

Cytometria przepływowa — zastosowanie w biotechnologii zwierząt

Zdzisław Smorąg

Michał Bochenek

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt

Instytut Zootechniki

Balice k. Krakowa

1. Wprowadzenie

Cytometria przepływowa to metoda dokonywania pomiarów cech komórek za pomocą urządzenia zwanego cytometrem przepływowym, w którym przepływają one pojedynczo w strumieniu cieczy przez promień światła i punkt analizy. W zależności od przyjętej metody barwienia istnieje możliwość analizowania żywych komórek i — jeśli cytometr jest wyposażony w sorter — rozdzielania badanej populacji na dwie, jednorodne pod względem danej cechy, grupy. Takie możliwości urządzenia wykorzystuje się, np. przy próbach rozdzielania nasienia ssaków na frakcje zawierające plemniki X oraz Y w celu uzyskania potomstwa o pożądanej płci. Cytometr przepływowy jest doskonałym przykładem połączenia w jednym urządzeniu najnowszych osiągnięć z dziedziny na pierwszy rzut oka dość odległych od siebie. Do „oświetlania” próbki wykorzystuje się tu niewielkie nowoczesne lasery o stałej lub regulowanej mocy i długości światła; precyzyjne soczewki i wielowarstwowe filtry separują pożądaną długość fali emisji, która jest następnie wychwytywana i wzmacniana przez bardzo czułe fotopowielacze. Układ hydropneumatyczny pozwala tak ukształtować i podzielić strumień z analizowanymi komórkami, żeby w jednej kropli umieścić jedną cząsteczkę. Całym urządzeniem sterują komputery z przyjaznym dla użytkownika oprogramowaniem.

Początki cytometrii przepływowej sięgają lat trzydziestych, kiedy to Moldavan (16) skonstruował aparat do zliczania komórek, w którym przepływające szklaną kapilarą cząsteczki były rejestrowane przez fotoelement zamocowany na okularze mikroskopu. Problemy z utrzymaniem laminarnego przepływu cieczy z komórkami i mała dokładność odczytu spowodowały zaniechanie prac nad rozwojem urządzenia. Na przełomie lat czterdziestych i pięć-

dziesiątych, kiedy pojawiło się większe zainteresowanie możliwościami automatycznego zliczania komórek krwi, Wallace Coulter opracował szeroko później stosowane urządzenie zwane 'Model A' Coulter Counter (15). Działało ono na zasadzie odczytu różnicy w przewodnictwie elektrycznym między komórką a otaczającym ją medium. Na podstawie charakterystyki sygnału elektrycznego można było nie tylko liczyć cząsteczki, ale określać ich wielkość i kształt. Coulter ciągle udoskonalał swe urządzenie wypuszczając nowe modele, tak że z biegiem lat jego „liczniki” stopniowo zaczęły wypierać z laboratoriów „ręczne” metody liczenia ciałek krwi.

Problemy związane z przepływem badanych komórek doczekały się rozwiązania w 1953 r., kiedy to Crosland-Taylor (3) zaproponował tzw. ogniskowanie hydrodynamiczne, stosowane z powodzeniem do dzisiaj w nowoczesnych cytometrach. Umieścił on strumień z analizowanymi komórkami w drugim, osłonowym, strumieniu cieczy. W układzie takim płyn zewnętrzny pełni rolę szklanej kapilary, ma jednak nad nią tę przewagę, że manipulując ciśnieniem „osłony” można dowolnie regulować średnicę płynu rdzeniowego. Wyeliminowaniu ulega również w ten sposób bardzo uciążliwa tendencja do zatykania kapilary przez duże cząsteczki (np. zanieczyszczenia) znajdujące się w próbce. Również w 1953 r. Parker i Horst (15) opatentowali urządzenie zliczające komórki wybarwione różnicowo. W ich aparacie można było analizować próbkę krwi z białymi ciałkami zabarwionymi na niebiesko i czerwonymi o kolorze „wzmocnionym” odpowiednim barwnikiem. Liczenia dokonywano za pomocą dwóch fotoelementów, z których każdy reagował na inną długość światła.

Przełom w rozwoju cytometrii nastąpił w połowie lat sześćdziesiątych, kiedy Louis Kamensky z Columbia University skonstruował system, w którym badał równocześnie absorpcję światła przez kwasy nukleinowe w paśmie ultrafioletowym oraz rozproszenie widzialnego światła przez badane komórki (12). W aparacie tym cząsteczki przemieszczały się w kanale ułożonym pod kątem prostym do wiązki światła — układ taki jest stosowany dzisiaj w nowoczesnych cytometrach laserowych. Kamensky wprowadził również jako pierwszy obrazowanie i analizę wyników cytometrycznych w formie dwuwymiarowego histogramu.

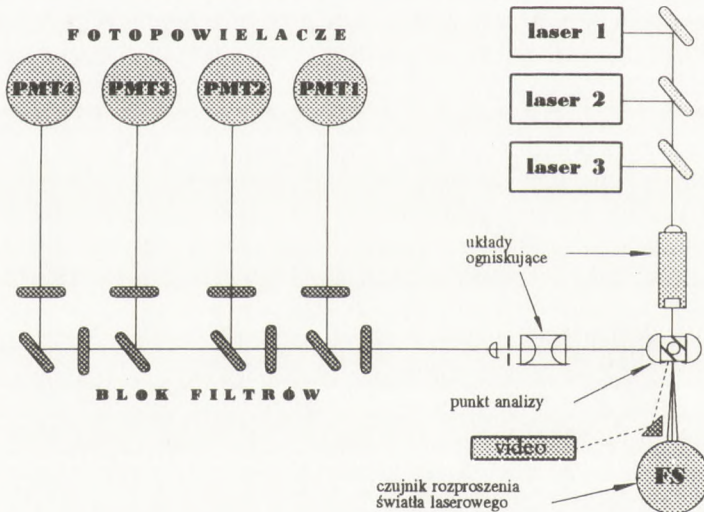
Bardzo stymulujące dla rozwoju cytometrii przepływowej stały się próby wykorzystania tej metody do diagnozowania chorób nowotworowych. Oparto się przy tym na fakcie, że pewne typy komórek nowotworowych cechuje nadbarwność spowodowana nienormalną ilością DNA, istniała zatem możliwość zidentyfikowania takich komórek za pomocą metod fotometrycznych. We wspomnianych badaniach opierano się zarówno na zjawisku naturalnej absorpcji światła ultrafioletowego przez kwasy nukleinowe, jak i na właściwościach pewnych barwników wiązanych przez DNA.

Pod koniec lat sześćdziesiątych skonstruowano aparat (24), który swymi wzajemnie prostopadłymi osiami iluminacji, detekcji i przepływu, laminarną komorą Crosland-Taylora, a także laserem jako źródłem światła bardzo przypominał już dzisiejsze urządzenia.

Współczesne cytometry przepływowe są bardzo wyrafinowanymi pod wzglę-

dem technicznym urządzeniami o dużych możliwościach badawczych. Dobrym przykładem możliwości analitycznych tych instrumentów jest model *Epics Elite* firmy COULTER. Cytometr ten umożliwia równoczesną analizę nawet sześciu różnych parametrów komórkowych z maksymalną szybkością 15 000 komórek/s (w rzeczywistości jednak wolniej) i pozwala rozdzielać ok. 1000 badanych cząsteczek w ciągu sekundy. Urządzenie to posiada standardowo dwa lasery — 488nm i 633nm (istnieje możliwość dobudowania trzeciego, np. lasera UV) oraz sorter. Cztery lub pięć fotopowielaczy (czyli „czytników” emitowanej przez komórkę fluorescencji) pracuje w zakresie 200-800nm i pozwala odczytać parametry komórki o średnicy 0,5 μ m i zawartości zaledwie 1000 molekuł barwnika; całość nadzorują dwa współpracujące ze sobą komputery (rys. 1).

Osobnym, stanowiącym właściwie oddzielną gałąź wiedzy, zagadnieniem cytometrii przepływowej są barwniki fluorescencyjne (fluorochromy). Są one traktowane jako swego rodzaju znaczniki pozwalające uzyskać precyzyjne informacje o strukturze, funkcjonowaniu i zmianach patologicznych komórek. Działanie barwników polega na absorpcji przez nie promieniowania świetlnego (lasera lub lampy łukowej), elektrony cząsteczek barwnika są „wybijane” na wyższe orbitale, a następnie powracają na orbital podstawowy, oddając pochłoniętą energię w postaci fluorescencji. W trakcie procesu barwienia cząsteczki fluorochromu łączą się specyficznie z pewnymi składnikami komórki, tak że ilość barwnika (a zarazem intensywność fluorescencji komórki) jest proporcjonalna do zawartości tego składnika. Właściwości niektórych barwników DNA podano w tab. 1.



Rys.1. Schemat działania cytometru przepływowego (Coulter Epics Elite).

TABELA 1
CHARAKTERYSTYKA NIEKTÓRYCH BARWNIKÓW
WYKORZYSTYWANYCH DO ANALIZ KWASÓW NUKLEINOWYCH

Barwnik	Powinowactwo barwnika	Długość fali przy której następuje:	
		maks. absorpcji (nm)	maks. emisji (nm)
Hoechst 33342	DNA (preferuje wiązania AT)	340	450
DAPI	DNA (preferuje wiązania AT)	350	470
mitramycyna	DNA (preferuje wiązania GC)	450	570
chromomycyna A3	DNA (preferuje wiązania GC)	450	560
jodek propydyny	RNA, DNA w formie podwójnej nici	536	623
bromek etydyny	RNA, DNA w formie podwójnej nici	510	595
orańż akrydynowy	kwasy nukleinowe	480	520
pyronina Y	RNA	550	570
orańż tiazolowy	RNA	450	480

Istnieje kilka cech, które powinien posiadać każdy dobry barwnik. Są nimi:

- wysoka zdolność absorpcji promieniowania wzbudzającego,
- wysoka wartość emisji promieniowania przez cząsteczki barwnika połączone z docelowym składnikiem komórki,
- dogodna długość fali emisji promieniowania (nie nakładająca się na ewentualną autofluorescencję komórki),
- duża fotostabilność barwnika — powinien przetrwać od 10 tys. do 100 tys. wzbudzeń, zanim ulegnie degradacji,
- możliwie najkrótszy (ok. 1 ns) okres trwania w stanie wzbudzonym — im krótszy ten czas, tym więcej cykli „wzbudzenie/emisja” zachodzi w trakcie przechodzenia przez punkt odczytu cytometru.

Przy ocenie poszczególnych parametrów komórki (takich jak: cechy błon komórkowych, zawartość kwasów nukleinowych, jonów Ca^{2+} , pH, itp.) istnieje do wyboru co najmniej kilka różnych barwników. Różnią się one między sobą miejscem „przyczepu” do badanego składnika, długością fali absorpcji i emisji, zdolnością barwienia komórek martwych lub żywych, itp. Wybór właściwego barwnika zależy zatem od rodzaju posiadanego lasera oraz od tego, co dokładnie chce się zbadać. Dobrą ilustracją tego problemu mogą być barwniki kwasów nukleinowych (tab. 1): np. Hoechst 33342, preferujący pary AT w cząsteczce DNA penetruje błony żyjących komórek — nadaje się zatem do analiz DNA powiązanych z sortowaniem komórek (dla dalszej ich hodowli), wymaga jednak użycia lasera UV. Chromomycyna preferuje wiązania GC w łańcuchu DNA i jest wykorzystywana, w połączeniu z Hoechstem 33342, do analiz chromosomalnych. Jodek propydyny natomiast jest barwnikiem mniej specyficznym (jego cząsteczki „wstawiają” się między zasady podwójnej nici kwasów nukleinowych), nie przenikającym do wnętrza żywych komórek. Jego zaletą jest możliwość wzbudzenia standardowym w cytometrii laserem 488nm niskiej mocy. Kolejny barwnik, orańż akrydynowy, ma właściwości metachromatyczne

— przyłączony do RNA lub zdenaturowanego DNA emituje światło w paśmie czerwonym, a przyłączony do helisy DNA — w paśmie zielonym.

Od momentu pojawienia się przeciwciał monoklonalnych oczywista stała się ich przydatność jako znaczników dla cytometrii przepływowej. W bardzo dużym skrócie idea polega na tym, że istnieje możliwość (przynajmniej teoretycznie) wyprodukowania przeciwciał skierowanych przeciw dowolnej substancji znajdującej się w komórce. Jeśli dodatkowo oznakuje się takie przeciwciała barwnikami fluorescencyjnymi, to powstały układ antygen-przeciwciało jest łatwy do zidentyfikowania w cytometrze przepływowym. Przykładem takiej reakcji jest analiza DNA za pomocą analogu tymidyny — bromodeoksyurydyny (BrdUrd). W trakcie reakcji „barwienia” cząsteczki BrdUrd są wstawiane w komórkowe DNA w miejsce tymidyny, następnie w wyniku działania przeciwciał skierowanych na BrdU i znakowanych fluoresceiną (FITC) tworzy się kompleks BrdU-przeciwciało+FITC; źródłem fluorescencji w takim kompleksie jest FITC. Reakcja ta, wraz z równoczesnym barwieniem za pomocą jodku propydydny, jest wykorzystywana przy analizowaniu kinetyki cykli komórkowych.

Wyniki analizy cytometrycznej są przedstawiane za pomocą histogramów. W najprostszej swej postaci są to po prostu wykresy, gdzie na osi X jest odkładana intensywność fluorescencji, a na osi Y liczba komórek. Bardziej skomplikowane histogramy dwuparametryczne są trójwymiarowe — na osiach X i Y są zaznaczone dwa wybrane parametry komórkowe, a na osi Z liczba badanych cząsteczek. Za pomocą oprogramowania można uzyskać pełną statystyczną informację o dowolnym regionie histogramu. Należy zauważyć, że na podstawie histogramu nie można uzyskać bezpośrednich danych np. o rozmiarze bądź strukturze powierzchni komórek. Cytometr wskazuje tylko intensywność fluorescencji, bądź stopień rozproszenia światła lasera. Wielkość, czy strukturę powierzchni można określić porównując na histogramie ich wartości z odczytami pewnych standardów. Takimi standardami mogą być inne komórki o znanych kształtach i wielkości, bądź sztucznie wytworzone cząsteczki (kuleczki) o znanej i jednakowej średnicy oraz wykazujące stałą fluorescencję.

2. Zastosowanie cytometrii przepływowej do analizy cyklu komórkowego (7)

Poznanie cytokinetycznych cech komórkowych jest bardzo istotne w wielu badaniach biologicznych, biomedycznych i biotechnologicznych. Obecnie istnieje już szereg technik cytometrycznych, które umożliwiają uzyskanie wymienionych informacji, dotyczących komórki. Omówimy pokrótce te metody, ich zastosowania i aktualne wyniki. Dla jasności prezentacji wyników postuluje się wyodrębnienie czterech stanów cytokinetycznych, w których mogą się znajdować komórki:

1. Proliferacji, kiedy komórki są zdolne do tworzenia klonów (PC).
2. Proliferacji, jednak bez zdolności komórek do tworzenia klonów (PD).

3. Braku aktywności proliferacyjnej, jednak z możliwością tworzenia klonów (QC).

4. Braku aktywności proliferacyjnej oraz braku zdolności do tworzenia (QD).

Komórki wykazujące aktywną proliferację przechodzą przez cztery fazy oznaczone jako G1, S, G2 i M. W tym czasie następuje replikacja DNA oraz podziały komórkowe.

Analiza cytokinetyczna obejmuje oznaczanie ilościowe rozkładu komórek w obrębie wymienionych faz i stanów oraz zakres, w jakim zmieniają one te stany. Cytometria przepływowa umożliwia uzyskanie informacji cytokinetycznych odnoszących się do subpopulacji komórek w fazie G1, S, G2 i M, subpopulacji wykorzystujących aktywną proliferację w całej populacji, subpopulacji komórek zdolnych do tworzenia klonów, czas tworzenia poszczególnych faz oraz stopień syntezy DNA w jakim komórki wchodzą lub opuszczają stan proliferacji ze zdolnością (lub bez) tworzenia klonów.

W ostatnich piętnastu latach opracowano wiele metod pozwalających na uzyskanie tych informacji. Obejmują one:

1. Analizę zawartości DNA umożliwiającą identyfikację subpopulacji komórek znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego.

2. Użycie cytometrii przepływowej i sortowania do monitorowania cyklu komórkowego komórek znakowanych prekursorami DNA, tj. bromodeoksyurydynam (BrdUrd) lub tymidynam (3H-TdR).

3. Analizę wieloskładnikową, umożliwiającą cytokinetyczną ocenę subpopulacji różniących się ze względu na cechy cytometryczne.

3. Zastosowanie cytometrii przepływowej i sortowania w cytogenetyce i genetyce molekularnej (26)

3.1. Zastosowanie cytometrii przepływowej w cytogenetyce

Cytometria przepływowa umożliwiła powstanie nowej specjalności badawczej tzw. cytogenetyki przepływowej. Wykorzystuje ona możliwości tej metody dla klasyfikacji i oczyszczenia chromosomów, które są izolowane z komórek mitotycznych. Klasyfikacja chromosomów może się odbywać na podstawie szeregu kryteriów, a mianowicie: zawartości DNA, zawartości białka oraz kształtu. Jest szczególnie przydatna do określania ilości wykrywania chromosomów w komórce. Pozwala także na dokładne ich izolowanie za pomocą sortera. Wyizolowane chromosomy są odpowiednim materiałem do mapowania genów, analizy zawartości białek oraz jako źródło DNA do produkcji bibliotek rekombinowanego DNA. Ciężar molekularny DNA ekstrahowanego z sortowanych chromosomów jest dostatecznie wysoki, aby był odpowiedni do analizy przy użyciu elektroforezy żelowej w polu pulsacyjnym. Daje to możliwość kon-

strukcji dużego fragmentu map wyselekcjonowanych chromosomów. Narzędziami stosowanymi dla klasyfikacji i izolowania chromosomów są: pojedyncze i podwójne sortery laserowe, cytometria skaningowa oraz szybkie sortery.

Cytometry wyposażone w pojedynczy laser są na ogół używane do klasyfikacji i izolacji chromosomów barwionych fluorochromami specyficznymi dla DNA takimi jak Hoechst 33258, jodek propydydy, bromek etydydy czy chromomycyna. W metodzie tej chromosomy są klasyfikowane według intensywności fluorescencji, którą emitują w czasie przepływu przez wiązkę laserową o długości odpowiedniej dla wydajnego wzbudzenia barwnika.

3.2. Zastosowanie cytometrii przepływowej w genetyce molekularnej

Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach dotyczących genetyki molekularnej wynika z funkcji analitycznych oraz możliwości sortowania. Metody analityczne oparte na cytometrach przepływowych mogą być wykorzystane w badaniach dotyczących zarówno izolowanych chromosomów, jak i ilościowego oznaczania cząsteczek zlokalizowanych na powierzchni lub wewnątrz komórki, a kodowanych przez określone geny. Natomiast sortowanie znajduje zastosowanie do mapowania sekwencji DNA w odniesieniu do ich lokalizacji na chromosomie, a także do tworzenia bibliotek genów specyficznych dla danego chromosomu.

Biblioteki genów są ważnym narzędziem w genetyce molekularnej. Stanowią one wyjściowy materiał, z którego fragmenty DNA zawierające komplet genów lub ich fragmenty są izolowane. Łatwiej bowiem izolować gen z bibliotek specyficznych dla chromosomów niż z całej biblioteki genów. Jest to podstawowy problem w badaniach nad strukturą genu oraz jego ekspresją. Biblioteki genów są także ważne dla genetyki medycznej. Stanowią bowiem bogate źródło specyficznych dla chromosomu sond stosowanych w badaniach polimorfizmu DNA związanego z locus określonej genetycznej choroby. Stwarza to możliwość diagnozowania choroby w przypadkach, kiedy brak jest objawów chorobowych, ale osoba należy do grupy osób zwiększonego ryzyka.

Cytometria przepływowa wykorzystywana jest też w badaniach genów, które kodują cząsteczki na powierzchni komórki. Znajdują tutaj zastosowanie fluorescencyjnie znakowane sondy specyficzne dla cząsteczek powierzchniowych. Przykładem są geny kodujące antygeny zgodności tkankowej, które można identyfikować używając fluorescencyjnych przeciwciał monoklonalnych. Cytometria przepływowa i sortowanie umożliwiają badania nie tylko genów systemu immunologicznego, ale również genów, których produkt w postaci białka pojawia się na powierzchni komórki, jak np. receptory dla czynników wzrostowych. Przy użyciu wymienionych metod mogą być także badane geny, których produktem są białka cytoplazmatyczne.

Kolejnym obszarem zastosowania cytometrii przepływowej w genetyce są badania dotyczące onkogenów. Genom ludzki zawiera sekwencje DNA, określane jako protoonkogeny komórkowe lub alkogeny C. Wspomniane sekwencje

DNA są analogiczne do sekwencji występujących w retrowirusach charakteryzujących się właściwościami onkogennymi u innych gatunków zwierząt, np. u ptaków. Protoonkogeny są obecnie bardzo intensywnie badane, gdyż mogą odgrywać główną rolę w karcinogenezie u ludzi. Jak wiemy powstawaniu genów u człowieka towarzyszy często przeorganizowanie chromosomów, nie da się zatem wykluczyć możliwości, że w procesy te mogą być zaangażowane protoonkogeny.

Ważne zastosowanie ze względu na dużą szybkość analizy znajduje cytometria przepływowa w badaniach nad opracowaniem nowych metod wykrywania mutacji i analizy mutagenyzy. Trzeba bowiem pamiętać, że badania nad mutagenezą związane są z wykrywaniem bardzo rzadko występujących przypadków. Aby je rozpoznać niezbędne jest przeprowadzenie analizy na olbrzymich, bo miliardowych populacjach komórek.

Ponadto w tych badaniach wykorzystywana jest inna zaleta cytometrii przepływowej, którą jest zdolność do badania korelacji wielu składników komórkowych. Jest to istotne zwłaszcza w sytuacjach, kiedy dwa lub trzy składniki komórkowe są ściśle skorelowane z określonymi zjawiskami mutagennymi. W badaniach nad mutagenezą hodowanych *in vitro* komórek dzięki sortowaniu cytometrycznemu możliwy jest rozdział komórek o różnych fenotypach, co nie wymaga stosowania selektywnych warunków wzrostu. Przy użyciu cytometrii przepływowej i sortowania komórek mogą być badane następujące zjawiska:

- pojawienie się amplifikacji genu,
- określenie stale mutagennych uszkodzeń w somatycznych komórkach organizmu. Ponieważ istnieje związek między mutagenezą i karcinogenezą, zatem pomiary takie służyłyby określeniu korelacji między obciążeniem mutagennym a ryzykiem występowania choroby nowotworowej.
- określenie liczby zmutowanych komórek somatycznych. Komórki mogą być znakowane przeciwciałami wiążącymi zmodyfikowane na skutek mutacji białka. Nawet białka, które różnią się w swej strukturze tylko pojedynczymi aminokwasami, mogą być różnicowane za pomocą odpowiednich specyficznych przeciwciał,
- wykrywanie glikoprotein na powierzchni czerwonych ciałek, czyli tzw. glikoforezy A.

4. Zastosowanie cytometrii przepływowej w mikrobiologii (15,24)

Dotychczasowy udział cytometrii przepływowej w badaniach mikrobiologicznych jest stosunkowo niewielki. Jednakże możliwości rozwiązywania wielu problemów mikrobiologii na drodze analizy poszczególnych komórek w bardzo dużej populacji są znaczne. Podstawowe ograniczenie zastosowania cytometrii przepływowej w tych badaniach wynika z dużych rozmiarów wielu drobnoustrojów. Większość prac cytometrycznych z zakresu mikrobiologii dotyczyła

badania na drożdżach i bakteriach. Drożdże z technicznego punktu widzenia są łatwiejsze do badania ze względu na rozmiary ich komórek i zawartość DNA, chociaż jest ona i tak około 200 razy niższa niż w diploidalnych komórkach człowieka. Dotychczas przy użyciu cytometrii przepływowej badano cykl komórkowy drożdży na podstawie zawartości DNA, RNA oraz białek. Pomiar takie są również możliwe u pierwotniaków, alg i pleśni. Przedstawiamy prace dotyczące użycia cytometrii przepływowej w bakteriologii zarówno dla badań podstawowych, jak i stosowanych. Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach podstawowych dotyczy głównie prac nad kinetyką cyklu komórkowego oraz mechanizmów regulujących wzrost i replikację komórek. Cykl komórkowy bakterii nie jest tak dobrze poznany jak cykl komórkowy ssaków ze względu na większy stopień jego skomplikowania i większą zależność od warunków wzrostu. Ponadto brak na razie odpowiednich metod badawczych. Stąd też wiele podstawowych problemów dotyczących wzrostu i rozmnażania bakterii nie zostało jeszcze rozwiązanych. W badaniach nad *Escherichia coli* przeprowadzonych przy użyciu cytometrii przepływowej wykazano, że dotychczasowa wiedza w tym zakresie musi być w wielu punktach zmodyfikowana. Wykazano, że powtarzalność rezultatów bardziej zależy od warunków wzrostu, niż ma to miejsce w przypadku komórek ssaków. Wykazano również, że barwienie DNA bakterii zależne jest w pewnym stopniu od stanu fizjologicznego komórek w momencie rozpoczynania badań.

W bakteriologii klinicznej cytometria przepływowa może zastąpić czasochłonne metody wykrywania i identyfikacji bakterii w ocenie stopnia infekcji, czy testowania podatności na antybiotyki.

Metoda cytometrii przepływowej może być użyta do monitorowania rozwoju bakterii oraz innych mikroorganizmów biorących udział w procesach przemysłowych, czy też występujących w formie kontaminacji, np. w wodzie, oleju, itp.

Ze względu na niewielkie rozmiary i małą zawartość DNA do pomiarów cytometrycznych bakterii niezbędne są bardzo czułe instrumenty. Barwnikami stosowanymi w badaniach DNA bakterii jest bromek etydyliny oraz jodek propydyliny. Barwniki te wykazują jednak pewne powinowactwo do RNA, którego zawartość w komórkach bakterii może być wyższa niż u ssaków. Dlatego też fluorescencja związana z RNA „zacierza” na histogramie sygnał pochodzący z DNA. Wynika stąd konieczność użycia wysoko specyficznych barwników DNA, takich jak Hoechst 33258, DAPI czy mitramycyna. Innym powodem uzyskiwania nieczytelnych histogramów jest niesferyczny kształt komórek wielu szczepów bakterii. Niezależnie od trudności związanych z cytometrycznymi badaniami bakterii, na podstawie uzyskanych wyników wykazano także możliwość uzyskania histogramów DNA charakteryzujących się wysoką rozdzielczością. Generalnie jednak perspektywy stosowania cytometrii przepływowej w bakteriologii są uwarunkowane dostępnością odpowiedniego instrumentu. Cytometria przepływowa była też używana w wirusologii. Badano za jej pomocą interakcję wirus-komórka. Prace te przeprowadzono na parawirusach i SV40. Były one możliwe dzięki wyprodukowaniu monoklonalnych i poliklonalnych przeciwciał specyficznych białek wirusowych.

Użycie analizy wieloskładnikowej dało możliwość porównania, korelacji, analizy populacji, analizy pojedynczej komórki pod względem zawartości białek wirusowych oraz całego szeregu cech w zainfekowanej populacji komórkowej.

5. Zastosowanie cytometrii przepływowej do analizy i sortowania gamet

Cytometria przepływowa z uwagi na swe wielorakie funkcje analityczne znajduje zastosowanie w badaniach dotyczących gamet, głównie męskich. Są one związane m. in. z próbami rozdziału nasienia samców zwierząt gospodarskich na frakcję „męską” i „żeńską”, poszukiwaniem nowych, bardziej precyzyjnych kryteriów oceny zdolności zapładniającej nasienia oraz badaniami nad spermatogenezą. W znacznie mniejszym zakresie podejmuje się próby wykorzystania cytometrii do prac dotyczących gamet żeńskich oraz zarodków ryb.

5.1. Zastosowanie cytometrii przepływowej do rozdziału nasienia na frakcję „męską” i „żeńską”

Idea wykorzystania cytometru przepływowego do rozdziału nasienia według „płci” opiera się na stwierdzeniu, że u większości ssaków ilości DNA w plemnikach niosących chromosomy X i Y różnią się o 3-5%. Według badań Johnsona i Clarka (9) różnice zawartości DNA plemników samców trzech głównych gatunków zwierząt gospodarskich, tj. buhaja, knura i tryka wynoszą odpowiednio 3,9, 3,7 i 4,2 %. Przed dokonaniem rozdziału DNA zawarte w plemnikach barwi się związkami fluorescencyjnymi.

Metodę cytometrii przepływowej do sortowania nasienia barwionego fluorochromami zaczęto stosować w latach osiemdziesiątych. Najpierw Pinkel i współ. (20) stwierdzili możliwość pomiaru oraz różnice zawartości DNA w plemnikach ssaków w zależności od ich „płci”. Wymienieni autorzy barwili utrwalone plemniki kilku gatunków ssaków przy użyciu bromku etydyny, mitramycyny lub DAPI. Keeler i współ. (14) zastosowali do barwienia plemników, na potrzeby analizy cytometrycznej, fluorochrom Hoechst 33342. Związek ten jest obecnie stosowany we wszystkich badaniach związanych z przyżyciową analizą cytometryczną plemników ssaków. Pierwszymi autorami, którzy dokonali rozdziału nasienia samców zwierząt gospodarskich na populację zawierającą chromosom X lub Y byli Johnson i Clark (9). Poddawali oni analizie w cytometrze barwione fluorochromem Hoechst 33342 i pozbawione witek plemniki buhaja, knura i tryka. Dokonując powtórnej analizy cytometrycznej stwierdzili, że dokładność sortowania tak przygotowanych plemników wynosiła ponad 90%. Następnie autorzy ci przeprowadzali mikroiniekcję sortowanych plemników do oocytów chomika i stwierdzili ich aktywację, tzn. dekondensację i tworzenie męskiego przedjądrza. W kolejnych doświadczeniach Morrell i współ. (19) wykazali, że plemniki królika i buhaja mogą być barwione przyżyciowo fluoro-

chromem Hoechst 33342, a następnie analizowane cytometrycznie i rozdzielane na dwie podgrupy. Sortowane plemniki były ruchliwe i zachowały zdolność zapładniającą. W przypadku użycia nasienia buhaja uzyskano przesunięcie stosunku płci potomstwa zgodnie z zakładanym rezultatem. Chociaż liczba inseminowanych zwierząt była w tym doświadczeniu niewielka, to osiągnięta zmiana proporcji płci była statystycznie istotna. Trzeba jednak zaznaczyć, że płodność sortowanego nasienia była obniżona, gdyż w wyniku inseminacji wyliczono tylko ok. 30% krów. Głównym powodem niskiej płodności była prawdopodobnie zbyt mała liczba plemników w dawce inseminacyjnej, wynosząca około 5 mln. W przeciwieństwie do nasienia buhaja, w przypadku sortowanego nasienia królików zabieg ten nie miał wpływu na zmianę proporcji płci urodzonego potomstwa. Skutecznego rozdziału plemników królika dokonali jako pierwsi Johnson i współ. (10). Rozdzielali oni przy użyciu cytometru przepływowego świeże nasienie królika barwione fluorochromem Hoechst 33342. Reanaliza sortowanego nasienia wykazała, że dokładność separacji wynosiła 86% w przypadku plemników „żeńskich”, oraz 81% w przypadku „męskich”. Rozdzielone plemniki były wprowadzane chirurgicznie do macicy królic. Uzyskano ok. 28% wykotów, oraz niewielką średnią wielkość miotów, wynoszącą 3,9. Potomstwo urodzone po inseminacji frakcją nasienia wzbogaconą w plemniki z chromosomem X było w 94% płci żeńskiej, natomiast potomstwo po inseminacji „frakcją Y” w 81% było płci męskiej.

Możliwe jest również skuteczne separowanie nasienia knura. Wykazał to w swoich badaniach Johnson (11). Po barwieniu fluorochromem Hoechst 33342 nasienie było analizowane i sortowane w cytometrze przepływowym. Skuteczność rozdziału plemników oceniano na podstawie powtórnej analizy cytometrycznej sortowanych plemników oraz chirurgicznej inseminacji. Odsetek prosiąt płci żeńskiej po inseminacji „żeńską” frakcją nasienia wyniósł 74%, a płci męskiej po inseminacji „męskim” nasieniem — 68%.

W przedstawionych doświadczeniach nad rozdziałem nasienia ssaków dowiedziono, że istnieje realna możliwość „seksowania” plemników. Ponadto w trakcie tych badań uzyskano wiele informacji wskazujących dalsze kierunki doskonalenia metody, a także jej ograniczenia. Warunkiem uzyskania odpowiedniej wydajności i dokładności jest uwzględnienie całego szeregu czynników, które o tym decydują. Są to zarówno czynniki natury technicznej, związane z aparaturą, tj. odpowiednia moc lasera, prawidłowe formowanie kropli, stabilność przepływu, jak i cały szereg warunków związanych z przygotowaniem materiału do analizy cytometrycznej. Stwierdzono, że Hoechst 33342 jest związkami, który może być używany do barwienia dla potrzeb cytometrii przepływowej. Określone też zostały warunki jego stosowania (11,17,18,26). Podnoszone są pewne zastrzeżenia dotyczące jego szkodliwego wpływu na żywotność plemników knura (11), lecz nie znajdują one potwierdzenia w odniesieniu do plemników królika (18). W przypadku barwionych fluorochromem Hoechst 33342 plemników buhaja obserwowano wprawdzie nieznaczne obniżenie zdolności do zapłodnienia *in vitro* barwionych plemników, jednak nie dotyczyło ono wszystkich badanych ejakulatów. Zastrzeżenia dotyczące usz-

kodzeń chromosomów, jako rezultatu zapłodnienia barwionymi plemnikami, czy też wad potomstwa również nie znalazły potwierdzenia w badaniach Smořaga i współ. (22) oraz Morrella i Dressera (18). Ci pierwsi stwierdzili prawidłowość kariotypów blastocyst bydłych uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* nasieniem barwionym wspomnianym fluorochromem. Morrel i Dresser obserwując pięć pokoleń królików uzyskanych po inseminacji barwionym nasieniem wykazali, że ich rozwój nie różni się od obserwowanego w grupie kontrolnej. Dużym ograniczeniem cytometrii przepływowej jest stosunkowo niewielka szybkość analizy i sortowania plemników, wynosząca praktycznie około tysiąca komórek na sekundę, co dla potrzeb standardowej inseminacji nie wystarcza. Metoda może być natomiast w pełni przydatna do przygotowywania rozdzielonego nasienia dla potrzeb zapłodnienia *in vitro* (2). Szersze wykorzystanie cytometrii przepływowej do rozdziału plemników ze względu na płęć będzie zatem się wiązać ze zwiększeniem szybkości analizy, jej dokładności, oraz zmniejszeniem ceny cytometrów.

5.2. Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny nasienia oraz badań nad spermatogenezą

Cytometria przepływowa umożliwia szybkie uzyskanie informacji dotyczącej dużej populacji komórek. Stąd też w ostatnich latach podejmowane są próby jej zastosowania do analizy komórek plemnikowych z punktu widzenia oceny zdolności zapładniającej. Graham i współ. (6), w swoich badaniach porównywali standardową ocenę laboratoryjną nasienia buhaja z oceną przy użyciu cytometru i wykazali korelację między wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu obu tych metod. W konkluzji autorzy stwierdzili, że chociaż badania nasienia przy użyciu cytometru nie poprawiły dokładności oceny, to może być ona użyteczna w rutynowej analizie ze względu na krótki czas potrzebny do jej wykonania. Do podobnych wniosków doszli Garner i współ. (5). Poddawali oni analizie cytometrycznej barwione i mrożone nasienie buhajów. Oceniali stopień uszkodzenia błony cytoplazmatycznej oraz funkcjonowanie mitochondriów. Odsetek plemników z nienaruszoną błoną i mitochondriami był skorelowany dodatnio z niektórymi klasycznymi parametrami jakości nasienia, ale nie z jego płodnością ocenioną na podstawie niepowtarzalności inseminowanych krów. Dopiero kombinacja pomiarów jakości nasienia, tzn. testów standardowych i cytometrycznych, może dostarczyć więcej informacji dotyczących zdolności zapładniającego nasienia.

W kolejnych badaniach nad wykorzystaniem cytometrii do oceny nasienia Karabinus i współ. (13) skoncentrowali się na analizie struktury chromatyny plemników porównując ją jednocześnie z oceną uzyskaną przy użyciu mikroskopu świetlnego. W rezultacie przeprowadzonych badań autorzy ci doszli do przekonania, że cytometryczne pomiary struktury chromatyny plemników mogą być bardziej czułym wskaźnikiem różnic pomiędzy poszczególnymi próbkami nasienia. Z innych prób zastosowania cytometrii przepływowej do ba-

dania plemników na uwagę, zdaniem autorów, zasługuje określanie koncentracji plemników w nie rozcieńczonym i rozcieńczonym nasieniu (4). Koncentrację nasienia określono na podstawie zawartości DNA przy użyciu metody fluorometrycznej i cytometrii. Stwierdzono, że uzyskane wyniki były podobne. Zdaniem autorów metoda cytometryczna, jako czuła, dokładna i powtarzalna, może być stosowana w laboratoriach sztucznego unasienniania.

Podejmowano też próby zastosowania cytometrii przepływowej do badań spermatogenezy opierając się na pomiarach DNA (21). Określano w ten sposób poszczególne stadia rozwoju komórek plemnikowych w procesie spermatogenezy, w tym także ploidalność komórek. Można tu przy okazji wspomnieć o badaniach ploidalności 1- i 2-dniowych zarodków karpia (1). Podstawą kwalifikacji zarodków była zawartość DNA barwionego jodkiem propydydy. Zastosowana metoda jest prosta, szybka i dokładna, dlatego też jest korzystną alternatywą dla dotychczasowych technik.

6. Zastosowanie cytometrii przepływowej do izolacji pierwotnych pęcherzyków jajnikowych

Metoda cytometrii przepływowej została z powodzeniem użyta do uzyskiwania pierwotnych pęcherzyków jajnikowych (8). Po enzymatycznym trawieniu tkanki jajnikowej następuje oddzielenie uzyskanych pęcherzyków w gradiencie Percolu, po czym próbki były sortowane przy użyciu cytometru, w wyniku czego oddzielono pęcherzyki od zanieczyszczeń w postaci komórek somatycznych. Ze względu na dużą szybkość sortowania metoda ta jest polecana do uzyskiwania pierwotnych pęcherzyków jajnikowych na dużą skalę.

Literatura

1. Aldridge F. J., Marston R. Q., Shireman J. V., (1990), *Aquaculture*, 87, 121-131.
2. Cran D. G., Johnson L. A., Miller N. G. A., Cochrane D., Polge C., (1993), *Vet. Rec.*, 32, 40-41.
3. Crosland-Taylor P. J., (1953), *Nature*, 171, 37-38.
4. Fenton S. E., Ax R. L., Cowan C. M., Coyle T., Gilbert G. R., Lenz R. W., (1990), *J. Dairy Sci.*, 73, 3118-3125.
5. Garner D. L., Ericsson S. A., Thomas C. A., Marshall C. E., (1992), *Interrelationships of flow cytometric measurements and classical seminal quality determinations with fertility of cryopreserved bull semen*. Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod., Hague, vol. I, 467-469.
6. Graham J. K., Kunze E., Hammerstedt R. H., (1990), *Biol. Reprod.*, 43, 55-64.
7. Gray J. W., Dolbear F., Pallavicini M. G., (1990), *Quantitative Cell-Cycle Analysis*, in: *Flow Cytometry and Sorting*, Eds. Melamed M. R., Lindmo T., Mendelsohn M. L., Wiley-Liss, N.Y., 445-467.
8. Greenwald G. S., Moor R. M., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 561-571.
9. Johnson L. A., Clarke R. N., (1988), *Gamete Research*, 21, 335-343.
10. Johnson L. A., Flook J. P., Hawk H. W., (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 199-203.
11. Johnson L. A., (1991), *Reprod. Dom. Anim.*, 26, 309-314.
12. Kamensky L. A., Melamed M. R., Derman H., (1965), *Science*, 150, 630-631.

13. Karabinus D. S., Evenson D. P., Jost L. K. J., Baer R. K., (1990), *J. Dairy Sci.*, 73, 2364-2377.
14. Keeler K. D., Mackenzie N. M., Dresser D. W., (1983), *J. Reprod. Fertil.*, 68, 205-212.
15. Lehman J. M., Jacobberger J. W., (1990), *Virus-cell interactions analyzed with flow cytometry*, in: *Flow Cytometry and Sorting*, Eds. Melamed M. R., Lindmo T., Mendelsohn M. L., Wiley-Liss, N. Y., 623-631.
16. Melamed M. R., Mullaney P. F., Shapiro H. M., (1990), *An historical review of the development of flow cytometers and sorters*, in: *Flow Cytometry and Sorting*, Eds. Melamed M. R., Lindmo T., Mendelsohn M. L., Wiley-Liss, N.Y., 1-9.
17. Moldavan A., (1934), *Science*, 80, 188-189.
18. Morrel J. M., Dresser D. W., (1992), *Preparation of living sperm for DNA analysis by flow cytometry*, *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.*, Hague, vol.1, 496-498.
19. Morrell J. M., Dresser D. W., (1989), *Mutation Research*, 224, 177-183.
20. Morrell J. M., Keeler K. D., Noakes D. E., Mackenzie N. M., Dresser D. W., (1988), *Vet. Rec.*, 122, 322-324.
21. Pinkel D., Lake S., Gledhill B. L., van Dilla M. A., Stephenson D., Watchmaker G., (1982), *Cytometry*, 3, 1-9.
22. Smith A. J., Clausen O. P. F., Kirkhus B., Johnes T., Møller O. H., Hansson V., (1984), *J. Reprod. Fert.*, 72, 453-461.
23. Smorağ Z., Ryńska B., Kańska L., Słota E., (1993), *Animal Science, Papers and Reports*, 11, 117-120.
24. Steen H. B., (1990), *Flow cytometric studies of microorganisms*, in: *Flow Cytometry and Sorting*, Eds. Melamed M. R., Lindmo T., Mendelsohn M. L., Wiley-Liss, N. Y., 605-622.
25. van Dilla M. A., Trujillo T. T., Mullaney P. F., Coulter J. R., (1969), *Science*, 163, 1213-1214.
26. van Dilla M. A., Kamarek M. E., Lalande M., (1990), *Applications of flow cytometry and sorting to molecular genetics*, in: *Flow Cytometry and Sorting*, Eds. Melamed M. R., Lindmo T., Mendelsohn M. L., Wiley-Liss, N. Y., 563-603.
27. Went D. F., Kaiser J., (1992), *Separation of X- and Y-chromosome bearing sperm in rabbits*, *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.*, Hague, vol. III, 550-552.

Flow cytometry-application in animal biotechnology

Summary

Flow cytometry is a modern and relatively new analytical method applicable to individual cells or cell organelles. Flow cytometry offers several advantages over the formerly used methodologies — hundreds or thousands of cells can be measured per second with high accuracy and reproducibility, rare cells can be detected from a large population. Some of the staining methods preserve cell viability so the reproductive capacity of the sorted cells can be investigated. In biotechnology, the most popular application of flow cytometry is the DNA analysis e.g. cell cycle, chromosome karyotyping, gene mapping, etc. It is possible to analyse quality of semen and sorting of viable sperm cells.

Key words:

cytometry, cell, organelles, karyotyping, sperm.

Adres dla korespondencji:

Zdzisław Smorağ, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki, 32-083 Balice, k. Krakowa.