznie selekcjonuje, wizualizuje i analizuje próbę. W przeciwieństwie do znanej metody cytometrii przepływowej, technika cytometrii skaningowej pozwala na badanie materiału biologicznego przylegającego do podłoża (np. komórki, skrawki tkanek). Dlatego przy pomocy cytometrii skaningowej można badać i oceniać ilościowo liczne zdarzenia zachodzące w różnych przedziałach komórki np.: w jądrze komórkowym (**Fig. 1**), mitochondriach (**Fig. 4, 5**), w cytoplazmie – np. filamenty aktynowe i mikrotubule (**Fig. 3**). Ponadto, na podstawie analizy obrazu można badać procesy zachodzące w czasie (w żywych komórkach) takie jak: cykl komórkowy, generacja reaktywnych form tlenu (**Fig. 2**) i azotu, zmiany poziomu jonów wapnia (**Fig. 2**), potencjał elektryczny na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, pojawianie się uszkodzeń DNA w jądrze komórkowym (**Fig. 1**) oraz przebudowa cytoszkieletu.

Aparat LSC typu *iCys* wyposażony jest w 3 lasery, co sprawia, że prace badawcze można prowadzić z użyciem szerokiego wachlarza znaczników fluorescencyjnych, a tym samym analizować równolegle różne procesy i zdarzenia zachodzące w komórce.

Takie podejście metodyczne pozwala na dogłębne zrozumienie szerokiego spektrum dziedzin biomedycyny, w tym biologii nowotworów, badań nad komórkami macierzystymi, chorób zakaźnych oraz takich zagadnień jak apoptoza, starzenie, regulacja transkrypcji, przekaźnictwo sygnałowe, regulacja receptorów błony komórkowej, regulacja wewnątrzkomórkowych kanałów jonowych, neurobiologia, bioenergetyka mitochondriów i regulacja metabolizmu.

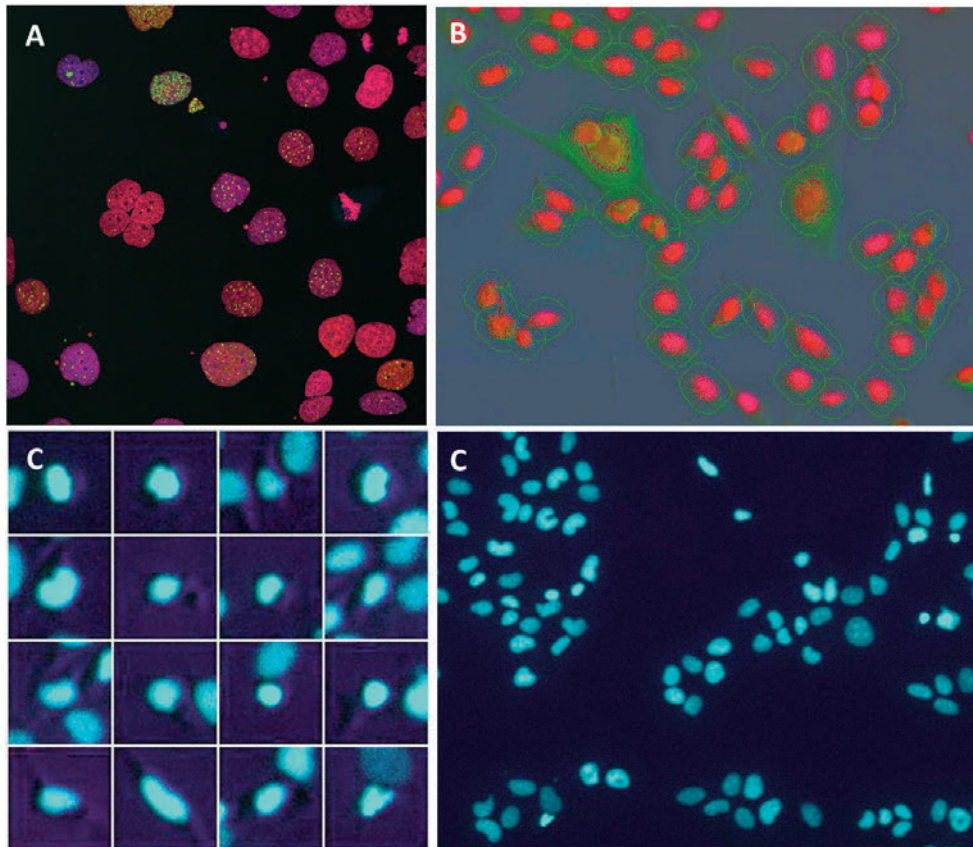


Fig. 1 A-C Jądra komórkowe, komórki osteosarkoma 143B. **A.** Wyznakowane podwójne pęknięcia DNA, za pomocą odpowiednich przeciwciał (kolor zielony lub żółty). Obraz otrzymany w mikroskopie konfokalnym. **B.** Metoda zaznaczania analizowanego zdarzenia w LSC, w tym przypadku jądra komórkowego (kolor czerwony) oraz całej komórki (kolor zielony). Obraz otrzymany w LSC. **C.** Galeria oraz całe pole skanowanego preparatu w LSC. Wyznakowane jądra komórkowe przy pomocy odpowiedniego znacznika fluorescencyjnego. Fot. Joanna Szczepanowska.

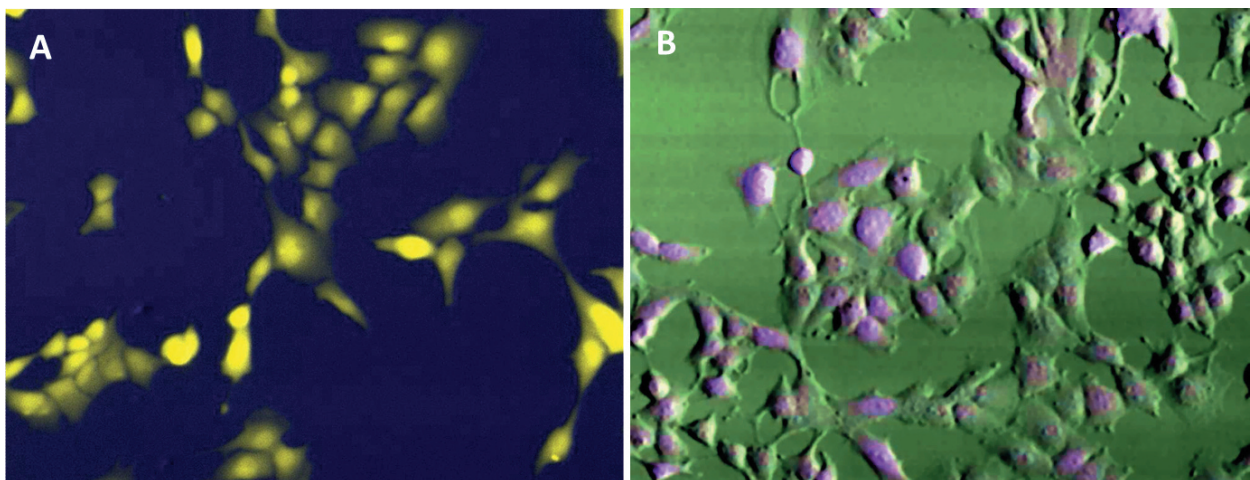


Fig. 2 A-B Przyżyciowe badania wykonane przy pomocy LSC, komórki osteosarkoma 143B (obraz otrzymany w LSC). **A.** Wyznakowane reaktywne formy tlenu przy użyciu znacznika fluorescencyjnego DCF. **B.** Wyznakowany poziom jonów wapnia przy użyciu znacznika fluorescencyjnego (Fluo 4) (kolor amarantowy). Obraz przestrzenny komórek zmodyfikowany wg programu LSC. Fot. Joanna Szczepanowska.

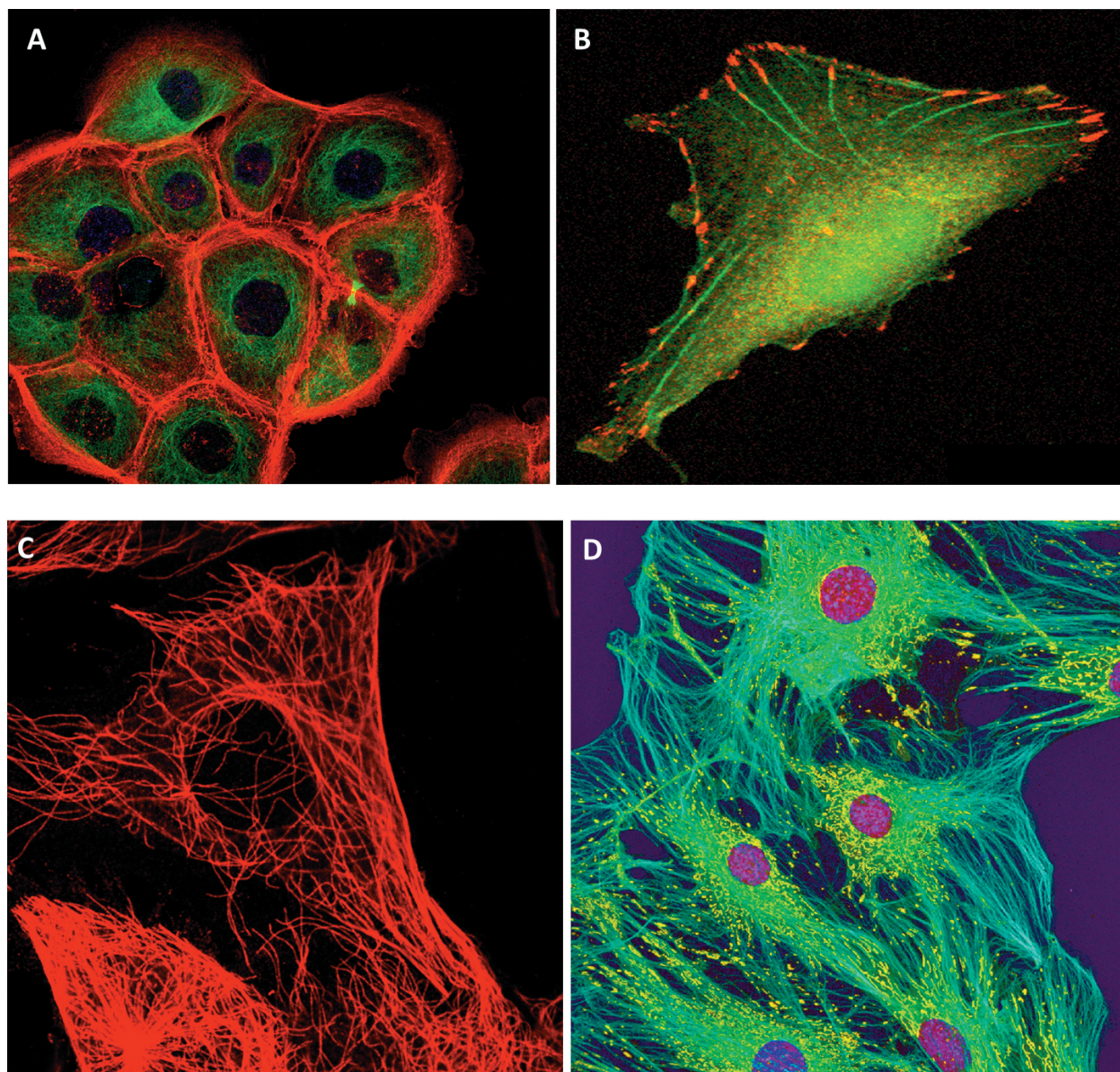


Fig. 3 A-D Morfologia komórki. Przykłady możliwości użycia analizy LSC w preparatach utrwalonych. Obrazy wykonane w mikroskopie konfokalnym. **A.** Obraz komórek nowotworowych (typ HCC1937), wyznakowany cytoszkielet za pomocą znaczników (kolor czerwony – filamety aktynowe, kolor zielony – mikrotubule, kolor niebieski – jądra komórkowe). **B.** Fibroblast ludzki, wyznakowany kompleks przylegania (kolor czerwony – winkulina) oraz cytoszkielet (kolor zielony – filamety aktynowe). **C.** Komórki osteosarkoma 143B, wyznakowane mikrotubule (kolor czerwony). **D.** Komórki – fibroblasty mysie, wyznakowane mikrotubule (kolor niebieski), mitochondria (kolor żółty) i jądra komórkowe (kolor amarantowy). Fot. Joanna Szczepanowska.

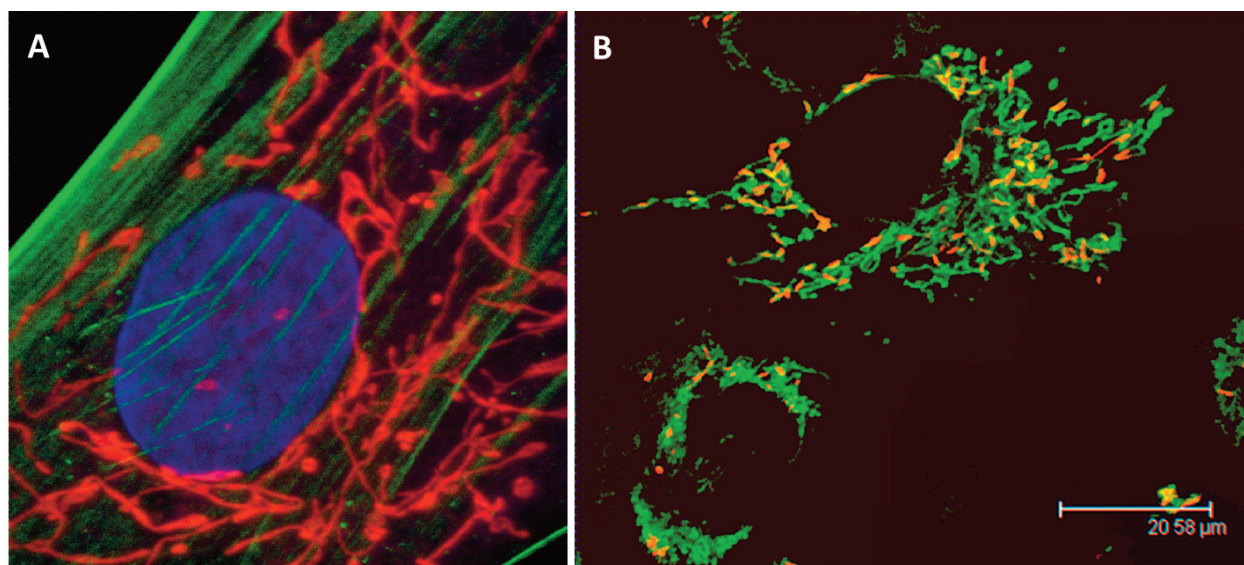


Fig. 4 A-B Mitochondria w komórce. **A.** Fibroblasty ludzkie (kolor czerwony – mitochondria, zielony – filamety aktynowe, niebieski – jądro komórkowe), preparat utrwalony. **B.** Komórki osteosarkoma 143B, (barwienie przyżyciowe mitochondriów znacznikiem JC-1). Fot. Joanna Szczepanowska.

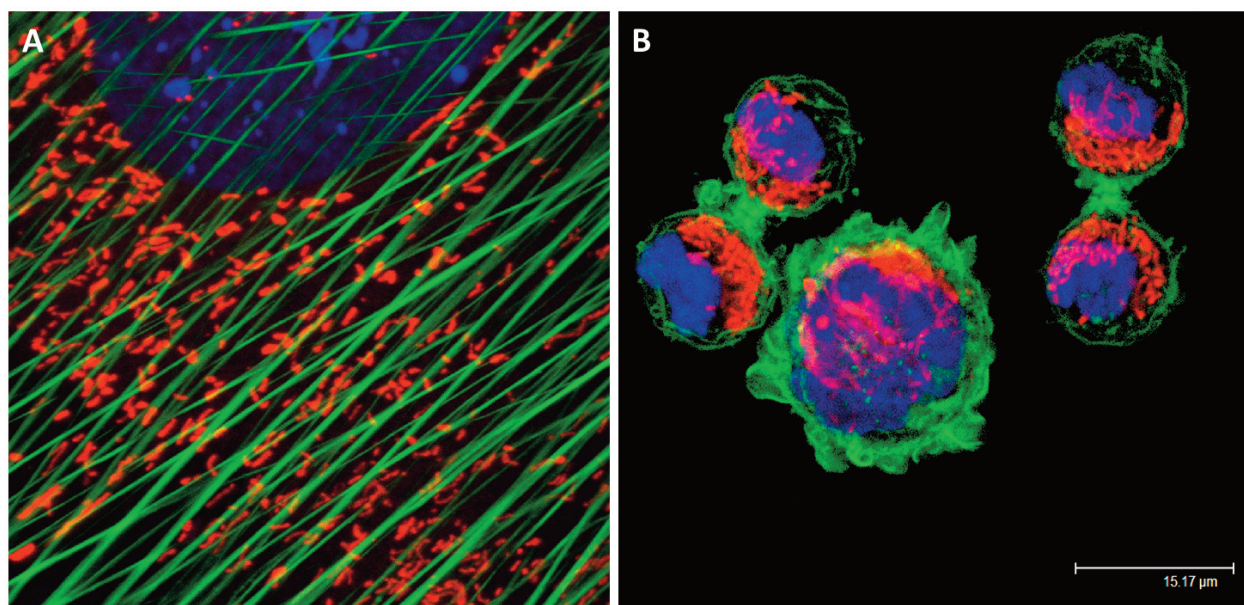


Fig. 5 A-B Mitochondria i cytoszkielet w komórce. **A.** Fibroblasty ludzkie (kolor czerwony - mitochondria, zielony – aktyna). **B.** Limfocyty (kolor czerwony – mitochondria, zielony – aktyna, niebieski – jądra komórkowe). Fot. Joanna Szczepanowska.

Indeks rzeczowy**A**

adhezja do podłoża - 44
 agregaty synuklein 63
 aktyna - 32, 35, 45, 46, 64, 68, 75-78,90, 92,93
Amoeba proteus - 21-25, 44-46
Amoebozoa - 29
 amyloid - 63
 analiza ruchu - 9, 12, 14-22, 25, 26, 60, 65, 73
 analizator BD LSR Fortessa - 85, 88
 aneksyna - 75
 aparat skurczu - 32-36, 38-39, 41
 apoptoza - 74, 83, 84-86, 90
 astrocyty - 57, 64, 65, 67, 69, 71, 74
 atrofia mięśnia - 34, 38-40

B

barwnik DAPI - 64, 66, 69, 70
 barwnik Hoechst 33258 - 86
 barwnik Nissla - 67
 białka prionowe - 63
 białka strukturalne - 64
 białka tau - 75, 82
 błona komórkowa - 24, 27, 28-30, 33, 40, 75, 86

C

Chaos chaos - 22
 chemotaksja - 10
 chemotaksja dodatnia - 10
 ujemna - 10
 choroby neurodegeneracyjne - 62, 63, 73-75, 77
 chromatyna - 58
Codonellosis balechi - 48, 49
 cykl komórkowy - 50, 73, 84, 86, 90
 cyklosporyna A - 65, 74
 cykloza - 14
Cymatocylis affinis/convallaria - 47, 49
Cymatocylis dragalski - 48, 49
 cytokiny - 64-67, 69, 71
 cytometr – FACSAria, Becton Dickinson -85, 87
 cytometr – FACSCalibur, Becton Dickinson - 84, 88
 cytometr kapilarny Guava EasyCyte - 85
 cytometria przepływowa - 62, 65, 83-90
 cytoskielet - 44, 50, 51, 64, 68, 75, 81, 90, 92, 93
 czerwień rutenowa - 27, 29
 część postsynaptyczna synapsy - 52 54
 część presynaptyczna synapsy - 54
 czynniki nekrozy nowotworu alfa - 64

D

dichlorofluoresceina - 87
Diplostomum pseudospathaceum - 44, 46
 dopamina - 67
 dwójłomne kryształy - 14-16
 dwuwartościowe kationy - 10

E

egzocytoza - 29, 73
 ekspresja arginazy 1 (Arg-1) - 65
 ekspresja genów - 50, 64
 elektroforeza - 28
 endocytoza - 27, 28
 endosom - 28, 30
 epilepsja - 73, 74
Euglena gracilis - 20, 21
 eugleny 19-21
 Eukaryota - 27, 28, 31, 32
Excavata - 29

F

fagocytoza - 28, 30
 fagosom - 28
 F-aktyna - 45, 68, 70
 fibroblast - 92, 93
 film - 7, 11, 12, 14, 18, 20, 22, 25, 26
 filmowanie zjawisk ruchowych - 18
 fluorescencyjna mikroskopia konfokalna - 52-60, 71-83
 fosfolipaza C - 27, 29
 fragment Fc immunoglobuliny IgG typu2 - 65
 funkcjonowanie mięśnia - 33, 34

G

gelsoliny - 75, 79
 gen - 27-29, 31, 32, 50, 52, 63, 64, 81, 83
 genom *Paramecium* - 27, 50
 glikoproteiny błonowe - 67
 granulocyty - 65
 guz glejaka GL261 - 65, 70, 78
 guzy mózgu - 62, 65

H

hematoksylina - 67
 hipertrofia astrocytów - 64
 homologiczna surowica odpornościowa -14, 16,

I

immobilizacja pierwotniaków - 14
 immunoznakowanie złotem koloidalnym - 27, 28
in vitro - 62, 54-66, 69, 71, 74
in vivo - 62, 66, 71, 72

insulinooporność - 73
inteleukina 1 beta - 64
interferencyjny kontrast fazowy - 11, 13, 23
interferon gamma - 64

J

jądro - 46, 58, 59, 67, 64, 68, 70, 74, 79, 86, 90-92
jednokomórkowe organizmy - 10, 27
jony wapnia - 10, 33, 73, 75, 84, 90, 91

K

kamera filmowa - 18, 22
kanaliki T - 33, 36, 37
kanał pinocytotyczny - 21, 22
kanały jonowe - 63, 74, 90
kancerogeneza - 74
kaspaza - 86
Kinetoplastida - 28
kinezy z grupy Ncd - 14, 60
klatryna - 28, 30
kolce dendrytyczne - 52-54, 63, 73, 74, 77
komórki dendrytyczne - 65
komórki glejowe - 56, 57, 62, 64, 66, 68
komórki monocytarne szpiku - 62
komórki osteosarkoma - 91-93
komórki supresorowe - 65
komórki tuczne - 65
komputer Silicon Graphics Personal Iris - 44
kontrast interferencyjno-fazowy - 11, 13

L

larwy chruścików 5, 8, 9
laserowa cytometria skaningowa - 64, 90-93
laserowy cytometr skaningowy typu *iCys* - 90
laserowy mikroskop konfokalny - 4,5,43-46, 53-59, 70-83, 91, 92
lektyna B4 - 64
leukocyty - 62
limfocyty - 79, 93
linia M, - 33, 35, 36, 39
linia Z - 33, 35, 36, 41
lipopolisacharyd A - 64, 68
lorika - 47-49

M

makrofagi - 62, 65, 70
makrofotograficzna rejestracja - 9, 10, 25
makropinocytoza - 21, 22
metabolizacja - 19, 90
metaloproteazy (MMP) - 73, 74
metoda rejestracji ruchu rzęsek - 11-13
metoda TUNEL - 64, 69
metody immobilizacji orzęsków - 14, 15
metyloceluloza 11-13
mięsień podudzia szczura - 35-42

mięsień prążkowany - 32, 33
mikroglej - 57, 62-71, 74, 78
mikroskop elektronowy - 7, 34, 36, 49, 59
mikroskop fluorescencyjny - 60, 61, 68, 71
mikroskop holograficzny Holmin - 25-26
mikroskop interferencyjno-dyferencyjny - 20
mikroskop interferencyjno-polarizacyjny - 14, 16
mikroskop konfokalny - 43-46, 53-59, 70-73, 91, 92
mikroskop z kontrastem interferencyjno-polarizacyjnym - 12
mikroskop z kontrastem interferencyjno-dyferencyjnym - 21
mikroskopia - 5, 7, 27, 28, 30-32, 34, 44, 47, 48, 50-56, 60-62, 70, 83
mikroskopia całkowitego wewnętrznego odbicia TIRF - 60-61
mikroskopia konfokalna (Leica TCS SP5) - 27, 28, 30, 31, 51-55, 71-83
mikroskopia świetlna - 7, 32, 38, 52, 53, 55 56, 62, 68, 70, 75
mikrotubule - 60, 61, 77, 81, 90, 92
mioblasty - 78
miofibryle - 33, 35-37, 39, 40
miofilamenty cienkie - 32
miofilamenty grube - 32, 35, 39
miozyna 32, 34
mitochondria - 29, 35, 36, 40, 74, 78, 82, 83, 89, 90, 92, 93
mitochondrialne kanały potasowe - 74
modele glicerynowanych ameb - 22-24
modele neurodegeneracji - 62, 63
Molanna angustata - 7-9
monocyty - 62, 65
morfologia komórek mikrogleju - 62, 63, 65, 57, 68
motoneurony - 33, 34
mózg, - 52, 57, 62-67, 69, 70, 72, 74, 76
mózg szczura transgenicznego - 76
mutant janus (BC) - 51
mysz - 42, 62, 63, 65, 70, 77, 78, 92

N

neurony - 33, 34, 52, 53, 58, 59, 63, 66, 67, 72, 74, 77, 82
nowotwór - 64, 65, 74, 90, 92

O

obrazowanie histonu - 59
odnerwienie - 34, 38, 39, 40, 41
określony ruch cytoplazmy - 14
organelle - 29, 33, 50, 53, 74, 75

P

Parafavella denticulata - 49
Parafuzyna - 29

- Paramecium* - 7, 9-18, 27-32, 50, 52, 75
Paramecium aurelia - 14, 16-18, 32
Paramecium bursaria - 14, 15
Paramecium caudatum - 9, 10, 18
Paramecium multimicronucleatum - 11-13
Paramecium octaurelia - 28, 29
Paramecium tetraurelia - 52, 75
Paraurostyła weissei - 50, 51
 PCR w czasie rzeczywistym RT-PCR - 28
 pęcherzyki pinocytotyczne - 21
 pęknięcie nici DNA - 75, 79, 91
Physarum polycephalum - 25-26
 pierwotniaki - 5, 7, 9, 11-14, 19, 20, 22, 24, 44, 47, 50, 51
 pinocytoza - 21
 płaszczyna Z - 33, 36, 41
 pływanie pierwotniaków - 11, 13
 pobudliwość - 18
 pole magnetyczne - 15, 17
 polimorficzne gatunki - 47
 Polska Stacja Antarktyczna
 im. Arctowskiego - 47
 postać ameboidalna - 64, 65, 68, 70
 postsynaptyczna część synapsy - 52, 54
 Pracownia Białek Motorycznych - 60
 Pracownia Białek Wiążących Wapń - 75
 Pracownia Biochemii Lipidów - 75, 79
 Pracownia Bioenergetyki i Błón
 Biologicznych - 74, 78
 Pracownia Biofizyki Komórki - 74, 77
 Pracownia Fizjologii Błony Komórkowej - 29
 Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych - 18, 19, 22, 25, 47
 Pracownia Mikroskopii Konfokalnej - 71-83
 Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych - 73, 75, 77, 80
 Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia - 75, 79
 Pracownia Neurobiologii - 54, 72, 74, 76
 Pracownia Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej - 74
 Pracownia Procesów Transportu w Błonach Biologicznych - 74
 Pracownia Receptorów Błony Komórkowej - 75
 Pracownia Regeneracji i Morfogenezy Pierwotniaków - 50, 51, 75, 81
 Pracownia Regulacji Transkrypcji - 65, 74, 78
 Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych - 74
 procesy morfogenetyczne - 50
 procesy pamięci i uczenia - 52, 53, 73
 programowana śmierć komórek - 73
 proliferacja astrocytów - 64
 przeciwciała - 28, 30, 31, 50, 51, 52, 59, 61, 63, 64, 67, 69, 70, 81, 86, 91
- R**
- Rab7 - 27-32
 Rab9 - 29, 31
 regeneracja - 50, 51, 54, 81
 rodamina - 68
 rozeta pinocytotyczna - 22
 roztwór chlorku niklu - 14, 15
 RT PCR - 28
 ruch cytoplazmy - 14-18, 22, 25
 ruchy euglenoidalne - 19, 20
 rzęski - 11-13, 29, 50, 81
- S**
- sarkolemma - 33, 40, 41
 sarkomer - 33, 35, 41,
 siateczka sarkoplazmatyczna - 33, 35, 37
 skaner rezonansowy - 71, 73
 sonda DCFH-DA - 87
 struktury glikokaliksu - 27
 strumień cytoplazmatyczny - 14-16
 synapsy - 52-54, 56, 59, 63, 73, 73, 80
 szczur - 35-41, 56, 57, 68, 70, 76, 77, 80
- Ś**
- śluzowiec - 9, 25, 26
 światło spolaryzowane - 14-16
- T**
- taksje pierwotniaków - 5, 9, 10
 technika FLIM - 73
 technika FRAP - 73
 technika FRET - 73, 84
Tetrahymena - 50-52, 75, 80, 81
Tintinnina - 47-49
Tintinnopsis lobiancoi - 48
 transport wewnątrzkomórkowy - 29, 73, 75
Trypanosoma cruzi - 28, 31
 tubulina - 31, 61, 75, 81, 82
- U**
- układ rzęskowy - 50
 ultrastruktura mięśnia - 32-42
 unerwienie po re-innerwacji - 34, 39-41
- W**
- wici - 11, 19, 20
 włókna mięśniowe - 33, 36-38, 40-42
 wodniczki pokarmowe - 14, 15, 17

ISBN: 978-83-927972-5-8

