

PL ISSN 0324 - 833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 14 - NR 1
1987 (1-48)

Postępy Biologii Komórki

Handwritten signature

PWN WARSZAWA-WROCŁAW
<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Maciej KAWALEC — sekretarz

Rada Redakcyjna

Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA,
Leszek KUŹNICKI, Zofia OSUCHOWSKA — przewodnicząca,
Aleksandra PRZEŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocławski

Nakład 566 + 94 egz. Ark. wyd. 3,5. Ark. druk. 3 + wkł. roczna. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania 13 XI 1986 r. Podpisano do druku I VI 1987 r. Druk ukończono w czerwcu 1987 r. Zam. 1564/86. Cena 140 zł

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

METODY EMBRIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ I HYBRYDYZACJI
SOMATYCZNEJ W OTRZYMYWANIU MIESZAŃCÓW
MIĘDZYGATUNKOWYCH U ROŚLIN

EXPERIMENTAL EMBRYOLOGY AND SOMATIC HYBRIDIZATION IN OBTAINING
THE INTERSPECIFIC PLANT HYBRIDS

Ewa BARTKOWIAK

Biuletyn Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Streszczenie. Omówiono bariery międzygatunkowe u roślin wyższych oraz metody ich przezwyciężenia. Podano również zestawienie mieszańców otrzymanych poprzez zapłodnienie *in vitro* hodowlę zapylnych zalążków i zarodków oraz łączenie protoplastów.

Summary. The interspecific barriers and methods of their overcoming are discussed. An overview of the hybrids obtained by *in vitro* pollination, ovule and embryo culture as well as fusion of protoplasts is also given.

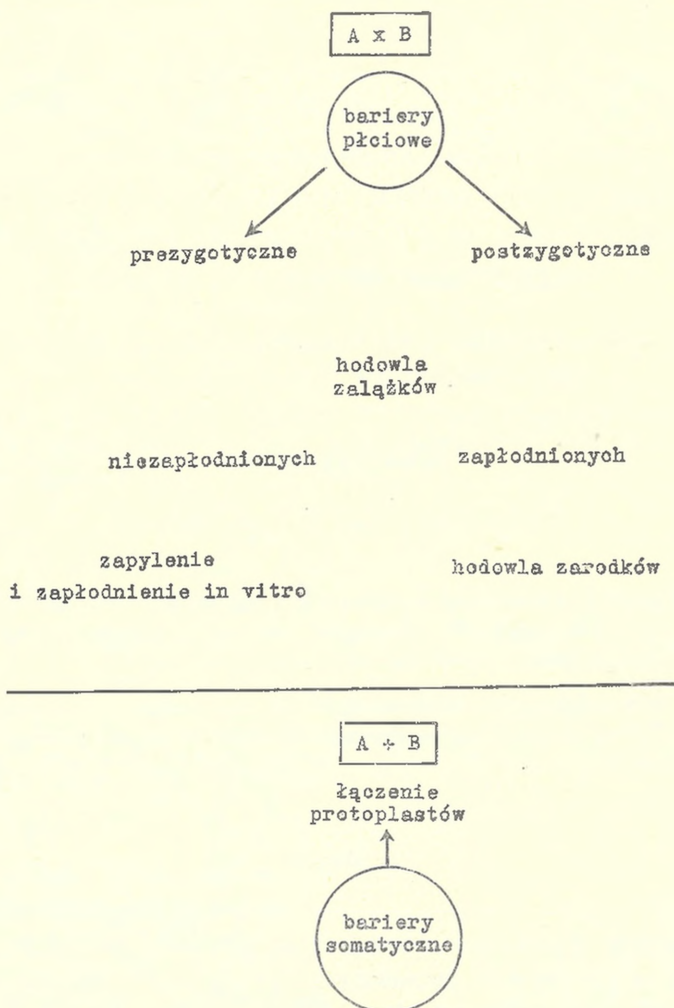
1. WSTĘP

Mieszańcowość istotna jest wszędzie tam, gdzie zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe, czy to ze względów poznawczych, czy dla celów praktycznych jest zbyt małe. Płciowe bariery międzygatunkowe działają na wszystkich etapach rozmnażania, począwszy od kiełkowania pyłku na obcym znamieniu, poprzez wzrost łagiewki pyłkowej, zapłodnienie, rozwój zarodka, rozwój bielma, aż do dojrzewania nasion. Bariery te dzielą się na:

prezygotyczne, nie dopuszczające do zapłodnienia, polegające na niezgodności pyłek-słupek;

postzygotyczne, kiedy zapłodnienie następuje, ale nie dochodzi do pełnego rozwoju zarodka na skutek niezgodności między tkanką zarodka i bielma lub zarodka i tkanki macierzystej.

Bariery międzygatunkowe próbowano od lat pokonać drogą tradycyjnego krzyżowania, które było jednak skuteczne tylko w odniesieniu do gatunków bliżej spokrewnionych filogenetycznie.



Rys. 1. Schemat zestawiający bariery międzygatunkowe i możliwości ich przezwyciężenia

Stopniowy rozwój metod in vitro sprawił, że zaczęto wykorzystywać je do otrzymywania mieszańców. Metody te (rys. 1) można ogólnie dzielić na:

1. hodowlę organów generatywnych, która daje możliwość ominięcia barier pre- lub postzygotycznych poprzez

- zapylenie i załodnienie in vitro,
- izolowanie zalążków,

- izolowanie mieszańcowych zarodków;
- 2. hodowlę komórek somatycznych (łączenie protoplastów), pozwalającą pokonać oba typy barier.

2. EMBRIOLOGIA EKSPERYMENTALNA

2.1. HODOWLA ZARODKÓW

Stosowana jest w przypadkach, kiedy dochodzi do zapłodnienia, natomiast zarodki nie rozwijają się wskutek:

- niedorozwoju bielma i jego niezdolności do spełniania funkcji odżywczych;
- bliżej nie określonej niezgodności między tkanką macierzystą a tkanką mieszańcowego zarodka.

W obu przypadkach następuje degeneracja zarodków. Można temu zapobiec izolując mieszańcowe zarodki na wcześniejszych etapach rozwoju i hodując je w warunkach sztucznych poza tkanką macierzystą. Ważnym aspektem jest tutaj, podobnie jak w dalej omawianych przypadkach, odpowiednie przygotowanie eksperymentalne, które pozwoliłoby na identyfikację barier i wybór obiektów mających szansę pełnego rozwoju *in vitro*. Konieczne jest przede wszystkim wielokrotne krzyżowanie gatunków, i to w obu kierunkach ($\text{♀A} \times \text{♂B}$ i $\text{♀B} \times \text{♂A}$), oraz makroskopowa ocena tego, co można otrzymać najpierw w warunkach *in vivo*. Jeżeli np. przetestuje się kilkanaście kombinacji krzyżówkowych między gatunkami należącymi do tego samego rodzaju, a kilka z nich daje nasiona, nawet nedorozwinięte, to te należy wybrać jako potencjalne obiekty. Następnie można sprecyzować, które z już wybranych mają nasiona największe, czy też najbardziej normalne. Dalszy etap to histologiczne obserwacje mikroskopowe, pozwalające ustalić kiedy i dlaczego następuje zahamowanie rozwoju zarodka. Należy wybrać między kombinacjami krzyżówkowymi, które dają największą liczbę żywotnych zarodków mieszańcowych, a tymi, które doprowadzają do maksymalnie zaawansowanych stadiów rozwoju zarodka. Jest to istotne dlatego, że im starsze zarodki, tym łatwiejsze do wyizolowania, mniej wrażliwe na szok osmotyczny i zmianę warunków z naturalnych na sztuczne; mają też mniejsze wymagania w hodowli *in vitro*. W rozwoju zarodka występują bowiem dwa krytyczne stadia:

heterotroficzne, w którym zarodek jest silnie zależny od bielma (trwa od zapłodnienia do stadium sercowatego);

autotroficzne (od późnego stadium sercowatego), kiedy zarodek jest już w pewnym stopniu samowystarczalny.

Najwcześniejszym więc stadium, w którym można hodować izolowane zarodki poza tkanką macierzystą, jest stadium sercowate. W stadium globularnym, nawet zaawansowanym [41], nie jest to możliwe i z takich kombinacji krzyżówkowych trzeba, przynajmniej w tym przypadku, zrezygnować. Można natomiast przeznaczyć je do hodowli w postaci izolowanych załączków, o czym będzie mowa.

Na podstawie analizy histologicznej ustala się ponadto właściwy moment izolowania zarodków. Jeżeli np. zarodek degeneruje w 14 dni po zapyleniu, a bielmo po 10 dniach, to należy izolować zarodki, zanim nastąpi degeneracja bielma.

Przygotowanie do hodowli *in vitro* powinno w zasadzie polegać na hodowaniu zarodków każdego z gatunków osobno i precyzowaniu warunków, w których osiągną maksymalny stopień rozwoju. Pożywki stosowane w hodowli [41] składają się z kilku elementów: podstawowych soli mineralnych, cukru, jako źródła węgla, i różnych dodatków, takich jak witaminy, hormony i kompleksowe substancje odżywcze. Skład zastosowanej pożywki zależy jest w pewnym stopniu od stadium rozwoju eksplantatu; im starsze zarodki, tym ich wymagania są mniejsze i pożywka może być prostsza. W składzie mineralnym ważne są źródła azotu, który powinien być dostarczony zarówno w postaci azotanów, jak i soli amonowych. W wielu przy-

TABELA 1

Mieszance otrzymane z hodowli niedojrzałych zarodków

Lp.	Gatunki	Literatura
1	<i>Brassica oleracea</i> ⊗ <i>B. campestris</i>	[13, 22]
2	(<i>Glycine tomentella</i> × <i>G. maxima</i>) × <i>G. maxima</i>	[4]
3	<i>Gossypium arboreum</i> × <i>G. anomalum</i>	[34]
4	„ „ × <i>G. australe</i>	[33, 34]
5	„ „ ⊗ <i>G. barbadense</i>	[33, 34]
6	„ „ × <i>G. harknessi</i>	[34]
7	„ „ ⊗ <i>G. hirsutum</i>	[33, 34]
8	„ „ × <i>G. longicalyx</i>	[34]
9	„ „ × <i>G. nustelium</i>	[34]
10	„ „ × <i>G. raimondii</i>	[34]
11	„ „ × <i>G. somalense</i>	[34]
12	„ „ × <i>G. stocksii</i>	[34]
13	„ „ × <i>G. sturtianum</i>	[34]
14	„ „ × <i>G. trilobum</i>	[34]
15	<i>G. barbadense</i> ⊗ <i>G. herbaceum</i>	[33, 34]
16	„ „ ⊗ <i>G. hirsutum</i>	[33]
17	<i>G. herbaceum</i> × <i>G. australe</i>	[34]
18	„ „ × <i>G. harknessi</i>	[34]
19	„ „ ⊗ <i>G. hirsutum</i>	[33, 34]
20	„ „ × <i>G. somalense</i>	[33, 34]
21	„ „ × <i>G. stocksii</i>	[33, 34]
22	„ „ × <i>G. amourianum</i>	[34]
23	<i>G. hirsutum</i> × <i>G. amourianum</i>	[34]
24	„ „ × <i>G. australe</i>	[33, 34]
25	„ „ × <i>G. bickii</i>	[34]
26	„ „ × <i>G. stocksii</i>	[33, 34]
27	<i>Lycopersicon esculentum</i> × <i>L. peruvianum</i>	[37]
28	<i>Solanum melongena</i> × <i>S. khsianum</i>	[29]

○ kółkiem oznaczono możliwość otrzymania z krzyżówek obukierunkowych.

padkach potrzebne są także organiczne źródła azotu, czyli pojedyncze aminokwasy lub ich mieszanina. Istotny jest ponadto typ i stężenie cukrów, od których zależą nie tylko właściwości odżywcze, ale i warunki osmotyczne hodowli. Głównie stosowana jest sacharoza, niekiedy mieszanina cukrów prostych. Zarodki starsze mogą mieć niższe stężenie cukru w pożywce, młodsze zaś powinny mieć wyższe.

Jeżeli chodzi o inne składniki odżywcze, to witaminy nie zawsze są konieczne, ale czasem wskazane, podobnie jak hormony (z grupy auksyn, cytokinin, rzadziej giberellin) i kompleksowe substancje odżywcze. Obowiązuje tutaj ciągle ta sama zasada, że bardziej zaawansowane w rozwoju zarodki wymagają mniej egzogennych składników, ponieważ mają już pewien własny endogenny poziom określonych substancji.

Pewną rolę odgrywają również fizyczne warunki hodowli, takie jak odpowiednia temperatura, obecność światła i jego natężenie. Korzystne jest niekiedy prowadzenie pierwszych etapów hodowli w ciemności, a dopiero późniejszych na świetle. Przetestowanie optymalnych warunków hodowli jest ogromnie pracochłonne, tym niemniej hodując izolowane zarodki (tab. 1) otrzymano mieszańcowe rośliny z 28 kombinacji gatunków.

2.2. HODOWLA ZALĄŻKÓW

Hodowla zalążków powiązana jest nie tylko z ominięciem barier przygotyczych (zalążki niezapylone), ale i postzygotyczych (zalążki zapylone). Ta druga możliwość daje pewną przewagę nad izolowaniem zarodków, ponieważ pozwala hodować w bardziej naturalnym otoczeniu zarodki młodsze, również te w stadium globularnym, i mogą one korzystać zarówno z egzogennych, jak i endogennych źródeł odżywczych. Metoda ta jest jednak nieskuteczna w przypadku niezgodności mieszańcowego zarodka z tkanką macierzystą. Jest wiele przykładów na to, że taka niezgodność istnieje, m. in. fakt, że z niektórych gatunków udaje się otrzymać mieszańce tylko z hodowli izolowanych zarodków, a nie zalążków, co świadczy, że obecność tkanki macierzystej stanowi pewną barierę.

Oprócz omawianej już poprzednio strategii doświadczalnej, tutaj szczególnie istotny jest wybór źródła eksplantatu. Zamiast izolowanych zalążków mogą to być zalążnie, zalążki z fragmentami łożyska lub nawet całe kwiaty. Te dodatkowe tkanki mogą bowiem dostarczać substancji koniecznych do rozwoju zapłodnionego zalążka, bądź pomagać w pobieraniu ich z pożywki. Wiele danych wskazuje, że dodanie ekstraktów z części kwiatu może stymulować rozrost zalążków, jak również ten korzystny efekt może być zastąpiony wzbogaceniem pożywki o dodatkowe, określone składniki.

W przypadku hodowli zalążków potrzebna jest ponadto dość ścisła znajomość korelacji w obrębie poszczególnych części kwiatu, aby wiedzieć, jakie eksplantaty i kiedy je izolować oraz ustalić właściwy stopień dojrzałości zalążków, ponieważ lepiej, żeby wstępne stadia rozwoju przebiegały tak długo, jak jest to możliwe w wa-

runkach in vivo, na roślinie. W pożywce korzystne są niższe stężenia cukru niż dla izolowanych zarodków.

Ta metoda stworzyła możliwość pośredniego hodowania zarodków już od stadium dwukomórkowego i kilkujądrowego bielma. Wyniki końcowe bywają jednak różne. Czasem udaje się od stadium zygotycznego doprowadzić do globularnego lub od globularnego do pełnej dojrzałości. Nie zawsze możliwe jest uzyskanie maksymalnego efektu w postaci mieszańcowych roślin. Niekiedy można przeprowadzić pełny rozwój in vitro dwuetapowo, tzn. najpierw poprzez hodowlę załączków, a następnie wyizolowanych z nich już w odpowiednim stadium zarodków. To ostatnie świadczy, że bariera międzygatunkowa, w tym przypadku właśnie antagonizm między zarodkiem, a pozostałymi tkankami, nie występuje bezpośrednio po zapłodnieniu, ale ujawnia się dopiero w okresie późniejszego rozwoju. Zestawienie mieszańców powstałych drogą hodowli zapylnych załączków podano w tab. 2.

TABELA 2

Mieszańce pochodzące z hodowli zapylnych załączni lub załączków

Lp.	Gatunki	Literatura
1	<i>Abelmoschus esculentus</i> × <i>A. ficulneus</i>	[10]
2	<i>Brassica campestris</i> × <i>B. oleracea</i>	[17, 18, 19]
3	<i>Brassica chinensis</i> × <i>B. pekinensis</i>	[16]
4	<i>Chrysanthemum boreale</i> × <i>Ch. japonese</i>	[39]
5	<i>Chrysanthemum makinoi</i> × <i>Ch. japonese</i>	[39]
6	„ „ × <i>Ch. ornatum</i>	[39]
7	<i>Glycine maxima</i> × <i>G. tomentella</i>	[26]
8	<i>Impatiens flaccida</i> × <i>I. repens</i>	[1]
9	<i>Impatiens uguensis</i> × <i>I. epiphytica</i>	[1]
10	„ „ × <i>I. flaccida</i>	[1]
11	<i>Nicotiana nesophila</i> ⊗ <i>N. tabacum</i>	[7, 27]
12	<i>Nicotiana rustica</i> × <i>N. tabacum</i>	[5, 30]
13	„ „ × <i>N. glutinosa</i>	[5]
14	<i>Nicotiana stocktonii</i> × <i>N. tabacum</i>	[27]

2.3. ZAPYLENIE I ZAPŁODNIENIE IN VITRO

Zapylenie i zapłodnienie in vitro pozwala przezwyciężyć bariery prezygotyczne, kiedy nie udaje się doprowadzić do rozwoju zarodków ani w warunkach in vivo, ani w wyniku hodowli in vitro. Przyczyną tych niepowodzeń są wszelkiego typu niezgodności między obcym pyłkiem a tkanką słupek, co sprawia, że pyłek nie kiełkuje na znamieniu, albo wytwarza łagiewki zbyt krótkie, aby mogły dotrzeć do załączków. Takie bariery można usunąć izolując całe kwiaty bez pręcików, same słupki, słupki z odciętą szyjką, czy też — jak w poprzednim przypadku — załączni lub niezapłodnione załączki, i przeprowadzając zapylenie w warunkach sztucznych. Wybór właściwego eksplantatu jest o tyle istotny, że im większy eksplantat, tym

łatwiejszy do hodowli; najtrudniejsze jest zapylenie i rozwój izolowanych załączków. Znajomość biologii kwitnienia i różnych wzajemnych korelacji rozwojowych obu gatunków musi więc być jeszcze bardziej ścisła i to począwszy od dojrzałości do zapylenia aż do rozwoju nasion, od tego bowiem zależy wybór eksplantatu i moment jego odizolowania od rośliny matecznej. Dodatkową trudność techniczną przedstawia sterylne pobieranie dużych ilości pyłku formy ojcowskiej, jak również jego przechowywanie, aby mógł być zastosowany w odpowiednim stadium rozwoju tkanki żeńskiej drugiego gatunku. Warunkiem wstępnym jest też umiejętność przeprowadzenia dalszych etapów hodowli *in vitro*, tzn. tych, na których mogą wystąpić bariery postzygotyczne. Jest to maksymalne rozszerzenie omawianych tu metod embriologii eksperymentalnej. Wymaga jednak uprzedniego opanowania techniki hodowli zapłodnionych załączków i niedojrzałych zarodków, aby uzyskać końcowy efekt w postaci mieszańcowych roślin. W ten sposób udaje się doprowadzić do zapłodnienia *in vitro* i otrzymania różnych stadiów rozwoju zarodka, czasem do pełnego rozwoju nasion nie zawsze zdolnych do kiełkowania, w innych przypadkach tylko siewek, i ostatecznie również roślin. Zarówno osiągnięty etap rozwoju, jak i płodność otrzymanych tą drogą mieszańców (tab. 3) zależy w dużym stopniu od odległości filogenetycznej gatunków wyjściowych.

TABELA 3

Mieszańce otrzymane drogą zapylenia *in vitro*

Lp.	Gatunki	Literatura
1	<i>Gossypium hirsutum</i> × <i>G. arboreum</i>	[34]
2	<i>Melandrium album</i> × <i>M. rubrum</i>	[wg 41]
3	„ „ × <i>Silene schafta</i>	[wg 41]
4	„ „ × <i>Viscaria vulgaris</i>	[wg 41]
5	<i>Nicotiana tabacum</i> × <i>N. debneyi</i>	[36]
6	„ „ × <i>N. rosulata</i>	[36]
7	„ „ × <i>N. rustica</i>	[21]
8	<i>Nicotiana alata</i> × <i>N. debneyi</i>	[wg 41]
9	<i>Petunia parodii</i> × <i>P. inflata</i>	[31]
10	<i>Zea mays</i> × <i>Z. mexicana</i>	[wg 41]

Podsumowując osiągnięcia embriologii eksperymentalnej w zakresie uzyskiwania mieszańców należy stwierdzić, że otrzymano dotąd łącznie rośliny z 52 kombinacji gatunków, w tym 2 międzyrodzajowych.

3. HYBRYDYZACJA SOMATYCZNA

Omawiane już tu metody polegały na hodowli organów i tkanek generatywnych. Od wielu lat hodowano jednak *in vitro* również tkanki somatyczne, pochodzące z różnych organów generatywnych. Tkanki te w sztucznych warunkach przekształ-

cają się w odróżnicowany kalus, z którego można otrzymać komórki hodowane w zawieszynie. Stosując odpowiednie metody, można zarówno tkanki, jak i komórki pobudzić do ponownego różnicowania i otrzymać z nich rośliny. Okazało się możliwe wyprowadzenie roślin nawet z protoplastów, czyli całkowicie odizolowanych od siebie komórek, pozbawionych ścian. Istnieje określona skala trudności, mianowicie najłatwiej pobudzić do różnicowania tkanki, potem komórki, a najtrudniej protoplasty. Różnicowanie przebiega dwiema drogami:

morfogenezy, czyli niezależnego przekształcania się grup komórek w zawiązki korzeni i pędów — jest to droga pośrednia i zdecydowanie częstsza;

embriogenezy somatycznej, kiedy grupa komórek tworzy pseudozarodek przechodzący kolejne stadia rozwojowe, porównywalne do naturalnych, i przekształca się w roślinę — jest to droga bezpośrednia, bardziej prawidłowa, chociaż znacznie rzadsza i trudniejsza do przeprowadzenia eksperymentalnie.

Od czasu wyizolowania protoplastów rozpoczęto intensywne próby wykorzystania ich do tworzenia mieszańców międzygatunkowych metodami paraseksualnymi. Pozbawione ścian komórki można bowiem za pomocą odpowiednich stymulatorów łączyć ze sobą w dowolnych kombinacjach. Protoplasty izoluje się z dwu podstawowych źródeł: hodowanych komórek i mezofilu liści. Przy łączeniu protoplastów różnych gatunków zasadniczym problemem jest wyselekcjonowanie komórek mieszańcowych [2]. Jednym z kryteriów selekcji może być źródło komórek. Do izolacji heterokarionów wykorzystuje się też określone markery, takie jak cechy morfologiczne, mutacje samorzutne i indukowane oraz odpowiednie pożywki selekcyjne. W zależności od zastosowanej metody, selekcję przeprowadza się na poziomie komórek, na etapie różnicowania lub na poziomie roślin. Problem stanowi ustalenie, które z otrzymanych roślin są mieszańcami, co wymaga też szczegółowej analizy za pomocą maksymalnej liczby kryteriów.

Ta metoda, podobnie jak poprzednie, wymaga odpowiedniego przygotowania eksperymentalnego, w tym dysponowania określonymi mutantami lub ich uprzedniego otrzymania, jak również opanowania techniki pełnej regeneracji protoplastów w rośliny dla obu łączonych gatunków.

Hybrydyzacja somatyczna jednak diametralnie różni się od metod embriologii eksperymentalnej. Prowadzona jest przede wszystkim na poziomie komórek i to somatycznych, a ponadto daje możliwość otrzymania mieszańców z pominięciem procesu zapłodnienia. Początkowo sądzono, że łącząc komórki diploidalne uda się przewyciężyć problem sterylności mieszańców wynikający z braku homologii chromosomów i otrzymać płodne amfidiploidy. Przypuszczenie to okazało się uproszczeniem. Inną z barier genetycznych stanowi męska sterylność niektórych mieszańców, wynikająca z niezgodności cytoplazmatycznej. Dotyczy to np. krzyżowania *Nicotiana tabacum* z *N. debneyi*, *N. suaveolens* lub *N. rustica* oraz *Petunia parodii* z *P. inflata*. Mieszańce mają skład cytoplazmatyczny formy matecznej, nie jest możliwe ich samozapylenie i otrzymanie płodnego F₂. W tym przypadku hybrydyzacja somatyczna wykazała [2], że osiągalne jest uzyskanie płodnych re-

generantów i dalsza analiza ich potomstwa, co świadczyłoby o obustronnym przekazywaniu cech cytoplazmatycznych.

Próbując łączyć ze sobą różne gatunki, niekiedy bardzo odległe, wykazano, że może nastąpić całkowita lub przynajmniej częściowa integracja mieszańcowych genomów. W wielu jednak przypadkach nie otrzymano mieszańcowych roślin. a jedynie mieszańce w postaci linii komórkowych. Okazały się one bardzo przydatne do badania różnych aspektów zjawisk niezgodności międzygatunkowej. Jednym z jej przejawów jest eliminacja zespołu chromosomów jednego z gatunków przy podziałach mitotycznych, a więc na poziomie komórek somatycznych. Wy-

TABELA 4

Międzygatunkowe mieszańce somatyczne

Lp.	Gatunki	Literatura
1	<i>Brassica oleracea</i> + <i>B. campestris</i>	[28]
2	<i>Daucus carota</i> + <i>D. capillifolius</i>	[wg 2]
3	<i>Datura innoxia</i> + <i>D. candida</i>	[wg 2]
4	„ „ + <i>D. discolor</i>	[wg 2]
5	„ „ + <i>D. quercifolia</i>	[wg 14]
6	„ „ + <i>D. sanguinea</i>	[wg 2]
7	„ „ + <i>D. stramonium</i>	[wg 2]
8	<i>Medicago sativa</i> + <i>M. falcata</i>	[35]
9	<i>Nicotiana glauca</i> + <i>N. langsdorfii</i>	[wg 2]
10	<i>Nicotiana sylvestris</i> + <i>N. alata</i>	[wg 9]
11	„ „ + <i>N. bigelovii</i>	[wg 9]
12	„ „ + <i>N. knightiana</i>	[wg 2]
13	„ „ + <i>N. rustica</i>	[wg 9, 14]
14	„ „ + <i>N. suaveolens</i>	[wg 2]
15	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. alata</i>	[wg 2]
16	„ „ + <i>N. debneyi</i>	[wg 2]
17	„ „ + <i>N. glauca</i>	[wg 2]
18	„ „ + <i>N. glutinosa</i>	[24, 38]
19	„ „ + <i>N. knightiana</i>	[wg 2]
20	„ „ + <i>N. nesophila</i>	[7]
21	„ „ + <i>N. otophora</i>	[8]
22	„ „ + <i>N. plumbaginifolia</i>	[wg 2]
23	„ „ + <i>N. repanda</i>	[25]
24	„ „ + <i>N. rustica</i>	[wg 2, 23]
25	„ „ + <i>N. suaveolens</i>	[wg 2]
26	„ „ + <i>N. stocktonii</i>	[6]
27	„ „ + <i>N. sylvestris</i>	[wg 2, 8, 15]
28	„ „ + <i>N. undulata</i>	[wg 9]
29	<i>Petunia parodii</i> + <i>P. hybrida</i>	[wg 2, 9, 20]
30	„ „ + <i>P. inflata</i>	[wg 2]
31	„ „ + <i>P. parviflora</i>	[wg 2]
32	<i>Petunia hybrida</i> + <i>P. axillaris</i>	[wg 2]
33	<i>Solanum tuberosum</i> + <i>S. chacoense</i>	[wg 2]
34	„ „ + <i>S. nigrum</i>	[3]

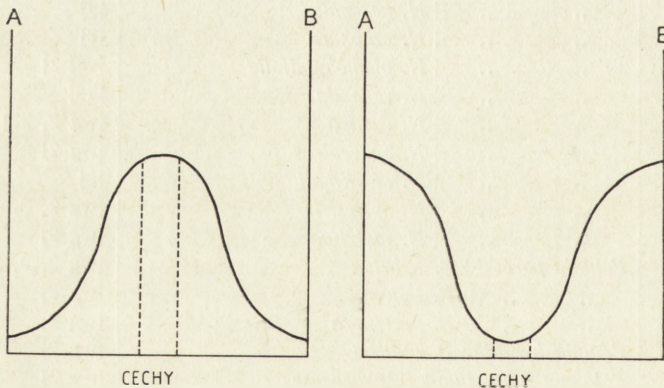
jaśniono zatem przyczynę, dla której odległe mieszańce międzygatunkowe nie muszą być amfiploidami. Podobna eliminacja dotyczy też mieszańcowego składu organeli, jakkolwiek w przypadku bliżej spokrewnionych gatunków możliwe jest, przynajmniej częściowe, przełamanie niezgodności cytoplazmatycznej.

W wyniku hybrydyzacji somatycznej uzyskano ponadto 46 roślinnych mieszańców międzygatunkowych i międzyrodzajowych (tab. 4 i 5) oraz 24 różne typy

TABELA 5
Międzyrodzajowe mieszańce somatyczne

Lp.	Gatunki	Literatura
1	<i>Atropa belladonna</i> + <i>Datura innoxia</i>	[wg 2]
2	„ „ + <i>Nicotiana chinensis</i>	[11]
3	„ „ + <i>Nicotiana tabacum</i>	[12]
4	„ „ + <i>Petunia hybrida</i>	[wg 14]
5	<i>Daucus carota</i> + <i>Aegopodium podagraria</i>	[wg 2]
6	„ „ + <i>Petroselinum hortense</i>	[wg 2]
7	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Hyoscyamus muticus</i>	[wg 14]
8	„ „ + <i>Petunia hybrida</i>	[40]
9	„ „ + <i>Salpiglossis sinuata</i>	[25]
10	„ „ + <i>Solanum tuberosum</i>	[32]
11	<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	[wg 2]
12	<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Brassica campestris</i>	[wg 2]

mieszańców wewnątrzgatunkowych, a wśród nich łączące różne genotypy cytoplazmatyczne przy tym samym składzie jądrowym. Wewnątrzgatunkowe mieszańce stanowią doskonałą kontrolę i punkt odniesienia do porównań między mieszańcami płciowymi i somatycznymi, otrzymywanymi w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Wiele mieszańców międzygatunkowych, w naturze nieistniejących lub męsko sterilnych, okazało się płodnymi [2]. Z porównania mieszańców blisko spokrewnionych z odległymi (i międzygatunkowych z międzyrodzajowymi) wynika, że w pierwszym przypadku populacja mieszańców somatycznych składa się przeważnie z osobników pośrednich między gatunkami wyjściowymi (rys. 2), a tylko niewielka grupa



Rys. 2. Porównanie mieszańców somatycznych powstałych z gatunków blisko spokrewnionych (po lewej) i odległych (po prawej)

roślin ma cechy zbliżone do gatunku A lub B. Tam, gdzie możliwe było porównanie mieszańców płciowych (krzyżujących się w warunkach *in vivo*) z somatycznymi, te ostatnie okazały się bardziej zróżnicowane niż potomstwo płciowe. Jest to efektem wtórnych zmian zaindukowanych podczas hodowli *in vitro*. Z kolei w przypadku gatunków odległych, w populacji mieszańców przewagę stanowią rośliny podobne do gatunku A lub B, natomiast na mieszańcowość niektórych roślin wskazują tylko pojedyncze cechy morfologiczne. W wielu przypadkach, aby w ogóle wykazać, że rośliny są mieszańcami, trzeba było sięgnąć do analizy biochemicznej lub nawet molekularnej. Wynika to częściowo z omawianej już eliminacji chromosomów. Mieszańce te mają pełny genom jednego z gatunków i tylko fragmenty drugiego, dlatego też nazywane są asymetrycznymi. Często są to rośliny nieplodne, charakteryzujące się anomaliami morfologicznymi.

Łączenie protoplastów pozwala wprawdzie ominąć bariery płciowe, ale w wielu przypadkach nie usuwa bariery międzygatunkowej, którą można określić jako niezgodność somatyczną i to zarówno typu genomowego, jak i plastomowego. Przejawia się ona na wszystkich etapach:

1. przeżywalności komórek mieszańcowych — w eksperymentach hybrydacyjnych operuje się milionami komórek, natomiast to, co na ogół otrzymuje się w postaci roślin, stanowi zaledwie ułamek procenta;

2. rozwoju heterokarionów — świadczy o tym eliminacja chromosomów, nieprawidłowe podziały komórek, a także eliminacja organeli określonego typu w mieszańcach cytoplazmatycznych;

3. różnicowania i morfogenezy — otrzymane mieszańce są często nienormalne lub niezdolne do rozmnażania i w żadnym dotąd przypadku nie stwierdzono, aby różnicowanie następowało poprzez embriogenezę wtórną.

Asymetria odległych mieszańców, czyli brak pełnej mieszańcowości, a nawet nieplodność nie oznacza jednak, że są to formy całkowicie bezużyteczne. Prawdopodobnie pełna integracja zasadniczo odrębnych genomów w ogóle nie jest możliwa, natomiast wprowadzenie drogą somatyczną małych fragmentów genomu jednego gatunku do drugiego może w przyszłości okazać się pożyteczne. Pośrednio można wysunąć wniosek, że eliminacja chromosomów jest jednym z warunków pełnej lub dosyć normalnej morfogenezy mieszańców somatycznych otrzymywanych *in vitro*.

4. PODSUMOWANIE

Próbując porównać ze sobą metody embriologii eksperymentalnej i hybrydacji somatycznej należy zdawać sobie sprawę, że normalna płciowa zygota zawiera haploidalne genomy jądrowe obu gatunków i genom cytoplazmatyczny, pochodzący głównie z formy męskiej. Wynika to nie tylko z małej ilości cytoplazmy przenoszonej przez komórki plemnikowe, ale i z faktu, że na kilku gatunkach wy-

kazano możliwość wybiórczej segregacji organeli do komórki wegetatywnej, a nie generatywnej w ziarnie pyłku. Mieszaniec somatyczne zaś łączą diploidalne genomy jądrowe oraz genomy cytoplazmatyczne obu gatunków. W tym więc przypadku kompleksowość genetyczna jest większa, co daje możliwości pełniejszej i szerszej analizy cech. Metodami paraseksualnymi można łączyć genomy, które w naturze rozdzielone są przede wszystkim barierą płciową, nie tylko somatyczną. W embriologii eksperymentalnej możliwości analizy są bardziej ograniczone, bariery zaś somatyczne byłyby znacznie trudniejsze do wykrycia. Poza tym mechanizmy obu typów niezgodności (płciowej i somatycznej) wcale nie muszą być jednakowe. Bariery płciowe ograniczone są prawdopodobnie tylko do tkanek generatywnych, niekoniecznie muszą działać w innych typach tkanek, natomiast bariery somatyczne mogą ujawniać się w różnych typach komórek i na różnych etapach rozwoju rośliny. Jakkolwiek ich charakter pozostaje tylko częściowo poznany, fakty, że w mieszańcach somatycznych nie wykryto dotąd embriogenezy wtórnej, oraz że wiele odległych mieszańców pozostało na etapie linii komórkowych niezdolnych do morfogenezy, wydają się wskazywać, że w sztucznych warunkach i dla wzrostu odróżnicowanego możliwa jest kooperacja i koordynacja podstawowych procesów metaboliczno-fizjologicznych, natomiast dla pełnej regeneracji już ona nie wystarcza. Oznacza to, że wiele barier somatycznych przejawia się m. in. na poziomie różnicowania komórek.

Obie omawiane metody są niezupełnie porównywalne, ponieważ spektrum testowanych gatunków jest nieco inne, a poza tym w przypadku mieszańców powstałych metodami embriologii eksperymentalnej brak na ogół analizy genetycznej cech w odniesieniu do gatunków wyjściowych. Jeżeli jednak spróbujemy porównać mieszańce otrzymane niezależnie od siebie obiema metodami (tab. 6), to może

TABELA 6

Mieszaniec płciowe i somatyczne otrzymane in vitro

Gatunki	Embriologia eksperymentalna	Hybrydyzacja somatyczna
<i>N. tabacum</i> × <i>N. alata</i>	—	+
<i>N. tabacum</i> + <i>N. alata</i>		
<i>N. rustica</i> × <i>N. glutinosa</i>	+	—
<i>N. rustica</i> + <i>N. glutinosa</i>		
<i>N. tabacum</i> × <i>N. rustica</i>	+	+
<i>N. tabacum</i> + <i>N. rustica</i>		

się okazać, że one nie wykluczają się wzajemnie, a raczej uzupełniają i mogą prowadzić do tego samego lub różnego wyniku. Niewątpliwą zasługą obu dziedzin pozostaje to, że umożliwiły one uzyskanie mieszańców w naturze niekrzyżowalnych, ani nieosiągalnych tradycyjnymi metodami.

LITERATURA

- [1] ARISUMI T., In vitro culture of embryos and ovules of certain incompatible selfs and crosses among *Impatiens* sp., J. Am. Soc. Hort. Sci., **105**: 629–631, 1980.
- [2] BARTKOWIAK E., Hodowla komórek, otrzymywanie mutantów i mieszańców somatycznych oraz modyfikacja komórek in vitro, [w] Hodowla komórek i tkanek roślinnych, red. M. Zenktele, PWN, Warszawa 1984, 312–463.
- [3] BINDING H., JAIN S. M., FINGER J., MORDHORST G., NEHLS R., GRESSEL J., Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *S. tuberosum*, Theor. Appl. Genet., **63**: 273–277, 1982.
- [4] BROUE P., DOUGLASS J., GRACE J. P., MARSHALL D. R., Interspecific hybridization of soybeans and perennial *Glycine* species indigenous to Australia via embryo culture, Euphytica, **31**: 715–724, 1982.
- [5] DOUGLAS G. C., WETTER R. L., KELLER W. A., SETTERFIELD G., Production of sexual hybrids of *Nicotiana rustica-tabacum* and *N. rustica-glutinosa* via in vitro culture of fertilized ovules, Z. Pflanzenztg., **90**: 116–129, 1983.
- [6] EVANS D. A., FLICK C. E., JENSEN R. A., Disease resistance: incorporation into sexually incompatible somatic hybrids of the genus *Nicotiana*, Science, **213**: 907–909, 1981.
- [7] EVANS D. A., FLICK C. E., KUT S. A., REED S. M., Comparison of *Nicotiana tabacum* and *N. nesophila* hybrids produced by ovule culture and protoplast fusion, Theor. Appl. Genet., **62**: 193–198, 1982.
- [8] EVANS D. A., BRAVO J. E., KUT S. A., FLICK C. E., Genetic behaviour of somatic hybrids in the genus *Nicotiana*: *N. otophora*+*N. tabacum* and *N. sylvestris*+*N. tabacum*, Theor. Appl. Genet., **65**: 93–101, 1983.
- [9] FLUHR R., The segregation of organelles and cytoplasmic traits in higher plant somatic fusion hybrids, [w] Protoplasts 1983, Experientia **46**: Suppl., Birkhäuser Verlag, Basel, 69–84, 1983.
- [10] GADWAL V. R., JOSHI A. B., IYER R. D., Interspecific hybrids in *Abelmoschus* through ovule and embryo culture, Ind. J. Genet. Plant Breed., **28**: 269–274, 1968.
- [11] GLEBA Y. Y., MOMOT V. P., CHEREP N. N., SKARZHYNSKAYA M. V., Intertribal hybrid cell lines of *Atropa belladonna*×*Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products, Theor. Appl. Genet., **62**: 75–79, 1982.
- [12] GLEBA Y. Y., SYTNIK K. M., Protoplast fusion, Springer Verlag, Berlin 1984, 152 1984.
- [13] HARBERD D. J., A simple effective embryo culture technique for *Brassica*, Euphytica, **18**: 425–429, 1969.
- [14] HARMS C. T., Somatic hybridization by plant protoplast fusion, [w] Protoplasts 1983, Experientia **46**: Suppl., Birkhäuser Verlag, Basel, 69–84, 1983.
- [15] HEIN T., PRZEWOŻNY T., SCHIEDER O., Culture and selection of somatic hybrids using an auxotrophic cell line. Theor. Appl. Genet., **64**: 119–122, 1983.
- [16] INOMATA N., In vitro culture of ovaries of *Brassica hybrids* between 2x and 4x, I. Culture medium, Jap. J. Breed., **18**: 139–148, 1968.
- [17] — Production of interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *B. oleracea* by culture in vitro of excised ovaries, I. Effect of yeast extract and casein hydrolysate on the development of excised ovaries, Jap. J. Breed., **27**: 295–304, 1977.
- [18] — Production of interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *B. oleracea* by culture in vitro of excised ovaries, II. Effect of coconut milk and casein hydrolysate on the development of excised ovaries, Jap. J. Genet., **53**: 1–12, 1978.
- [19] — Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris*×*B. oleracea* by culture in vitro

- of excised ovaries: development of excised ovaries in the crosses of various cultivars, *Jap. J. Genet.*, **53**: 161-174, 1978.
- [20] IZHAR S., SCHLECHTER M., SWARTZBERG D., Sorting out in somatic hybrids of *Petunia* and prevalence of the heteroplasmon through several meiotic cycles, *Molec. Gen. Genet.*, **190**: 468-474, 1983.
- [21] MARUBASHI W., NAKAJIMA T., Interspecific hybridization *Nicotiana tabacum* L. and *N. rustica* by test-tube pollination and ovule culture, [w] Plant tissue culture, red. A. Fujiwara, IAPTC, Tokyo, 775-776, 1982.
- [22] MATSUZAWA Y., Studies on the interspecific hybridization in genus *Brassica*, I. Effects of temperature on the development of hybrid embryos and the improvement of crossability by ovary culture in interspecific cross *Brassica campestris* × *B. oleracea*, *Jap. J. Breed.*, **28**: 186-196, 1978.
- [23] NAGAO T., Breeding by somatic hybridization based on protoplast fusion, I. The combination of *N. tabacum* and *N. rustica*, *Jap. J. Crop Sci.*, **47**: 491-498, 1978.
- [24] — Somatic hybridization by fusion of protoplasts, II. The combinations of *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* and *N. tabacum* and *N. alata*, *Jap. J. Crop Sci.*, **48**: 385-392, 1979.
- [25] — Somatic hybridization by fusion of protoplasts, III. Somatic hybrids of sexually incompatible combinations of *N. tabacum*+*N. repanda* and *N. tabacum*+*Salpiglossis sinuata*, *Jap. J. Crop Sci.*, **51**: 35-42, 1982.
- [26] NEWELL C. A., HYMOWITZ T., Successful wide hybridization between the soybean and a wild perennial relative *G. tomentella* H., *Crop Sci.*, **22**: 1062-1065, 1982.
- [27] REED S. M., COLLINS G. B., Interspecific hybrids in *Nicotiana* through in vitro culture of fertilized ovules, *J. Hered.*, **69**: 311-315, 1978.
- [28] SCHENCK H. R., ROBBELEN G., Somatic hybrids by fusion of protoplasts from *Brassica oleracea* and *B. campestris*, *Z. Pflanzenztg.*, **89**: 278-288, 1982.
- [29] SHARMA D. R., HOWDHURY J. B., AHUJA V., DHANKHAR P. S., Interspecific hybridization in the genus *Solanum*: a cross between *S. melongena* and *S. khsianum* through embryo culture, *Z. Pflanzenztg.*, **85**: 248-253, 1980.
- [30] SHIZUKUDA N., NAKAJIMA T., Production of interspecific hybrids between *Nicotiana rustica* L. and *N. tabacum* L. through ovule culture, *Jap. J. Breed.*, **32**: 371-377, 1982.
- [31] SINK K. C., POWER J. B., NATARELLO N. J., The interspecific hybrid *Petunia parodii* and its relevance to somatic hybridization, *Theor. Appl. Genet.*, **53**: 205-208, 1978.
- [32] SKARZHYNSKAYA M. V., CHEREP N. N., GLEBA Y. Y., Potato and tobacco hybrid cell lines and plants obtained by cloning individual protoplast fusion products, *Citol. Genet.*, **16**: 42-48, 1982.
- [33] STEWART J. M., HSU C. L., Hybridization of diploid and tetraploid cottons (*Gossypium* sp.) through in ovulo embryo culture, *J. Hered.*, **69**: 404-408, 1978.
- [34] STEWART J. M., In vitro fertilization and embryo rescue, *Environ. Exp. Bot.*, **21**: 301-315, 1981.
- [35] TEOULE E., Somatic hybridization between *Medicago sativa* L. and *M. falcata* L., *C. R. Acad. Sci.*, **D-297**: 13-16, 1983.
- [36] TERNOVSKI M. F., SCHINKAREVA I. K., LARKINA N. I., Production of interspecific tobacco hybrids by the pollination of ovules in vitro, *Genetika*, **12**: 1209-1213, 1976.
- [37] THOMAS B. R., PRATT D., Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus, *Theor. Appl. Genet.*, **59**: 215-219, 1981.
- [38] UCHIMIYA H., Somatic hybridization between male sterile *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* through protoplast fusion, *Theor. Appl. Genet.*, **61**: 69-72, 1982.
- [39] WATANABE K., Successful ovary culture and production of F₁ hybrids and androgenic haploids in Japanese *Chrysanthemum* species, *J. Hered.*, **68**: 317-320, 1977.

- [40] XIANGHUI L., WENBIN L., MEIJUAN H., Somatic hybrid plants from intergeneric fusion between tobacco tumor B6S3 and *Petunia hybrida* W43 and expression of LpDH, *Sci. Sinica*, 25: 611-619, 1982.
- [41] ZENKTELER M., Metoda hodowli in vitro w embriologii doświadczalnej, [w] *Hodowla tkanek i komórek roślinnych*, PWN, Warszawa, 209-311, 1984.

Otrzymano 28 lipca 1986.

Przyjęto 5 sierpnia 1986.

Adres autorki: Biuletyn Polskiej Akademii Nauk, PKiN, PO Box 20, 00-901 Warszawa.

AKTUALNE POGLĄDY NA PROCES ODNOWY I RÓŻNICOWANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH NABŁONKA PLEMNIKOTWÓRCZEGO SSAKÓW

PRESENT VIEWS ON THE RENEWAL PROCESS AND DIFFERENTIATION OF THE
STEM CELLS OF SEMINIFEROUS EPITHELIUM IN MAMMALS

Jolanta BARTMAŃSKA

Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii Uniwersytetu Wrocławskiego

Streszczenie. Pomimo licznych badań nadal trwa dyskusja nad modelem odnowy spermatogoniów u ssaków. Różnice w poglądach na pochodzenie i zachowanie macierzystych komórek nabłonka plemnikotwórczego stały się podstawą do zaproponowania dwóch modeli odnowy spermatogoniów. Pierwszy, zaproponowany przez Clermonta i Bustos-Obregon [9], sugeruje występowanie dwóch kategorii macierzystych komórek nabłonka plemnikotwórczego w obrębie spermatogoniów typu A. Typ A_1 – A_4 , to aktywne komórki macierzyste. W czasie synchronicznych podziałów, zachodzących w każdym cyklu nabłonka plemnikotwórczego, spermatogonia te odnawiają się, namnażają i dają początek różnicującym się spermatogoniom przeznaczonym do produkcji spermatocytów. Drugą kategorię stanowią izolowane spermatogonia typu A (A_{is}) uważane za rezerwowe komórki macierzyste. U dorosłych ssaków indeks mitotyczny tych spermatogoniów jest bardzo niski, zatem tylko w niewielkim stopniu uczestniczyć mogą w produkcji nowych spermatogoniów. Przez pewien czas model ten uważany był za uniwersalny dla ssaków. Obecnie jednak większość autorów jest zdania, że przynajmniej u gryzoni i tryka, a prawdopodobnie i u innych ssaków, wyłącznie izolowane spermatogonia typu A są komórkami macierzystymi nabłonka plemnikotwórczego, podczas gdy pozostałe spermatogonia są komórkami różnicującymi się, co jest zgodne z drugim modelem odnowy, zaproponowanym przez Huckins [24, 25, 26]. Wiele problemów dotyczących mechanizmów kontrolujących odnowę spermatogoniów jest nadal nie rozwiązanych.

Summary. Despite many attempts to investigate the problem, there is still some debate concerning the construction of the exact model of stem cells renewal in mammalian testis. The differences in the opinions about the origin and behaviour of stem cells, causes the development of two models of spermatogonial renewal. The first one, presented by Clermont and Bustos-Obregon [9] suggests the existence of two classes of stem cells in the seminiferous epithelium. Type A_1 – A_4 spermatogonia, according to the model, there are active stem cells. During each cycle of seminiferous epi-

thelium they divide synchronously to increase their number, renew themselves and to give rise to differentiating elements which are committed to the production of spermatocytes. The second category, isolated type A (A_{is}), are probably the reserve stem cells only, since in adult mammals, according to their low mitotic index, they contribute only very little to the production of new spermatogonia. The model was considered to be an universal for mammals. At present however, most of the authors agree that at least in rodents and in the ram A isolated spermatogonia are true stem cells, while other A spermatogonia are differentiated cells. This represents the principles of the second model, as it has been proposed by Huckins [24, 25, 26]. However, there are still many problems, concerning in particular to the regulatory mechanism of spermatogonial renewal which remain to be clarified.

Ciągła produkcja gamet, zachodząca w jądrach ssaków, osiąga dziennie dziesiątki milionów plemników [49]. Wymaga to istnienia niezawodnego źródła komórek wchodzących w proces spermatogenezy oraz precyzyjnie działających mechanizmów regulujących proces odnowy macierzystych komórek nabłonka plemnikotwórczego. Źródło, jak wiadomo, stanowią spermatogonia, które pojawiają się w przedziale przypadkowym kanalików nasieniowców ssaków wkrótce po urodzeniu. W procesie rozwoju i różnicowania diploidalnych spermatogoniów w haploidalne, zdolne do zapłodnienia plemniki, zwanym spermatogenezą, wyróżnia się zwykle trzy fazy. Odnowa spermatogoniów macierzystych i namnożenie spermatogoniów przeznaczonych do produkcji spermatocytów zachodzi podczas pierwszej fazy spermatogenezy. Druga faza dotyczy spermatocytów przechodzących mejozę, trzecia zaś spermatyd podlegających serii skomplikowanych zmian cytologicznych, prowadzących do ich przekształcenia w plemniki. O ile druga i trzecia faza procesu spermatogenezy ma podobny charakter u wszystkich ssaków, o tyle pierwsza wykazuje wiele cech specyficznych dla różnych gatunków.

Proces odnowy macierzystych komórek nabłonka plemnikotwórczego był szczegółowo analizowany u szczura, ponieważ stanowił on klasyczny obiekt wielu doświadczeń. W związku z tym w pracy oparto się przede wszystkim na wynikach badań tego gatunku, zaznaczając w miarę potrzeb ważniejsze różnice występujące w procesie odnowy spermatogoniów u innych gatunków.

CYKL I FALA NABŁONKA PLEMNIKOTWÓRCZEGO SSAKÓW

Komórki spermatogeniczne ssaków wykazują charakterystyczną organizację strukturalną i czasową. U dorosłych osobników nabłonek plemnikotwórczy zbudowany jest zawsze z jednej lub dwóch generacji spermatogoniów, spermatocytów i spermatyd. Generacje tworzą komórki powstające mniej więcej w tym samym czasie, synchronicznie rozwijające i przekształcające się w procesie spermatogenezy. Poszczególne generacje układają się zawsze w zespoły o stałej kompozycji, pojawiające się na danym obszarze kanalika w określonym czasie i kolejności. Kompletna seria takich zespołów, zwanych stadiami, stanowi cykl nabłonka plemnikotwórczego [7]. Długość cyklu, czyli czas, jaki upływa między pojawieniem

się dwóch identycznych stadiów w tym samym miejscu kanalika, jest cechą charakterystyczną dla każdego gatunku. Dla wielu gatunków ssaków czas trwania cyklu został już dokładnie określony [3, 10, 15, 21, 47]. Cykl nabłonka plemnikotwórczego szczura trwa 12,9 dnia i wyróżniono w nim 14 stadiów [10] (rys. 1).

Stadia cyklu		Zespoły komórek spermatogenicznych*					
lp.	czas trwania [godz.]						
I	34,8			A ₄ ^m	P	1	15
II	23,3		A ₁	In	P	2	16
III	6,0		A ₁	In	P	3	16
IV	13,0		A ₄	In ^m	P	4	17
V	14,7		A ₁	B	P	5	17
VI	26,5		A ₁	B ^m	P	6	18
VII	62,8		A ₁	Pl	P	7	18
VIII	21,3		A ₁	Pl	P	8	19
IX	7,1		A ₁ ^m	L	P	9	
X	7,1		A ₂	L	P	10	
XI	7,1		A ₂	L	P	11	
XII	32,3		A ₂ ^m	Z	P	12	
XIII	17,6		A ₃	Z	Di	13	
XIV	14,1		A ₃ ^m	P	MI/II	14	

Rys. 1. Cykl nabłonka plemnikotwórczego u szczura (według [10], zmienione)

*A_{is} — izolowane spermatogonia typu A; A_p — spermatogonia typu A tworzące pary; A_{a1} — uszeregowane spermatogonia typu A; A₁–A₄ — kolejne generacje synchronicznie dzielących się spermatogoniów typu A; In, B — spermatogonia typu In, B; MI/II — pierwsza i druga metafaza mejozy; Pl, L, Z, P, Di — spermatocyty I rzędu w profazie mejozy; 1–19 — stopnie spermiogenezy

Zjawisko cyklu należy wyraźnie odróżnić od fali nabłonka plemnikotwórczego. Z niezrozumiałych dotychczas powodów przyległe obszary kanalika nasieniotwórczego zawierają zespoły komórek będące w poprzedzającym lub następnym stadium cyklu. Takie fragmenty kanalika nazwano segmentami. Falę nabłonka plemnikotwórczego stanowi seria przyległych segmentów, zawierających wszystkie zespoły odpowiadające stadium cyklu danego gatunku [48]. Występowanie fali jest zjawiskiem powszechnym u ssaków, z wyjątkiem człowieka [3–5]. Poszczególne generacje komórek gametogenicznych człowieka, a więc i utworzone przez nie zespoły, składają się z niewielkiej liczby komórek. Ponieważ każdy z licznych, małych zespołów zajmuje ograniczoną część obszaru kanalika, układ więc segmentów w kanalikach nasieniotwórczych człowieka sprawia wrażenie mozaiki.

Znajomość specyficznej organizacji komórek gametogenicznych i towarzyszących jej zjawisk stanowi duże udogodnienie w badaniach procesu odnowy spermatogoniów, ponieważ wiele z nich powstaje, rozwija się i rozpoczyna podziały w ściśle określonych stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego.

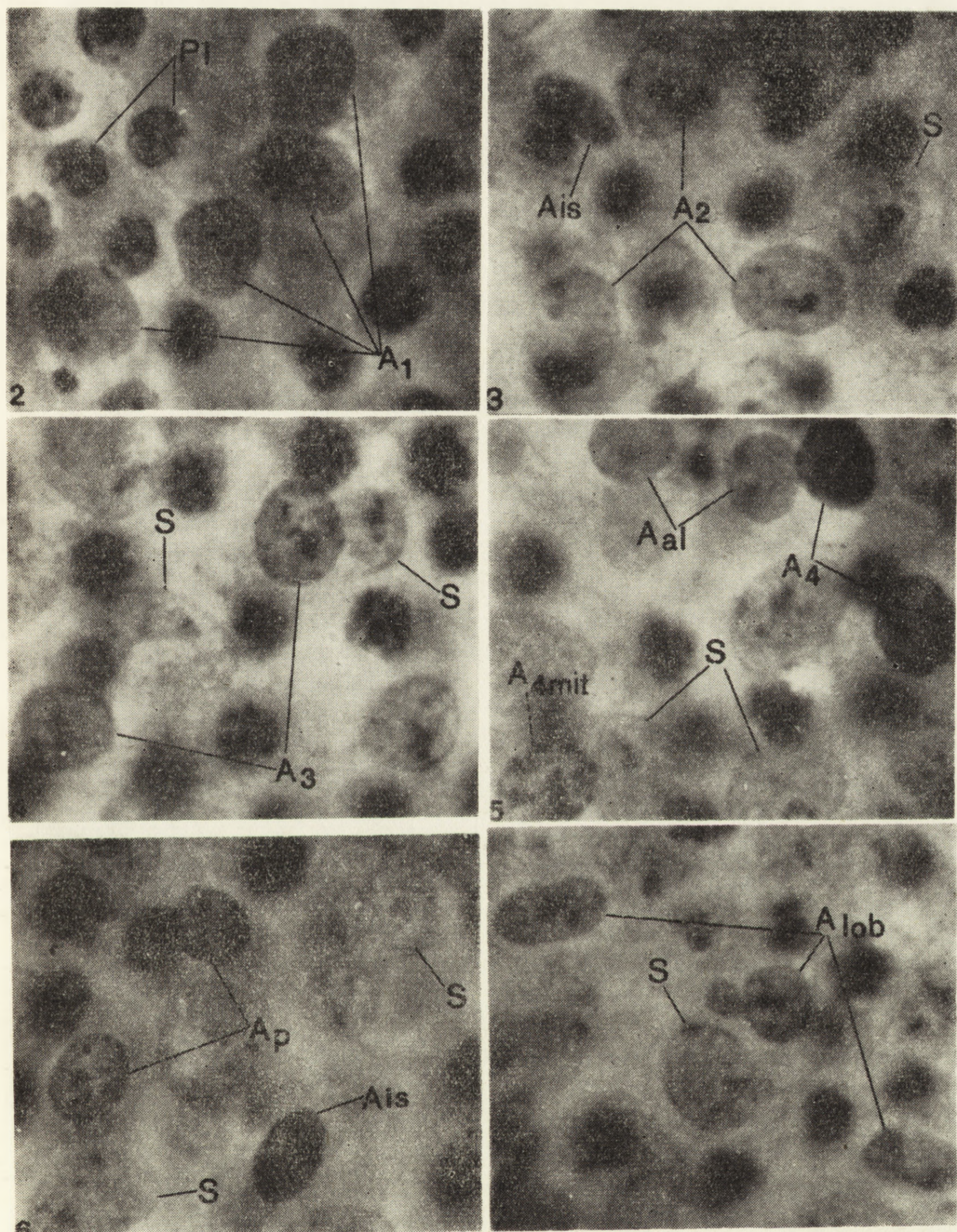
TYPY SPERMATOGONIÓW SSAKÓW

Na podstawie morfologii jąder komórkowych u ssaków wyróżniono trzy typy spermatogoniów: A, In (pośredni) i B. Typ In nie występuje u naczelnych, z człowiekiem włącznie, oraz u kilku innych gatunków ssaków [3–8]. Z reguły powstanie spermatocytów u ssaków jest poprzedzone pięcioma lub sześcioma podziałami spermatogoniów, ale liczba generacji zaliczanych do poszczególnych typów jest różna u różnych gatunków. U szczura i myszy cztery pierwsze generacje zaliczane są do typu A (A_1 – A_4), dwie następne odpowiednio do In i B [9, 43], u chomika do typu A należą trzy pierwsze generacje, kolejna do typu In, dwie zaś ostatnie do typu B [47]. U naczelnych występują dwie generacje spermatogoniów typu A i cztery generacje spermatogoniów typu B [6–8].

Spermatogonia typu A są obecne we wszystkich stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego ssaków, natomiast występowanie pozostałych typów spermatogoniów jest ograniczone do tych stadiów, w których występują dwie generacje spermatyd. Spermatogonia typów In i B są do siebie zbliżone pod względem morfologicznym i funkcjonalnym. Zawierają duże i wyraźne ziarna heterochromatyny w nukleoplazmie, wokół jąderka i przy wewnętrznej błonie otoczki jądrowej. Są to komórki zróżnicowane. Po podziale spermatogoniów typu B powstają spermatocyty preleptotenowe wchodzące w mejozę.

W proces odnowy zaangażowane są jedynie spermatogonia typu A. Dotychczas jednak trudno rozstrzygnąć, czy zdolności produkowania do własnej puli i na zewnątrz zachowują wszystkie spermatogonia A, i w jakim stopniu, czy też tylko nieliczne z nich, a jeśli tak to które, bowiem typ A nie stanowi jednorodnej grupy.

Wkrótce po uwolnieniu plemników do światła kanalika, w nabłonku plemnikotwórczym ssaków rozpoczyna się silne namnażanie spermatogoniów A. Podziały zachodzą synchronicznie, zawsze w tych samych, ściśle określonych stadiach cyklu. U szczura kolejne generacje spermatogoniów A powstają w IX, XII, XIV i I stadium cyklu (rys. 1). Spermatogonia A_1 szczura i innych ssaków mają dyskowate jądra zawierające rozproszoną chromatynę i jedno lub dwa jąderka otoczone jasnym polem. Połączone mostkami plazmatycznymi, tworzą charakterystyczne sznury komórek ułożone w tunelach utworzonych przez komórki podporowe (rys. 2). Ich cykl życiowy waha się w granicach 85–168 godz. ze względu na zróżnicowaną długość fazy G_1 [12, 23, 25]. Następne generacje spermatogoniów A, tuż po powstaniu tworzą — podobnie jak A_1 — zwarte sznury komórek, jednak z czasem ulegają one większemu rozproszeniu. W jądrach spermatogoniów A_2 – A_4 , szczególnie pod koniec ich cyklu życiowego, obserwuje się drobne ziarenka heterochromatynowe, przylegające do otoczki jądrowej i jąderka (rys. 3–5). Ich cykl życiowy jest znacznie krótszy i trwa około 42 godz. [23, 38, 47]. Indeks mitotyczny spermatogoniów A_1 – A_4 , obliczony dla całego cyklu nabłonka plemnikotwórczego, wynosi 0,60%. W tych stadiach cyklu, w których spermatogonia A_1 – A_4 przechodzą synchroniczne podziały, jest on około 10-krotnie większy [11]. U wielu gatun-

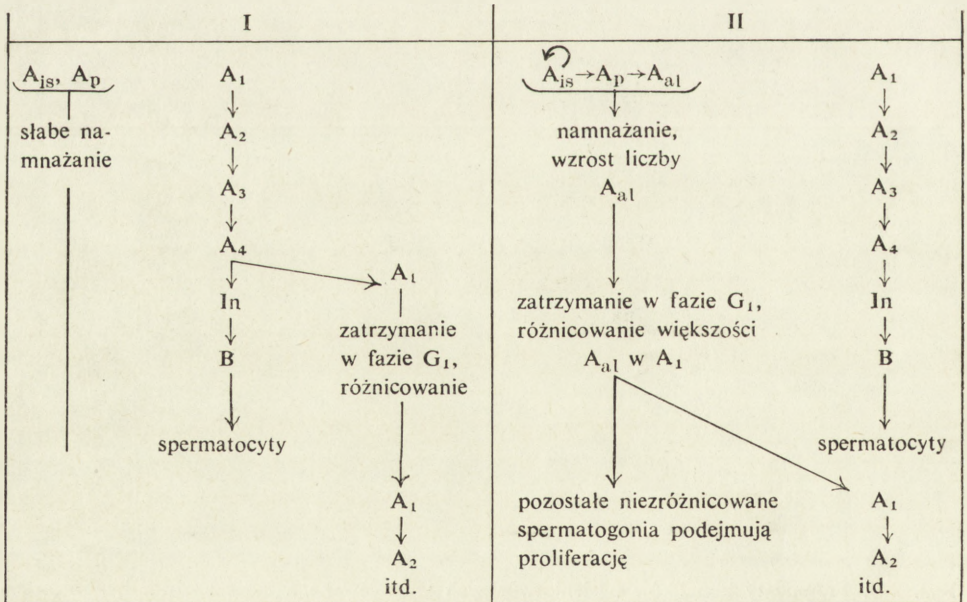


Rys. 2-7. Fragmety kanalików nasieniowców wyizolowane z jąder szczura i montowane w całości na szkiełku podstawowym. Jądra poszczególnych kategorii spermatogoniów typu A i komórek podporowych (S) widoczne przez błonę podstawną kanalików nasieniowców. Jądra spermatocytów preleptotenowych (PI), leżące bliżej światła kanalików, poza głębią ostrości.

Hematoksylina HARRISA, $\times 1500$

ków ssaków w każdym cyklu nabłonka plemnikotwórczego zachodzi spontaniczna degeneracja spermatogoniów A, której ulega w przybliżeniu zawsze ta sama liczba komórek [28, 44, 55]. U gryzoni degenerują zwykle spermatogonia drugiej i trzeciej generacji typu A (A_2 i A_3). Pierwsze oznaki degeneracji stają się widoczne w komórkach kończących fazę syntezy DNA [2, 28, 43]. Na skutek degeneracji liczba spermatogoniów A_4 u szczura jest zaledwie 2,3 razy większa od liczby spermatogoniów A_1 , choć teoretycznie powinna wzrosnąć 8-krotnie [28].

Analizując topografię spermatogoniów A, rozmieszczonych wzdłuż błony podstawnej fragmentów wyizolowanych z jąder kanalików nasieniowórczych, Clermont i Bustos-Obregon [12] natrafili na spermatogonia A, które leżą pojedynczo, parami bądź tworzą krótkie, głównie 4–8-komórkowe łańcuchy połączone mostkami plazmatycznymi. Specyficzna topografia tych spermatogoniów posłużyła do nazwania ich odpowiednio: A izolowanymi (A isolated; w skrócie A_{is}), A połączonymi w pary (A pair; w skrócie A_p) oraz A uszeregowanymi (A aligned; w skrócie A_{al}). Rozmiary i morfologia A_{is} i A_p mogą być dość zróżnicowane, zwykle jednak są to komórki dość małe. Owalne lub fasolkowate jądra tych komórek zawierają dyfuzyjną chromatynę oraz słabo zaznaczone jąderko i otoczkę jądrową (rys. 3, 6). U wszystkich badanych gatunków jest ich mało i liczba ich nie ulega zmianie w czasie cyklu nabłonka plemnikotwórczego [11, 12, 24, 26, 40, 44, 47]. Informacje dotyczące aktywności mitotycznej tych spermatogoniów są niestety rozbieżne. Według niektórych autorów spermatogonia te słabo znakują się izo-



Rys. 8. Odnowa spermatogoniów u szczura (według [51], zmienione)
I – model Clermonta i Bustos-Obregon, II – model Huckins

topami, co wskazuje, że są to komórki długocykliczne, dzielące się sporadycznie [1, 11, 12], inni natomiast uważają, że przynajmniej pod koniec cyklu nabłonka plemnikotwórczego komórki te dzielą się dość intensywnie [25, 26, 32, 36, 37, 39, 40, 45, 51, 52]. Spermatogonia A_{al} (rys. 5) pod względem wielkości i konfiguracji chromatyny w jądrze często nie odbiegają od opisanych już tu spermatogoniów A_2 – A_4 . Jednak niektóre z nich, a czasami i wszystkie leżące w jednym łańcuchu mają jądra płątowate o bardzo nieregularnych kształtach. Nazwano je A płątowatymi (A lobulated; w skrócie A_{lob}) (rys. 7). Podziały spermatogoniów A_{is} , A_p oraz A_{al} najczęściej nie są zsynchronizowane z podziałami otaczających je pozostałych spermatogoniów A, lecz zachodzą sporadycznie, z różnym nasileniem w różnych stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego, co wskazuje na nieregularny cykl mitotyczny tych spermatogoniów [11, 12, 27, 32, 36–39, 51]. Od czasu odkrycia spermatogoniów A_{al} sporne pozostaje ich pochodzenie, a w związku z tym i rola, jaką odgrywają w procesie odnowy spermatogoniów. W rezultacie doprowadziło to do powstania dwóch aktualnie branych pod uwagę modeli odnowy spermatogoniów u ssaków (rys. 8).

MODELE ODNOWY

Clermont i Bustos-Obregon [9] oraz Clermont i Hermo [11] uważają, że wszystkie spermatogonia typu A mają charakter komórek niezróżnicowanych, zdolnych do samoodnowy. Jednak nie wszystkie realizują swoje możliwości w tym samym stopniu. W normalnych warunkach aktywną rolę spełniają tylko spermatogonia A_1 – A_4 . Zdaniem autorów, jest to jedyna grupa spermatogoniów A, której indeks mitotyczny jest dostatecznie wysoki do spełnienia tego zadania. Dzielą się one synchronicznie w określonych stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego, skutkiem czego znacznie wzrasta liczba komórek w kolejnych generacjach. Istotny jest podział ostatniej generacji spermatogoniów A (u szczura A_4). W wyniku tego podziału powstają zarówno spermatogonia zróżnicowane — typu In, jak również nowe spermatogonia A_1 , które po długiej interfazie (u szczura st. II–VIII) rozpoczynają nową serię synchronicznych podziałów namnażania (u szczura w st. IX). Clermont i Hermo [11] w zasadzie utożsamiają A_1 szczura, będące w początkowej fazie cyklu życiowego, z występującymi wówczas spermatogoniami A_{al} . Jednakże okazało się, że niewielka liczba spermatogoniów A_{al} daje się zauważyć w nabłonku plemnikotwórczym jeszcze przed podziałem, a nawet przed pojawieniem się spermatogoniów A_4 między spermatogoniami A_2 i A_3 [23, 24]. Autorzy sądzą, że są to spermatogonia wywodzące się spośród dzielących się synchronicznie A_2 – A_4 , których cykl życiowy został zatrzymany w fazie G_1 , zaburzając synchronizację rozwoju tych komórek z resztą własnej generacji. Być może stanowią one rodzaj

lokalnej nadprodukcji i w miarę potrzeb mogą ponownie włączać się do cyklu, zasilając populacje spermatogoniów A różnych generacji, z A_1 włącznie [1, 9, 11, 12].

Spermatogoniom A_{is} i A_p autorzy modelu przypisują marginalne znaczenie w procesie odnowy spermatogoniów u dorosłych ssaków. Niski indeks mitotyczny tych komórek, który u szczura wynosi zaledwie 0,1%, nie wskazuje na możliwość ich efektywnej odnowy [9, 11]. Autorzy obliczyli, że gdyby każde spermatogonium A_{is} podzieliło się przynajmniej jeden raz w ciągu cyklu nabłonka plemnikotwórczego, by utrzymać wielkość własnej populacji i wytworzyć komórki wchodzące w dalsze etapy spermatogenezy, ich indeks mitotyczny powinien być około sześć razy większy od stwierdzonego. Tymczasem, nawet po wielokrotnym wstrzykiwaniu znakowanej tymidyny w ciągu trwania cyklu nabłonka plemnikotwórczego, około 30% tych spermatogoniów nie przyjmowało znacznika, co wskazuje, że są to komórki nieaktywne lub o bardzo długim cyklu życiowym [11, 12]. Zarówno więc mała liczba, jak i rzadko spotykane podziały sprawiły, że autorzy modelu wyeliminowali te spermatogonia jako kandydatki na komórki macierzyste, funkcjonujące w normalnych warunkach. Ze względu na długi cykl życiowy, którego większą część stanowi faza G_1/G_Q , A_{is} i A_p są niezwykle odporne na różnego rodzaju uszkodzenia, którym łatwo ulegają inne typy spermatogoniów. Gdy większość spermatogoniów A zostaje zniszczona, A_{is} i A_p repopulują nabłonek kanalików nasieniowców [17–20, 29, 33, 35, 46, 50, 53]. Dlatego autorzy modelu przyjęli, że są to rezerwowe komórki macierzyste nabłonka plemnikotwórczego. Wyrażają równocześnie opinię, że za blokadę potencjalnych możliwości proliferacyjnych tych spermatogoniów w normalnych warunkach są odpowiedzialne substancje o charakterze chalonów [13, 14, 34].

Występowanie dwu klas spermatogoniów macierzystych, z których tylko jedna spełnia aktywną rolę w normalnych warunkach, opisano również u człowieka i innych naczelnych [3–6, 8, 12, 21, 22]. Jądra obydwu kategorii spermatogoniów macierzystych u naczelnych, z człowiekiem włącznie, wykazują tak charakterystyczną morfologię, że ich rozróżnienie nie sprawia trudności [6, 8]. Jądra spermatogoniów pierwszej kategorii, zwane ciemnymi spermatogoniami A (A_{dark} ; w skrócie A_d), zawierają homogenną, gęsto upakowaną chromatynę, wybarwiającą się bardzo silnie hematoksyliną. U człowieka w jądrach tych spermatogoniów występuje centralnie leżące przejaśnienie podobne do wakuoli, u badanych zaś gatunków małp między otoczką jądrową a chromatyną zaznacza się jasny pierścień. Prawdopodobnie cechy te są morfologicznym wyrazem fazy G_1/G_Q cyklu życiowego spermatogoniów A_d [51]. Komórki te dzielą się bardzo rzadko, uaktywniając się jedynie w przypadku uszkodzenia nabłonka kanalików nasieniowców [12]. Druga kategoria spermatogoniów A, tzw. A jasne (A_{pale} ; w skrócie A_{pal}), stanowi grupę aktywnych komórek macierzystych. W nabłonku plemnikotwórczym naczelnych obie kategorie spermatogoniów A występują w stosunku 1:1. W każdym cyklu nabłonka zachodzi mitoza spermatogoniów A_{pal} , w wyniku której po-

wstają — w równej liczbie — nowe spermatogonia A_{pal} i pierwsza generacja spermatogoniów B (B_1), przeznaczonych do produkcji spermatoctów. Wysunięto przypuszczenie, że A_{pal} już przed podziałem są zdeterminowane w kierunku odnowy lub różnicowania, jednak ani na podstawie długości cyklu mitotycznego, ani morfologii nie udało się uchwycić między nimi żadnych różnic [51].

Obecnie przeważa opinia, że odnowa spermatogoniów u naczelnych, przebiegająca zgodnie z modelem Clermonta i Bustos-Obregon, ma charakter wyjątkowy, natomiast u innych gatunków ssaków spermatogonia odnawiają się według schematu, który zaproponowała Huckins [24] dla szczura. Proces odnowy spermatogoniów zgodny z tym modelem opisano następnie u myszy [32, 44, 45], a ostatnio u chomika i tryka [36–40, 47, 51].

Huckins [24] uważa, że macierzystymi komórkami nabłonka plemnikotwórczego u szczura są wyłącznie izolowane spermatogonia A (rys. 8). Sporadyczne podziały tych komórek prowadzą bądź to do powstania następnych spermatogoniów izolowanych, bądź też — wskutek niekompletnej cytokinezy — do wytworzenia par połączonych mostkami plazmatycznymi (A_p). Kolejny podział w ostatnim przypadku prowadzi do powstania łańcuszka złożonego z czterech liniowo ułożonych, połączonych mostkami komórek, określanymi jako A_{al} . U szczura i wielu innych gatunków ssaków największa aktywność podziałowa spermatogoniów A_{al} zbiega się w czasie z podziałami ostatniej generacji synchronicznie dzielących się spermatogoniów typu A i ustaje niemal równocześnie z pojawieniem się spermatogoniów typu In w określonym miejscu nabłonka plemnikotwórczego [25, 40, 52]. Spermatogonia A_{al} wchodzi wówczas w okres długotrwałej fazy G_1 . W okresie, w którym następuje uwolnienie plemników z nabłonka plemnikotwórczego do światła kanalika (u szczura VIII st. cyklu), niemal wszystkie A_{al} wchodzi w fazę syntezy DNA; znacznie powiększają rozmiary i stopniowo nabierają coraz więcej cech morfologicznych, typowych dla spermatogoniów A_1 . Wkrótce potem (u szczura w IX st. cyklu) dzielą się, dając początek kolejnej generacji synchronicznie dzielących się spermatogoniów A. Nie tylko A_{al} , lecz również niektóre A_{is} oraz A_p mogą bezpośrednio różnicować się w A_1 . Nie wyklucza się także istnienia odwrotnych możliwości, powstawania izolowanych spermatogoniów A, zachowujących charakter komórek macierzystych, przez zerwanie mostka między parą spermatogoniów A (A_p), a nawet, choć to mało prawdopodobne, między spermatogoniami A_{al} [19, 40, 51]. Zdaniem Huckins [23, 25], A_p oraz A_{al} w początkowej fazie cyklu mitotycznego są elementami niezróżnicowanymi, natomiast pozostałe spermatogonia typu A, podobnie jak spermatogonia typu In oraz B, są wyspecjalizowane w kierunku produkcji spermatoctów.

Wyniki badań Huckins [25, 29, 32] i innych autorów [36, 37, 39, 40, 45] wykazują, że aktywność podziałowa A_{is} i A_p , badanych jako jedna grupa, jest wystarczająca do podtrzymania produkcji i odnowy spermatogoniów A, co przemawia za wiarygodnością tego modelu, a czego nie udało się stwierdzić autorom cytozanym wyżej.

PODSUMOWANIE

Prowadzone w ostatnich latach badania kinetyki cyklu komórek macierzystych wykazały m. in., że im dłużej trwa blokada spermatogoniów w fazie G_1 , tym trudniej je z niej wyrwać [51]. Rzadkie podziały spermatogoniów macierzystych sprzyjają zachowaniu i przekazaniu niezmienionej informacji genetycznej, chroniąc przed możliwością powielania błędów, których prawdopodobieństwo wzrasta wraz ze wzrostem mitotycznej aktywności komórek. Wydaje się więc, że posiadanie dużej populacji długocyklicznych spermatogoniów macierzystych jest korzystne dla gatunku. Taka sytuacja występuje u naczelnych, u których spermatogonia A_d są bardzo liczne i mogą przebywać w fazie G_1/G_0 bardzo długo, niekiedy nawet kilka lat [51]. Macierzyste spermatogonia A naczelnych są więc wyjątkowo dobrze zabezpieczone przed możliwością przekazania błędnej informacji, o czym pośrednio świadczy również znikoma spontaniczna degeneracja spermatogoniów w nabłonku plemnikotwórczym tych ssaków [4, 8, 12]. Biologiczne znaczenie takiego mechanizmu ochronnego wydaje się tak duże, że można by oczekiwać, iż będzie on powszechnie spotykany i u innych ssaków. U gryzoni obserwujemy inną sytuację. Populacja długocyklicznych spermatogoniów A, którą można porównać do A_d naczelnych, jest tu znacznie mniejsza [1, 2, 26], spontaniczna zaś degeneracja bardzo silna [2, 24, 28, 43, 55]. Wielu autorów dopatruje się związku między spontaniczną degeneracją spermatogoniów A i aktywnością podziałów spermatogoniów macierzystych, bowiem oba zjawiska zachodzą zwykle w tych samych stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego. U szczura nasiloną degeneracją spermatogoniów A_2 i A_3 przypada na te same stadia cyklu nabłonka plemnikotwórczego co wejście długocyklicznych spermatogoniów A_{1s} w fazę syntezy DNA [28, 30, 32]. Dotychczas jednak nie wiadomo, na czym związek tych zjawisk może polegać. Zgodnie z modelem odnowy, przedstawionym przez Huckins [24], spontanicznie degenerujące spermatogonia A u szczura dzieli od komórek macierzystych zaledwie kilka pokoleń. Zastanawiające jest, dlaczego tak wiele spermatogoniów w krótkim czasie traci zdolność do dalszego rozwoju i różnicowania.

Wysoka spontaniczna degeneracja u gryzoni wydaje się łatwiejsza do wyjaśnienia za pomocą modelu Clermonta i Bustos-Obregon. Częste podziały spermatogoniów A_1 - A_4 , uważanych przez tych autorów za cyklicznie odnawiającą się populację, sprawiają, że szybko wzrasta odległość kolejnych pokoleń od długocyklicznych spermatogoniów macierzystych. Wzrasta więc ryzyko popełniania pomyłek przy replikacji DNA, co mogłoby usprawiedliwiać dużą liczbę degenerujących spermatogoniów. Być może dopiero produkty rozpadu degenerujących komórek są w stanie dostarczyć dostatecznie silnych bodźców do wyzwolenia reakcji podziałowych wśród długocyklicznych spermatogoniów macierzystych. Mogą one działać bezpośrednio lub powodować miejscową inaktywację chalonów hamujących podziały A_{1s} i A_p w normalnych warunkach.

Na występowanie chalonów w jądrach ssaków wskazuje wielu autorów [13,

14, 34, 50, 52, 54], jedynie Cunningham i Huckins [16] zaprzeczają istnieniu chalonów jądrowych. Ostatnie badania Rooij i wsp. [50, 52] wykazały, że regulacja aktywności mitotycznej niezróżnicowanych spermatogoniów u ssaków ma charakter lokalny i odbywa się na zasadzie negatywnych sprzężeń zwrotnych za pośrednictwem chalonów. Przypuszcza się, że chalony są produkowane przez wszystkie spermatogonia występujące w nabłonku plemnikotwórczym ssaków. Jednak działanie tych substancji widoczne jest dopiero wówczas, gdy uzyskają odpowiednie stężenie. Aktywność mitotyczna niezróżnicowanych spermatogoniów występujących w określonym segmencie kanalika zależy więc od zagęszczenia towarzyszących im spermatogoniów różnicujących się, które ze względu na swą liczbę produkują duże ilości chalonów. Wykazano, że po selektywnym zniszczeniu zróżnicowanych spermatogoniów w określonym segmencie kanalika, niezróżnicowane spermatogonia A pozostawały aktywne mitotycznie nawet w tych stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego, w których normalnie podziały ich nie zachodzą. Wylimowanie zaś części populacji spermatogoniów niezróżnicowanych nie pobudzało pozostałych komórek do podziałów. Wydaje się, że ubytek komórek był w tym przypadku zbyt mały, by został rozpoznany jako sygnał do dodatkowej proliferacji. Nie wiadomo dotychczas, czy różne kategorie spermatogoniów różnią się wrażliwością na stężenie chalonów, choć można spodziewać się występowania takich różnic.

W badaniach odnawiających się systemów podstawowe znaczenie ma poprawna identyfikacja komórek macierzystych. W przypadku nabłonka plemnikotwórczego, zasadniczym kryterium służącym identyfikacji spermatogoniów A jest ich morfologia i topografia. Jednak u wielu gatunków ssaków, za wyjątkiem naczelnych, morfologiczne podobieństwo spermatogoniów jest tak duże, że mogą powstać obawy, czy kryterium morfologii jest wiarygodne i czy przynajmniej częściowo nie stanowi ono przyczyny uzyskiwania przez różnych autorów wyników na tyle odmiennych, by pozwoliły one na różną interpretację roli spermatogoniów A_{is} i A_p w procesie odnowy. Do puli komórek macierzystych zaliczono, zgodnie z modelem Huckins [24], wyłącznie izolowane spermatogonia A. Praktycznie trudno jest przeprowadzić dokładną linię podziału między spermatogoniami izolowanymi (A_{is}) i spermatogoniami tworzącymi pary (A_p), dlatego najczęściej obie grupy rozpatruje się łącznie. Brak między nimi uchwytnych różnic morfologicznych, a jedynym kryterium, za pomocą którego próbuje się je rozróżnić, jest ich topografia.

Za spermatogonia izolowane przyjmuje się komórki, których jądra leżą w odległości większej niż $30 \mu\text{m}$, co w przybliżeniu stanowi 2-krotną wielkość jądra komórki podporowej. Parę (A_p) stanowią dwie komórki, których jądra znajdują się w mniejszej odległości. Prawdopodobnie około połowę ogólnej liczby par stanowią tzw. fałszywe pary. Takie pary utworzone są w rzeczywistości z dwu izolowanych spermatogoniów A, które pozostają w sąsiedztwie, mimo że cytoplazmatyczne połączenie między nimi uległo już zerwaniu [24, 30, 40, 47, 51]. U szczura około 70% podziałów spermatogoniów A_{is} i A_p przypada na te same stadia cyklu

nabłonka plemnikotwórczego, w których dzielą się spermatogonia A_1 – A_4 , choć łączny czas trwania tych stadiów stanowi nieco mniej niż trzecią część całego cyklu. Pojedyncze mitozy lub dzielące się pary spermatogoniów leżą zwykle w pobliżu dzielących się grup spermatogoniów A_1 – A_4 , dlatego trudno stwierdzić, że nie są to występujące na peryferiach podziały komórek A_1 – A_4 . W przypadku badań autoradiograficznych, w segmentach w których brak znakowanych spermatogoniów A_1 – A_4 , nie obserwuje się również znakowanych mitoz komórek A_{is} i A_p [11, 12]. Podobne problemy stwarza odróżnianie spermatogoniów A_{is} i A_p od A_{ai} . Cztery leżące w bliskim sąsiedztwie spermatogonia A można interpretować jako cztery spermatogonia typu A_{ai} , jako dwie pary lub nawet jako cztery izolowane spermatogonia A , zwłaszcza na autoradiogramach, kiedy i morfologia jąder i mostki cytoplazmatyczne są znacznie gorzej widoczne. W ten sposób łatwo zniekształcić rzeczywisty obraz tak małej populacji, jaką są spermatogonia A_{is} i A_p .

Wzajemne podobieństwo pozostałych generacji spermatogoniów typu A jest również duże, szczególnie w przypadku komórek znajdujących się w fazie G_1 cyklu mitotycznego [25, 32, 33, 36, 37, 39, 40]. Pod koniec fazy S i w fazie G_2 jądra spermatogoniów nabierają wyraźnych cech tożsamości. W jądrach spermatogoniów kolejnych generacji typu A zaznacza się wtedy stopniowy wzrost zawartości skondensowanej chromatyny. Ponieważ czas trwania fazy S i G_2 , w stosunku do czasu trwania całego cyklu życiowego spermatogoniów A_2 – A_4 jest stosunkowo długi [25, 38], częściej więc mamy szansę obserwować je właśnie w tych okresach. Widoczny wówczas obraz jąder komórkowych uznano automatycznie za cechę charakterystyczną tych spermatogoniów, chociaż opisane różnice są przede wszystkim związane z kolejnymi fazami cyklu życiowego różnych generacji spermatogoniów typu A [1, 9, 11, 12].

Technika badania wyizolowanych z jąder kanalików naseniotwórczych, montowanych w całości na szkiełku podstawowym, pozwala na obserwacje topografii spermatogoniów oglądanych przez błonę podstawną kanalików [11, 13]. Poprawną identyfikację spermatogoniów na tak przygotowanych preparatach ułatwia uporządkowany układ segmentów fali nabłonka plemnikotwórczego. Należy jednak pamiętać, że regularny układ segmentów aż w 80% fal zaburzony jest przez tzw. modulacje, czyli przestawienie oczekiwanego następstwa segmentów lub wtrącenie dodatkowego segmentu, niezgodnego z oczekiwanym porządkiem [1, 12, 38, 48]. Wielkość segmentów rozrywających regularny układ fali bywa różna. Niekiedy są one ograniczone do małego fragmentu kanalika, tworząc „łatki” na jego powierzchni mogące łatwo ująć uwadze badającego. W poszczególnych segmentach fali widać klony spermatogoniów rozwijających się synchronicznie. Do jednej generacji należy zwykle wiele klonów. Dokładna obserwacja pozwala zauważyć, że rozwój klonów w obrębie generacji nie jest ściśle synchronizowany. Szczególnie te segmenty, w których występują synchroniczne podziały spermatogoniów A_1 – A_4 , zawierają z reguły fragmenty, w których sąsiedztwo spermatogoniów nie jest zgodne z porządkiem wynikającym z przebiegu normalnego cyklu życiowego tych komórek [1, 11, 48].

Na podstawie map spermatogoniów i spermatocytów, sporządzonych z elektro-nogramów Moens i wsp. [41, 42] stwierdzili, że fragmenty nabłonka plemnikotwórczego, identyczne pod względem stopnia zaawansowania spermatocytów i spermatyd, zawierają ilościowo i jakościowo różne populacje spermatogoniów. Wykazali ponadto, że liczba klonów spermatocytów na danym obszarze kanalika jest kilkakrotnie mniejsza aniżeli liczba klonów spermatogoniów. Klony spermatocytów zawierają z reguły dość dużą liczbę komórek, natomiast klony spermatogoniów są pod tym względem bardzo zróżnicowane. Już kilka największych zawiera wystarczająco dużo spermatogoniów do zapewnienia lokalnej populacji spermatocytów. Na podstawie tych obserwacji autorzy twierdzą, że na określonym obszarze kanalika, w każdym cyklu nabłonka plemnikotwórczego, podziałowi podlega tylko taka liczba spermatogoniów, jaka jest konieczna do zapewnienia lokalnej liczby spermatocytów. Pozostałe klony spermatogoniów stanowiłyby rezerwy, która może być wykorzystana dopiero w następnych cyklach nabłonka plemnikotwórczego. Pośrednio wskazuje na to również wielkość tych klonów. Liczba spermatogoniów jest w nich zbyt mała, by w krótkim czasie mogły osiągnąć takie rozmiary, jakie są konieczne do utworzenia przeciętnie spotykanych klonów spermatocytów. Autorzy uważają, że im większy klon spermatogoniów, tym większe jego szanse na kolejny podział w aktualnym cyklu i odwrotnie. Tak więc występujące pojedynczo izolowane spermatogonia A oraz pary spermatogoniów zalegałyby dłużej przy błonie podstawnej kanalików nasieniotwórczych, oczekując na przekształcenie większych klonów. Inni autorzy uważają jednak, że wielkość klonów nie jest prerekwizytem do różnicowania [30, 36–40].

Trudno jest jednoznacznie, wobec wielu kontrowersyjnych opinii, rozstrzygnąć, który z przedstawionych modeli odnowy bardziej wiarygodnie odzwierciedla rzeczywisty przebieg odnowy spermatogoniów u ssaków. Mając jednakże na uwadze, że funkcjonalna specjalizacja komórek bywa zwykle poprzedzona przedłużoną fazą G_1 , występowanie cyklu różnicowania na poziomie spermatogoniów A_{al} , jak proponuje Huckins [24], wydaje się bardziej prawdopodobne.

Czas trwania cyklu życiowego można uznać za najbardziej istotną cechę różniącą poszczególne generacje spermatogoniów typu A u ssaków. Prawdopodobnie wiele innych cech, takich jak odporność na śmierć i mutacje, wrażliwość na promieniowanie, a być może również na bodźce decydujące o podejmowaniu programu odnowy lub różnicowania, jest konsekwencją długości cyklu. Jednak nadal nie wiadomo, czy zasadniczą rolę w regulacji cyklu życiowego spermatogoniów spełniają czynniki endogenne, czy mikrośrodowisko, i w jakim ewentualnie stopniu współdziałają one ze sobą. Nie dość dobrze poznano również zależności między długo- i krótkocyklicznymi spermatogoniami, a także wzajemne powiązania spermatogoniów i komórek podporowych [54].

Wyniki, którymi obecnie dysponujemy wskazują, że odnowa spermatogoniów u naczelnych zachodzi według innego schematu niż u gryzoni i bydła. Trudno uzasadnić występowanie tak istotnych różnic w odniesieniu do podstawowego etapu spermatogenezy, wobec daleko idącego podobieństwa następnych etapów tego

procesu u różnych ssaków. Lepsze poznanie skomplikowanej struktury i funkcjonowania komórek nabłonka plemnikotwórczego dostarczy zapewne nowych informacji dotyczących problemu odnowy spermatogoniów.

LITERATURA

- [1] BARTMAŃSKA J., CLERMONT Y., Renewal of the A spermatogonia in adult rats, *Cell Tissue Kinetics*, **16**: 135-143, 1983.
- [2] CLERMONT Y., Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat. A revised model for the renewal of spermatogonia, *Am. J. Anat.*, **111**: 111-129, 1962.
- [3] — The cycle of seminiferous epithelium in man., *Am. J. Anat.*, **1**: 35-51, 1963.
- [4] — Renewal of spermatogonia in man, *Am. J. Anat.*, **118**: 509-526, 1966.
- [5] — Spermatogenesis in man, *Fertil. Steril.*, **17**: 705-721, 1966.
- [6] — Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*), *Am. J. Anat.*, **126**: 57-72, 1969.
- [7] — Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal, *Physiol. Rev.*, **52**: 198-236, 1972.
- [8] CLERMONT Y., ANTAR M., Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*, *Am. J. Anat.*, **136**: 153-166, 1973.
- [9] CLERMONT Y., BUSTOS-OBREGON E., Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted in toto, *Am. J. Anat.*, **122**: 237-248, 1968.
- [10] CLERMONT Y., HARVEY S. C., Duration of the cycle of seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized hormone treated albino rats, *Endocrinology*, **76**: 80-89, 1965.
- [11] CLERMONT Y., HERMO L., Spermatogonial stem cells in the albino rat, *Am. J. Anat.*, **142**: 159-176, 1975.
- [12] — — Spermatogonial stem cells and their behaviour in the seminiferous epithelium of rats and monkeys, [w] Stem cells of renewing cell populations, red. A. B. Cairnie, P. K. Lala, D. G. Osmond, Acad. Press, New York 1976, 273-279.
- [13] CLERMONT Y., MAUGER A., Existence of spermatogonial chalone in the rat testis, *Cell Tissue Kinet.*, **7**: 165-172, 1974.
- [14] — Effect of a spermatogonial chalone on the growing rat testis, *Cell Tissue Kinet.*, **9**: 99-104, 1976.
- [15] CLERMONT Y., TROTT M., Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H- Thymidine and radioautography, *Fertil. Steril.*, **20**: 5, 805-817, 1969.
- [16] CUNNINGHAM G. R., HUCKINS C., Failure to identify a spermatogonial chalone in adult irradiated testes, *Cell Tissue Kinet.*, **12**: 81-89, 1979.
- [17] DYM M., CLERMONT Y., Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following X-irradiation in the rat testis, *Am. J. Anat.*, **128**: 3, 265-281, 1970.
- [18] ERICSON B. H., MARTIN P. G., Effect of dose rate on the mitotically active and differentiating germ cell of the prenatal male rat, *Int. J. Rad. Biol.*, **22**: 6, 517-524, 1972.
- [19] ERICSON B. H., Effect of ⁶⁰Co γ -radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the postpubertal rat, *Radiation Res.*, **68**: 433-448, 1976.
- [20] — Survival and renewal of murine stem spermatogonia following ⁶⁰Co γ -radiation, *Radiation Res.*, **86**: 34-41, 1981.
- [21] HELLER C., CLERMONT Y., Spermatogenesis in man. An estimate of its duration, *Science*, **140**: 184-186, 1963.

- [22] — Kinetics of the germinal epithelium in man, *Rec. Progr. Hormone Res.*, **20**: 545–575, 1964.
- [23] HUCKINS C., Cell cycle properties of differentiating spermatogonia in adult Sprague-Dawley rats, *Cell Tissue Kinet.*, **4**: 139–154, 1971.
- [24] — The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation, *Anat. Rec.*, **169**: 533–558, 1971.
- [25] — The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A radioautographic analysis of their cell cycle properties, *Cell Tissue Kinet.*, **4**: 313–334, 1971.
- [26] — The spermatogonial stem cell population in adult rats. III. Evidence for a long cycling population, *Cell Tissue Kinet.*, **4**: 335–349, 1971.
- [27] — Spermatogonial stem cell behaviour in rodents, [w] *Biology of Reproduction. Basic and clinical studies*, red. J. T. Velardo, B. A. Kaspro, Symposium of IIIrd Pan-American Congress of Anatomy, 1972, 395–401.
- [28] — The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats. An analysis using a simplified classification at the germinal epithelium, *Anat. Rec.*, **190**: 4, 905–926, 1978.
- [29] — Behaviour of stem cell spermatogonia in the adult rat irradiated testis, *Biol. Reprod.*, **19**: 747–760, 1978.
- [30] — Spermatogonial intercellular bridges in whole mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testis, *Am. J. Anat.*, **153**: 97–122, 1978.
- [31] HUCKINS C., KOPRIWA B., A technique for the radioautography of germ cells in whole mounts of seminiferous tubules, *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 848–851, 1969.
- [32] HUCKINS C., OAKBERG E. F., Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in the mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. I. The normal testes, *Anat. Rec.*, **192**: 44, 519–528, 1978.
- [33] — Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. II. The irradiated testes, *Anat. Rec.*, **192**: 4, 529–542, 1978.
- [34] IRONS M. J., CLERMONT Y., Spermatogonial chalone, *Cell Tissue Kinet.*, **12**: 425–433, 1979.
- [35] KEULEN Van C. J. G., ROOIJ de D. G., The recovery from various gradations of cell loss in the mouse seminiferous epithelium, *Cell Tissue Kinet.*, **7**: 549–558, 1974.
- [36] LOK D., JANSEN M. T., ROOIJ de D. G., Spermatogonial multiplication in the Chinese Hamster. II. Cell cycle properties of undifferentiated spermatogonia, *Cell Tissue Kinet.*, **16**: 19–29, 1983.
- [37] — Spermatogonial multiplication in the Chinese Hamster. IV. Search for long cycling stem cells, *Cell Tissue Kinet.*, **17**: 135–143, 1984.
- [38] LOK D., ROOIJ de D. G., Spermatogonial multiplication in the Chinese Hamster. I. Cell cycle properties and synchronization of differentiating spermatogonia, *Cell Tissue Kinet.*, **16**: 7–18, 1983.
- [39] — Spermatogonial multiplication in the Chinese Hamster. III. Labelling indices of undifferentiated spermatogonia throughout the cycle of the seminiferous epithelium, *Cell Tissue Kinet.*, **16**: 31–40, 1983.
- [40] LOK D., WEENK D., ROOIJ de D. G., Morphology, proliferation and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the Chinese Hamster and the Ram, *Anat. Rec.*, **203**: 83–92, 1982.
- [41] MOENS P. B., GO V. L. W., Intercellular bridges and division patterns of rat spermatogonia *Zeitschrift Zellforsch.*, **127**: 201–208, 1972.
- [42] MOENS P. B., HUGHENHOLTZ A. D., The arrangement of germ cells in the rat seminiferous tubule: An electron microscope study, *J. Cell. Sci.*, **19**: 487–507, 1975.
- [43] OAKBERG E. F., Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium, *Am. J. Anat.*, **99**: 3, 507–515, 1956.

- [44] — Spermatogonial stem cell renewal in the mouse, *Anat. Rec.*, **169**: 515–532, 1971.
- [45] OAKBERG E. F., HUCKINS C., Spermatogonial stem cells renewal in the mouse as revealed by 3H-thymidine labelling and irradiation, [w] *Stem cells of renewing populations*, red. A. B. Cairnie, P. K. Lala, D. G. Osmond. Acad. Press, New York 1976, 287–302.
- [46] OAKBERG E. F., Differential spermatogonial stem cell survival and mutation frequency, *Mutation Res.*, **50**: 327–340, 1978.
- [47] OUD J. L., ROOIJ de D. G., Spermatogenesis in the Chinese Hamster, *Anat. Rec.*, **187**: 113–125, 1977.
- [48] PEREY B., CLERMONT Y., LEBLOND C. P., The wave of seminiferous epithelium in the rat, *Am. J. Anat.*, **108**: 47–77, 1961.
- [49] ROBB G. W., AMANN R. P., KILLIAN G. J., Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats, *J. Reprod. Fertil.*, **54**: 103–107, 1978.
- [50] ROOIJ de D. G., Effects of testicular extracts on proliferation of spermatogonia in the mouse, *Virchows Arch. B. Cell. Path.*, **33**: 67–75, 1980.
- [51] — Proliferation and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the mammalian testis, [w] *Stem cells — their identification and characterisation*, red. C. S. Potten, Churchill Livingstone, Edinburgh—London—Melbourne—New York 1983, 89–117.
- [52] ROOIJ de D. G., LOK D., WEENK W., Feedback regulation of the proliferation of the undifferentiated spermatogonia in the Chinese Hamster by the differentiating spermatogonia, *Cell Tissue Kinet.*, **18**: 71–81, 1985.
- [53] RUITER-BOOTSMA de A., KRAMER M. F., ROOIJ de D. G., Survival of spermatogonial stem cells in the mouse after split dose irradiation with fission neutrons of 1-MeV mean energy or 300 kV X-rays, *Rad. Res.*, **71**: 579–592, 1977.
- [54] RUSSELL L. D., Sertoli — germ cells interrelations, *Gamete Res.*, **3**: 179–202, 1980.
- [55] RUSSELL L. D., CLERMONT Y., Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats, *Anat. Rec.*, **187**: 3, 347–365, 1977.

Otrzymano 8.05.1986.

Przyjęto 25.09.1986.

Adres autorki: ul. Sienkiewicza 21, 50-335 Wrocław

ANALIZA PODOBIENSTW I RÓŻNIC MIĘDZY OBRAZAMI JĄDER
KOMÓRKOWYCH NA PRZYKŁADZIE JĄDER KOMÓREK
LIMFOIDALNYCH GRASICY

ANALYSIS OF SIMILARITY/DISSIMILARITY OF CELL NUCLEI PATTERNS ON THE
EXAMPLE OF THYMOCYTES

Elżbieta KACZMAREK, Jerzy B. WARCHOŁ

Zakład Histologii, AM, Poznań

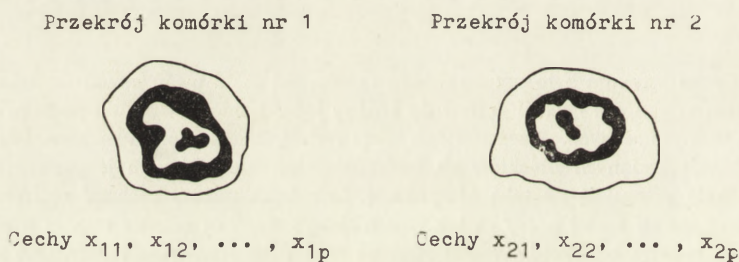
Streszczenie. Celem artykułu było przedstawienie możliwości zastosowań metod matematycznych, a zwłaszcza analizy skupień i teorii grafów do analizy jąder komórkowych na podstawie ich wybranych cech morfologicznych. Przedstawiono wiele metod, dzięki którym możliwa jest automatyczna klasyfikacja badanych obiektów na podstawie charakteryzujących je parametrów. Proponowane metody pozwalają na taką klasyfikację, że różnice między cechami morfologicznymi jąder należących do tej samej grupy są jak najmniejsze, natomiast różnice między utworzonymi grupami — jak największe. Przedstawiono również najczęściej stosowane i przydatne miary podobieństwa oraz kryteria klasyfikacji, zwracając uwagę na ich ograniczenia. Podano przykład klasyfikacji tymocytów na podstawie cech morfologicznych ich jąder. Wskazano także na przydatność tych metod do przygotowania ostatecznych sposobów automatycznego rozpoznawania obrazów w procesie diagnostycznym.

Summary. The work aims at presenting possible applications of mathematical methods, of agglomeration analysis and graph theory in particular, in analysis of cell nuclei, based on some morphological traits of the nuclei. Several methods have been presented, permitting automatic classification of studied objects on grounds of parameters the show. Suggested methods provide such classification that differences in morphological traits between cell nuclei of the same category are small while differences between categories are most pronounced. Moreover, most frequently used and most useful indices of similarity and classification criteria have been discussed, with particular attention paid to their limitations. An example of thymocyte classification based on morphological properties of their nuclei has been given. Suitability of such methods for development of automated image analysis for diagnostic purposes has been indicated.

1. WPROWADZENIE

W praktyce diagnostycznej oraz pracy doświadczalnej często zachodzi konieczność dokładnego opisu morfologicznego komórek i rozstrzygnięcia, czy obrazy ich przekrojów różnią się np. od pewnego modelu. Dotyczy to szczególnie tych przypadków, w których obraz badanej komórki należy porównać z jednym bądź wieloma wzorcami. W trakcie opisu morfologicznego zwraca się uwagę na wielkość i kształt komórki, rozmieszczenie organeli, wielkość i kształt jąder komórkowych, rozmieszczenie chromatyny jądrowej, stosunek objętości jądra do objętości cytoplazmy i inne cechy. Wartości liczbowe tych cech potrzebne są do analizy badanej populacji komórek w wielowymiarowej przestrzeni cech.

Założmy, że komórki badanej przez nas populacji opisane są przez p cech. Oznaczmy obserwowane wartości cech komórki nr 1 przez $x_{11}, x_{12}, \dots, x_{1p}$, komórki nr 2 przez $x_{21}, x_{22}, \dots, x_{2p}$, a wartości cech komórki nr i przez $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip}$. W ten sposób każdej komórce możemy przyporządkować wektor cech. Wartości tych cech będziemy również traktować jako współrzędne punktu reprezentującego pewną komórkę w wielowymiarowej przestrzeni cech. Im mniejsze będą różnice między wartościami mierzonych cech, tym bliżej siebie będą położone punkty reprezentujące badane komórki w przestrzeni cech (rys. 1). A zatem spróbujmy określić odległość między nimi.



Rys. 1. Przekroje dwóch komórek opisanych przez p cech oraz ilustracja graficzna odległości między nimi w trójwymiarowej przestrzeni cech dla wybranych 3 cech

2. ODLEGŁOŚĆ W PRZESTRZENI CECH

Jako odległość między obiektem i oraz j określimy nieujemną liczbę rzeczywistą $d(i, j)$, spełniającą następujące warunki:

- a) $d(i, j) = 0$ dla $i = j$,
- b) $d(i, j) = d(j, i)$,
- c) $d(i, k) \leq d(i, j) + d(j, k)$.

Jak wynika z tego określenia, odległość (metrykę) można definiować poprzez różne formuły, gdyż każda funkcja, która dowolnej parze elementów przyporządkowuje nieujemną liczbę rzeczywistą, spełniającą wymienione warunki, jest w istocie odległością.

Jeśli przestrzeń cech oparta jest na ortogonalnym układzie współrzędnych, to można stosować odległość Minkowskiego określoną następującym wzorem:

$$(2.1) \quad d(i, j) = \left[\sum_{k=1}^p |x_{ik} - x_{jk}|^m \right]^{1/m}.$$

Szczególnym przypadkiem jest odległość euklidesowa ($m = 2$), określona następującym wzorem:

$$(2.2) \quad d(i, j) = \sqrt{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2}.$$

Odległość ta jest często stosowana mimo jej wad. Jedną z nich jest nieuwzględnienie różnic skal między poszczególnymi cechami. Przykładowo, jeśli niektóre cechy będą wyrażone liczbami rzędu 10^4 , a inne liczbami rzędu 10^{-6} , to cechy o niskich wartościach nie będą mieć wpływu na wartość obliczanej odległości, a z punktu widzenia diagnostycznego mogą być one równie ważne, jak inne cechy. Warto więc wtedy zastosować uogólnioną odległość euklidesową

$$(2.3) \quad d(i, j) = \sqrt{\sum_{k=1}^p w_k^2 (x_{ik} - x_{jk})^2},$$

gdzie w_k jest wagą przypisywaną cesze k .

Często bardzo przydatna jest odległość Manhattan (bardzo szybka w obliczeniach komputerowych),

$$(2.4) \quad d(i, j) = \sum_{k=1}^p |x_{ik} - x_{jk}|,$$

która jest również szczególnym przypadkiem odległości Minkowskiego ($m = 1$).

Jeszcze inną wersją odległości Minkowskiego jest odległość Czebyszewa ($m \rightarrow \infty$), określona następującym wzorem:

$$(2.5) \quad d(i, j) = \max_k |x_{ik} - x_{jk}|.$$

Wszystkie opisane tu metody definiowania odległości [11] są często stosowane, gdyż wynikają z przyzwyczajenia do geometrii euklidesowej. Należy jednak pamiętać, że wolno je stosować wtedy, gdy przestrzeń cech jest ortogonalna. Nie zawsze jednak tak jest. Często niektóre cechy są ze sobą skorelowane, a zatem można je wyrazić jako kombinacje liniowe innych cech. Oznacza to, że w p -wymiarowej przestrzeni cech osie współrzędnych nie są wzajemnie prostopadłe; taki układ jest nieortogonalny. Zgodnie natomiast z twierdzeniem Pitagorasa odległość euklidesowa może być stosowana jedynie do ortogonalnych układów współrzędnych. Wad tych pozbawiona jest odległość Mahalanobisa [1], opisana wzorem

$$(2.6) \quad d(i, j) = z^T C^{-1} z,$$

gdzie C oznacza macierz kowariancji cech, z jest wektorem różnic $(\bar{x}_{i1} - \bar{x}_{j1}, \bar{x}_{i2} - \bar{x}_{j2}, \dots, \bar{x}_{ip} - \bar{x}_{jp})$.

W przypadku układu ortogonalnego macierz kowariancji staje się diagonalna i odległość Mahalanobisa odpowiada uogólnionej odległości euklidesowej. Odległość Mahalanobisa może być również miarą odległości między próbkami w przestrzeni cech. Jeśli dwie próbki traktujemy jako realizację p -wymiarowej zmiennej losowej o rozkładzie normalnym $N(\mu^{(i)}, \Sigma)$, gdzie

$$\mu^{(i)} = (\mu_1^{(i)}, \dots, \mu_p^{(i)}) \quad \text{dla } i = 1, 2,$$

oraz elementy pierwszej próby oznaczymy przez x_{ij} ($i = 1, \dots, n; j = 1, \dots, p$), a elementy drugiej próby przez y_{ij} ($i = 1, \dots, m; j = 1, \dots, p$), to odległość Mahalanobisa między próbkami obliczamy według wzoru

$$(2.7) \quad D_p^2 = r^T C^{-1} r,$$

gdzie $r = (\bar{x}_1 - \bar{y}_1, \bar{x}_2 - \bar{y}_2, \dots, \bar{x}_p - \bar{y}_p)$ jest wektorem różnic między średnimi grupowymi poszczególnych cech w każdej z próbek, a C jest macierzą kowariancji wewnątrzgrupowych, obliczanych według wzoru

$$c_{ij} = \frac{1}{n+m-2} \left[\sum_{l=1}^n (x_{li} - \bar{x}_i)(x_{lj} - \bar{x}_j) + \sum_{l=1}^m (y_{li} - \bar{y}_i)(y_{lj} - \bar{y}_j) \right],$$

gdzie n — oznacza liczebność 1 próbki, m — liczebność 2 próbek, $i, j = 1, 2, \dots, p$.

Niemniej jednak obliczanie odległości Mahalanobisa jest bardzo niewygodne. Z tego powodu lepiej stosować inne metryki, np. znormalizowaną odległość euklidesową [4],

$$(2.8) \quad d(i, j) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2}{\sum_{k=1}^p x_{ik}^2 \sum_{k=1}^p x_{jk}^2}},$$

brać prostą w obliczeniach i mającą własność samonormalizacji odległość Camberra [11]:

$$(2.9) \quad d(i, j) = \sum_{k=1}^p \frac{|x_{ik} - x_{jk}|}{|x_{ik} + x_{jk}|}.$$

Omówione tu metryki nie wyczerpują oczywiście wszystkich możliwości, m. in. dlatego, że dotyczą przestrzeni cech typu R^p . Dość często obiekty charakteryzowane są przez cechy mogące przyjmować wartość 0 (brak pewnego objawu) lub 1 (zauważono określony objaw), a więc przestrzeń cech jest przestrzenią binarną. W takiej przestrzeni można obliczać odległość Haminga [9, 11],

$$(2.10) \quad d(i, j) = \sum_{k=1}^p x_{ik} \oplus y_{jk},$$

gdzie \oplus oznacza sumę modulo 2.

Stosując ten wzór, zliczamy liczbę niejednakowych współrzędnych w wektorach cech opisujących obiekty i oraz j .

Inną definicję odległości w przestrzeni binarnej podali Marczewski i Steinhaus. Jest ona określona [7] wzorem

$$(2.11) \quad d(i, j) = \frac{a + b - 2w}{a + b - w},$$

gdzie a oznacza liczbę jedynek w opisie obiekcie i , b jest równe liczbie jedynek w opisie obiekcie j , natomiast w jest liczbą jedynek występujących na tych samych miejscach (wartości tych samych cech) w wektorach cech opisujących obiekty i oraz j .

Uogólnieniem tego wzoru w przypadku cech wielowartościowych (odpowiednio wyskalowanych) jest odległość obliczana według następującej formuły [7]:

$$(2.12) \quad d(i, j) = \frac{\sum_{k=1}^p |x_{ik} - x_{jk}|}{\sum_{k=1}^p \max(|x_{ik}|, |x_{jk}|, |x_{ik} - x_{jk}|)}.$$

Na podstawie przedstawionych tutaj rozważań można zauważyć, że decydujący wpływ na wybór sposobu obliczania odległości w przestrzeni cech mają m. in. wartości tych cech oraz ortogonalność w przestrzeni cech.

3. GRUPOWANIE OBIEKTÓW WIELOCECHOWYCH

Mając określoną metrykę (odległość) w przestrzeni cech można dokonać grupowania obiektów. Pojęcie grupowania obiektów można definiować różnie. Najczęściej pojęciem tym określa się podział zbioru obiektów na podzbiory, których

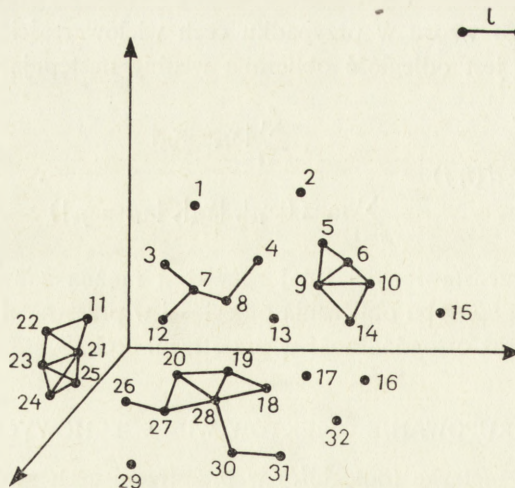
elementy są do siebie zbliżone pod względem charakteryzujących je cech, przy czym różnice między elementami zbioru, należącymi do tej samej grupy, powinny być jak najmniejsze, natomiast różnice między utworzonymi grupami jak największe. Grupowanie obiektów musi spełniać dwa zasadnicze warunki: musi być podziałem wyczerpującym (tzn. każdy obiekt musi należeć do pewnej grupy, w skrajnym przypadku jej liczebność może być równa 1) oraz podziałem rozłącznym (tzn. każdy obiekt może należeć tylko do jednej grupy).

Wiele technik grupowania, opartych na wielozmiennej analizie statystycznej, określanych jako metody analizy skupień, umożliwia automatyczny proces grupowania oraz w znacznym stopniu ułatwia interpretację uzyskanych wyników, mimo że są one obciążone pewną dozą subiektywizmu, bowiem zadaniem badacza jest dobór zmiennych, przyjęcie odpowiedniej funkcji podobieństwa (odległości), kryterium podziału grupy, a czasem nawet określenia liczby grup. W analizie skupień badamy zbiór punktów w przestrzeni wielowymiarowej, których współrzędne odpowiadają wartościom obserwowanych cech [2]. Dokonując podziału tego zbioru traktujemy go jako całość, w której należy znaleźć grupy obiektów podobnych. W tym celu dla n obiektów opisanych przez p cech tworzymy macierz funkcji podobieństwa (macierz odległości) między wszystkimi możliwymi parami obiektów. Postać tej macierzy jest następująca:

$$D = (d_{ij}) = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & \dots & d_{1n} \\ d_{21} & d_{22} & \dots & d_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ d_{n1} & d_{n2} & \dots & d_{nn} \end{bmatrix}.$$

Macierz ta umożliwia wykonanie procesu grupowania.

Podziału obiektów na grupy obiektów podobnych można dokonać nie tylko



Rys. 2. Graf podobieństwa obiektów w trójwymiarowej przestrzeni cech (wartość l jest równa wartości progowej odległości między obiektami)

za pomocą metod analizy skupień, lecz również za pomocą teorii grafów [6, 9, 10, 12]. Przykładem takiego grupowania może być konstrukcja grafu realizowana w następujący sposób: dla zbioru n punktów (reprezentujących obiekty) ustalono pewną wartość progową l . Wówczas dwa punkty i, j będą w tej samej grupie, gdy odległość $d(i, j) < l$, przy czym $d(i, j)$ może być dowolną metryką (rys. 2). Zatem obliczając odległości między punktami utworzymy macierz podobieństwa P , której elementy p_{ij} będą następujące:

$$p_{ij} = \begin{cases} 1, & \text{gdy } d(i, j) < l, \\ 0 & \text{w przeciwnym wypadku.} \end{cases}$$

Macierz podobieństwa P reprezentuje graf podobieństwa, w którym krawędź łączy wierzchołki i, j tylko wówczas, gdy $p_{ij} = 1$. Grupowania obiektów można również dokonać za pomocą innego grafu. Stosując algorytm najmniejszej odległości można znaleźć minimalne drzewo, którego krawędzie łączą elementy zbioru (zwane również dendrytem), [3, 8, 10]. Mając utworzone minimalne drzewo można przystąpić do podziału jego wierzchołków na grupy w następujący sposób: usuwając najdłuższą krawędź otrzymujemy dwie grupy, usuwając następną — trzy grupy itd. Eliminując kolejno najdłuższe krawędzie realizujemy procedurę podziału drzewa na poddrzewa reprezentujące podgrupy obiektów podobnych. Krawędzie drzewa eliminujemy dotąd, dopóki ich długość (równa odległości między obiektami, które łączy) przekracza ustaloną wartość progową l (rys. 3).

Ustalenie wartości progowej l jest bardzo istotne dla ostatecznych wyników. Można tutaj zaproponować kilka wersji obliczania wartości progowych na podstawie elementów macierzy odległości (6, 7).

Jeśli

$$d = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \min_{i \neq j} d(i, j)$$

oraz

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\min_{i \neq j} d(i, j) - d)^2,$$

to wartość progową l można ustalić według jednego z następujących wzorów:

$$(3.1) \quad l = d,$$

$$(3.2) \quad l = d - \frac{1}{2}s,$$

$$(3.3) \quad l = d + \frac{1}{2}s,$$

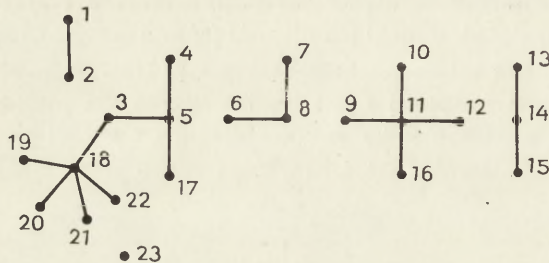
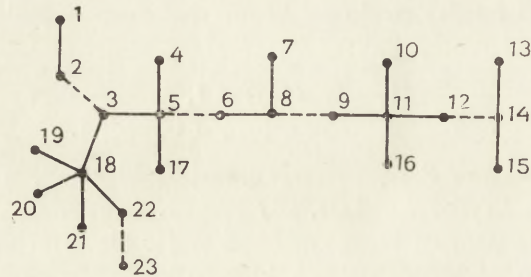
$$(3.4) \quad l = d + s,$$

$$(3.5) \quad l = \max_j \min_i d(i, j), \quad i \neq j,$$

$$(3.6) \quad l = d + u_a s / \sqrt{n},$$

gdzie u_a jest wartością zmiennej losowej u o rozkładzie normalnym $N(0,1)$, spełniającej warunek $P(u < u_a) = 1 - \alpha$.

Można również na podstawie macierzy odległości badać wszystkie podziały zbioru n obiektów na 2, 3, ..., $n-1$ grup, które powstają przez odrzucenie odpo-



Rys. 3. Grupowanie obiektów poprzez usuwanie krawędzi drzewa minimalnych odległości, których długość (równa odległości między obiektami w przestrzeni cech) przekracza ustaloną wartość progową l

wiednio 1, 2, ..., $n-2$ krawędzi drzewa minimalnego. Spośród wszystkich badanych podziałów na r grup wybiera się jako optymalny ten, dla którego suma kwadratów wewnątrzgrupowych SW_r jest najmniejsza [5]. Sumę tę obliczamy według wzoru

$$(3.7) \quad SW_r = \frac{1}{n_j} \sum_{(i,k) \in C} d^2(i, k),$$

gdzie r oznacza liczbę grup, C_j — zbiór wszystkich możliwych par (i, k) dla $i < k$ będących numerami obiektów należących do grupy j , a n_j — liczbę obiektów w grupie j ($j = 1, 2, \dots, r$).

Podział ten ma zapewnić również największą sumę kwadratów między grupami SM_r , obliczaną według wzoru

$$(3.8) \quad SM_r = \frac{1}{n} \sum_{(i,k) \in C_0} d^2(i, k) - SW_r,$$

gdzie C_0 jest zbiorem wszystkich możliwych par, które można utworzyć z liczb naturalnych 1, 2, ..., n dla $i < k$.

Dla badanych podziałów oblicza się także wartość funkcji

$$(3.9) \quad F = \frac{n-r}{r-1} \frac{SM_r}{SW_r},$$

traktowanej jako kryterium wyboru optymalnej liczby grup (im wyższa wartość F , tym lepszy podział).

Metodę tę można jednak stosować dla niezbyt dużych zbiorów obiektów, których liczebność jest równa ok. 50. Opisana tu metoda może być stosowana zarówno dla odległości euklidesowych, jak i Mahalanobisa. W przypadku analizy większych zbiorów obiektów, między którymi obliczano odległość Mahalanobisa, różnice między grupami można testować za pomocą statystyki T^2 Hotellinga [1]. Statystyka ta wyraża się poprzez odległość D^2 Mahalanobisa wzorem

$$(3.10) \quad T^2 = \frac{nm}{n+m} D^2,$$

gdzie n oznacza liczebność jednej, a m liczebność drugiej grupy.

Wartość statystyki F oblicza się według następującego wzoru:

$$(3.11) \quad F = \frac{n+m-p-1}{(n+m-2)p} T^2.$$

Statystyka ta ma rozkład $F(p, n+m-p-1)$.

Jak wynika z przedstawionych rozważań, klasyfikując obiekty za pomocą metod analizy skupień bądź teorii grafów warto ten sam zbiór grupować przynajmniej dwoma sposobami (np. ustalając dwie wartości progowe), porównać wyniki i wybrać te, które najlepiej odzwierciedlają rzeczywistość.

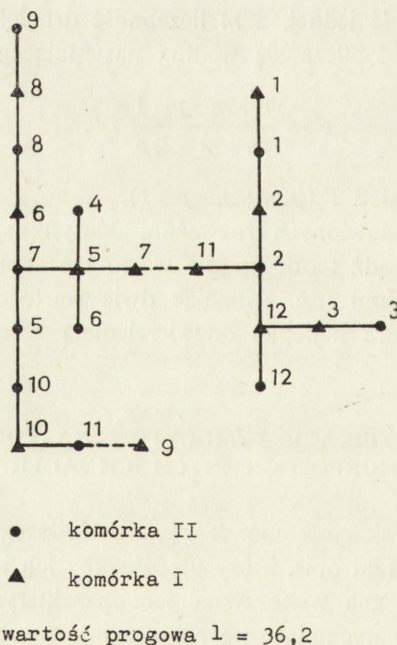
4. SPOSÓB KLASYFIKACJI TYMOCYTÓW NA PODSTAWIE CECH MORFOLOGICZNYCH ICH JĄDER

Podjęcie próby klasyfikacji komórek wymaga bliższego poznania ich właściwości pozwalających na taki opis, który umożliwiłby ich jednoznaczne określenie. W wielu komórkach można wykorzystać ich charakterystyczne cechy morfologiczne, pozwalające na natychmiastowe rozpoznanie (np. wielkość i kształt ziarnistości wydzielniczych w komórkach przysadki mózgowej). Niemniej jednak nie wszystkie komórki mają takie cechy, np. tymocyty. Z tego powodu ich klasyfikacja morfologiczna stwarza wiele trudności. Dowodem tego może być fakt, że mimo

wykazania metodami immunohistochemicznymi wielu ich typów, ocenia się je najczęściej na podstawie ich wielkości. Równocześnie tymocyty, a zwłaszcza ich jądra, ze względu na ich mało skomplikowaną budowę, wydają się doskonałym materiałem do zilustrowania metody grupowania opartej na algorytmie podziału drzewa minimalnego.

Spróbujmy prześledzić, jak zmieniają się obrazy przekrojów wybranych trzech jąder tymocytów. Każde z tych jąder obserwowano na kilkunastu skrawkach seryjnych (12–16 skrawków w zależności od wielkości jądra). Na każdym przekroju jądra zmierzono następujące cechy: pole i obwód przekroju jądra oraz pole i obwód wewnętrznego obrysu chromatyny skondensowanej na przekroju jądra. A zatem każdej komórce limfoidalnej grasicy przyporządkowano wektor cech postaci $(x_{i1}, x_{i2}, x_{i3}, x_{i4})$, gdzie x_{i1} — pole przekroju jądra komórki nr i , x_{i2} — obwód tego przekroju, x_{i3} — pole chromatyny skondensowanej na przekroju jądra komórki nr i , x_{i4} — obwód wewnętrznego obrysu chromatyny skondensowanej na tym przekroju.

Korzystając z wektorów cech przyporządkowanych przekrojom tymocytów, utworzono macierz znormalizowanych odległości dla przekrojów jąder I i II, a następnie dla przekrojów I i III. Odległość między nimi w 4-wymiarowej przestrzeni

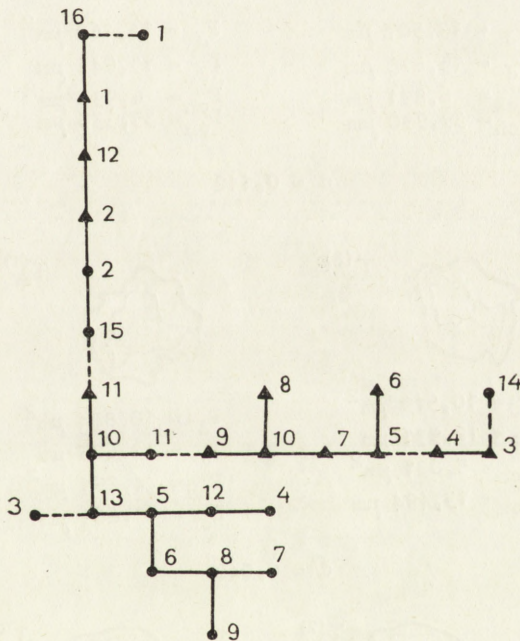


Rys. 4. Drzewo minimalnych odległości utworzone dla przekrojów komórek o zbliżonych wartościach cech (linią przerywaną zaznaczono krawędzie drzewa o długości przekraczającej wartość progową l)

cech obliczano według wzoru następującego:

$$d(i, j) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^4 (x_{ik} - x_{jk})^2}{\sum_{k=1}^4 x_{ik}^2 \sum_{k=1}^4 x_{jk}^2}}$$

Na podstawie macierzy znormalizowanych odległości euklidesowych utworzono drzewo minimalne przekrojów dwóch jąder I i II (rys. 4) oraz drzewo minimalne przekrojów jąder I i III (rys. 5). Obliczono również dla każdego drzewa wartości progowe l według wzoru (3.6) i eliminując krawędzie drzewa łączące te wierzchołki, między którymi odległość przekraczała wartość progową l , dokonano podziału drze-



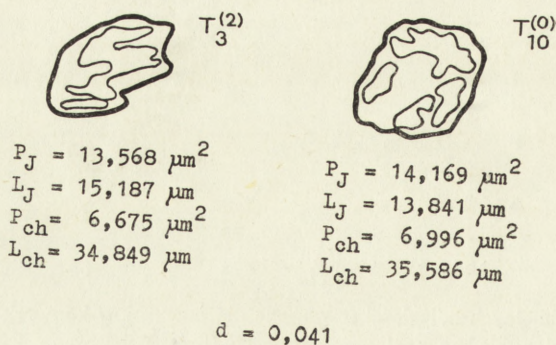
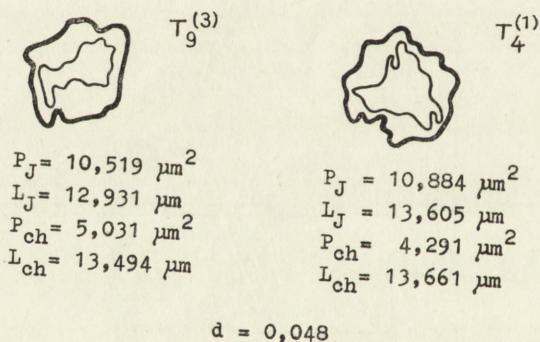
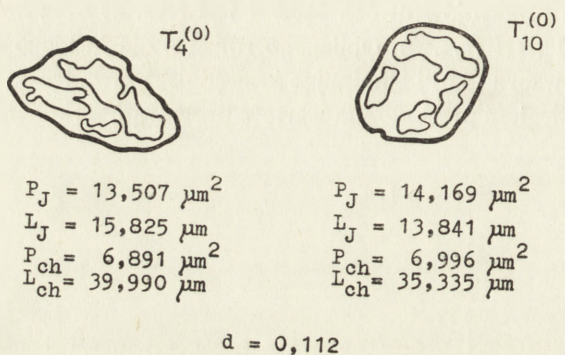
● komórka III

▲ komórka I

wartość progowa $l = 106,1$

Rys. 5. Drzewo minimalnych odległości utworzone dla przekrojów komórek znacznie różniących się między sobą pod względem analizowanych cech (linią przerywaną zaznaczono krawędzie drzewa o długości przekraczającej wartość progową l)

wa na poddrzewa. W ten sposób drzewo minimalne, utworzone dla przekrojów jąder I i II, podzielono na 2 większe grupy i 1 jednoelementową. W jednej z wyróżnionych grup skupione są wierzchołki reprezentujące przekroje zbliżone do przekrojów stycznych (numery 1, 2, 3, 11, 12), natomiast w drugiej grupie, w bliskim sąsiedztwie znajdują się wierzchołki odpowiadające przekrojom centralnym obu jąder oznaczonych numerami od 4 do 7, a następnie przekrojom o numerach od 8 do 10. Ponadto w drzewie tym nie sąsiadują ze sobą wierzchołki reprezentujące przekroje z tego samego jądra, przeciwnie sąsiadują ze sobą wierzchołki odpowia-



Rys. 6

dające przekrojom z obu jąder. Nasuwa się więc wniosek, że jądra te są podobne do siebie pod względem analizowanych cech. Inną postać ma drzewo minimalne, utworzone dla przekrojów jąder I i III (rys. 5). W tym drzewie wyróżniono 7 grup wierzchołków, wśród których 3 grupy są jednoelementowe oraz dwie małe grupy (o liczebności równej 2 oraz 3).

W jednej z wyróżnionych większych grup znajdują się wierzchołki reprezentujące centralne przekroje jednego jądra o numerach 5–10, w drugiej grupie również wierzchołki reprezentujące centralne przekroje (numery 4–13), lecz drugiego jądra. W kolejnej grupie sąsiadują ze sobą wierzchołki reprezentujące przekroje zbliżone do stycznych przekrojów obu jąder komórkowych (numery tych przekrojów są równe 1, 2, 12, 15, 16). Stąd można wnioskować, że jądra tych komórek różnią się między sobą, zwłaszcza w centralnych poziomach, a jedynie niektóre przekroje, zbliżone do przekrojów stycznych, są podobne. Na podstawie tych dwóch przykładów można by spodziewać się, że w tej samej grupie nie mogą znaleźć się przekroje podobne z jąder o różnej budowie morfologicznej. Nie jest to prawda.

Na rys. 6 przedstawiono przekroje jąder, których cechy mają wartości zbliżone, a które pochodzą z jąder o różnej budowie morfologicznej. Związane to jest z anizotropową budową jąder oraz zależnością obrazu jądra od kąta jego cięcia. Szczegółową analizę tego zjawiska przedstawiono w rozdziale dotyczącym analizy anizotropowości jąder komórkowych. Można jednak tutaj dodać, że przekroje zbliżone do paracentralnych poziomów jąder anizotropowych mogą być zbliżone do przekrojów centralnych jąder izotropowych. Zatem wyniki klasyfikacji mogą być wiarygodne tylko wówczas, gdy są oparte na wartościach cech przekrojów centralnych bądź na podstawie trójwymiarowej rekonstrukcji jąder.

5. WYKORZYSTANIE WYNIKÓW KLASYFIKACJI KOMÓREK W PROCESIE DIAGNOSTYCZNYM

W procesie diagnostycznym każdy obiekt opisany jest przez wektor cech postaci $(x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip})$, gdzie $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip}$ oznaczają wartości cech opisujących obiekt i . Poprawny dobór tych cech w znacznym stopniu ułatwia proces diagnostyczny. Niemniej jednak liczba cech nie może być zbyt duża, ponieważ nie tylko utrudnia, lecz często uniemożliwia poprawne rozpoznawanie nieznanymi obiektów. Klasyfikując zatem zbiór n obiektów, należy go opisać co najmniej poprzez $0,1n$ cech.

Wyniki klasyfikacji można wykorzystać w dalszych badaniach jako tzw. zbiór uczący, zakładając, że grupy (klasy) obiektów znajdują się — z punktu widzenia rozważanego zadania — w tym samym znanym stanie. Zbiór ten musi być jednak reprezentatywny, tzn. jego łączna liczebność wystarczająco duża, poszczególne klasy powinny zawierać elementy charakterystyczne dla określonych grup obiektów i liczebności ich powinny być proporcjonalne do częstości występowania obiektów charakterystycznych dla poszczególnych grup.

Zadanie rozpoznawania rozwiązywane jest przez wiele algorytmów i omówienie wszystkich przekraczałoby ramy tego opracowania. Ograniczmy się jedynie do wskazania ogólnych zasad, na których opiera się pewna część tych algorytmów. W tym celu wprowadzimy pojęcie centroidu. Centroidem pewnego zbioru (klasy) obiektów jest punkt, którego współrzędnymi są wartości średnie tych obiektów [7]. Współrzędne tego punktu możemy więc traktować jako współrzędne wektora cech modelu określonej klasy. Dzięki temu rozpoznajemy nieznaną obiekt porównując współrzędne wektora cech nieznanego obiektu ze współrzędnymi wektora cech modelu określonej klasy. W proponowanym zadaniu rozpoznawania każda klasa reprezentowana jest zarówno przez model, jak i wyznaczoną w trakcie wcześniejszego podziału wartość progową l . Wówczas nieznaną obiekt zaliczany jest do tej grupy, do której należy jego „najbliższy sąsiad” — model, o ile odległość między nimi nie przekracza wartości progowej przyporządkowanej tej klasie, którą reprezentuje wybrany model. Jeśli takiego modelu nie znajdziemy, należy utworzyć nową klasę, której przyporządkowujemy nieznaną obiekt.

Uwzględniając zarówno zalety, jak i wady proponowanych tutaj metod analizy podobieństw i różnic między komórkami należy dodać, że ich stosowanie może być bardzo pomocne w przygotowaniu ostatecznych metod automatycznego rozpoznawania obrazów. Wymaga to jednak jeszcze dużego nakładu pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARTKOWIAK A., Podstawowe algorytmy statystyki matematycznej, PWN, Warszawa 1979.
- [2] BAUDHUIN P., LEROY-HOUYET M. A., QUINTART J., BERTHET P., Application of cluster analysis for characterization of spatial distribution of particles by stereological methods, *J. Microsc.*, **15**: 1–17, 1979.
- [3] BENTLEY J. L., OTTMANN Th., The power of a one-dimensional vector of processors, w dziele zbiorowym *Graphtheoretic concepts in computer science*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1981.
- [4] FRANK J., The role of correlation techniques in computer image processing, [w] *Computer processing of electron microscope images*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1980.
- [5] HARABASZ J. S., KAROŃSKI M., Dendrytowa metoda analizy skupień, *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Algorytmy biometryczne i statystyczne*, **XCV (6)**: 135–148, 1977.
- [6] KACZMAREK E., KALISZEWSKA M., The use of graph theory in analysis of cells and cell nuclei in particular, *Gegenbaurs morph. Jahrb.*, Leipzig, **129(4)**: 437–444, 1983.
- [7] KUCHARCZYK J., Algorytmy analizy skupień w języku Algol 60, PWN, Warszawa 1982.
- [8] KUCHARCZYK J., SYSŁO M., Algorytmy optymalizacji w języku Algol 60, PWN, Warszawa 1975.
- [9] REINGOLD E. M., NIEVERGETT J., DEO N., Algorytmy kombinatoryczne, PWN, Warszawa 1985.
- [10] SOBCZAK W., MALINA W., Metody selekcji informacji, WNT, Warszawa 1978.

- [11] TADEUSIEWICZ R., Metody rozpoznawania obrazów w diagnostyce, [w] Komputerowe przetwarzanie sygnałów diagnostycznych. Materiały VI Szkoły Diagnostyki, Poznań—Rydzyń, 215–261, 1983.
- [12] WILSON R. J., Wprowadzenie do teorii grafów, PWN, Warszawa 1985.

Otrzymano 20 IX 1986.

Przyjęto 25 IX 1986.

Adres autorów: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa—Książka—Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa—Książka—Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleciodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpoznania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

TREŚĆ

E. BARTKOWIAK, Metody embriologii eksperymentalnej i hybrydyzacji somatycznej w otrzymywaniu mieszańców międzygatunkowych u roślin	1
J. BARTMAŃSKA, Aktualne poglądy na proces odnowy i różnicowania komórek macierzystych nabłonka plemnikotwórczego ssaków	17
E. KACZMAREK, J. B. WARCHOŁ, Analiza podobieństw i różnic między obrazami jąder komórkowych na przykładzie jąder komórek limfoidalnych grasicy	33