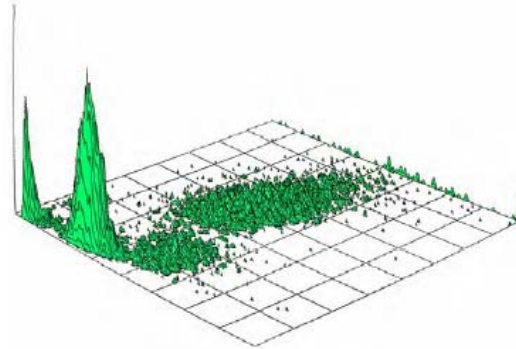


**MATERIAŁY POMOCNICZE
DO WYKŁADÓW Z PODSTAW BIOFIZYKI
IIIr. Biotechnologii
prof. dr hab. inż. Jan Mazerski**



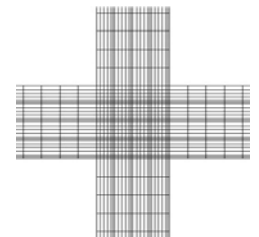
ZLICZANIE KOMÓREK

Wyznaczenie gęstości zawiesiny komórek jest kluczowym problemem w wielu zagadnieniach biologicznych i medycznych.

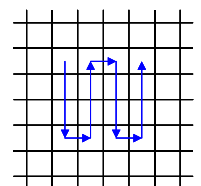
Zliczanie pod mikroskopem

Od dawna znana była i stosowana metoda bezpośrednia polegająca na ustaleniu pod mikroskopem liczby komórek zawartych w określonej objętości zawiesiny. Z czasem wypracowano odpowiednie wyposażenie dodatkowe mikroskopu, tzw. komory mikroskopowe, pozwalające na szybkie, powtarzalne i względnie wygodne zliczanie komórek pod mikroskopem. Konstrukcja poszczególnych typów komór dostosowana jest do odpowiedniego rodzaju komórek. Np. do liczenia erytrocytów i innych małych komórek stosuje się powszechnie tzw. komory Thoma.

Komora Thoma ma głębokość 0,1 mm i podzielona jest na 5 dużych kwadratów ułożonych w kształt krzyża. Środkowy z dużych kwadratów podzielony jest na 16 tzw. kwadratów grupowych z których każdy podzielony jest na 16 małych kwadratów. Mały kwadrat ma wymiar 0,05 mm i objętość 0,00025 mm³.



Ponieważ rozkład komórek w badanej zawieszynie nie jest zwykle równomierny, więc aby uzyskać wiarygodne wyniki należy policzyć komórki co najmniej w 40 ÷ 89 małych kwadratach. Zalecany jest przy tym określony schemat wyboru kwadratów w których dokonujemy zliczeń. Np. w obrębie danego kwadratu grupowego należy dokonać zliczeń we wszystkich tworzących go małych kwadratach przesuwanym się zgodnie z pokazanym obok schematem. Posługiwanie się takimi schematami ma za zadanie



ograniczyć do minimum błędy wynikające z subiektywnego, nielosowego doboru małych kwadratów. Praktyka pokazała, że dla uzyskania błędu mniejszego niż 10% należy zliczyć co najmniej 700 komórek.

Metoda zliczania pod mikroskopem chociaż jest metodą bezpośrednią i dosyć wiarygodną, to jednak posiada szereg uciążliwych wad. Do podstawowych z nich należą:

- czasochłonność pomiaru
- pracochłonność i duże zmęczenie personelu laboratoryjnego
- mała powtarzalność wyników wzrastająca wraz ze zmęczeniem personelu

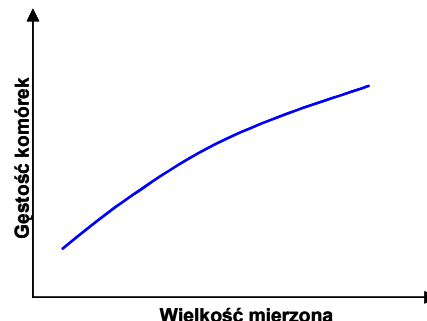
Dlatego też poszukiwano metod pośrednich, w których bezpośrednio zliczanie komórek zastąpione byłoby pomiarem wielkości proporcjonalnej do liczby komórek.

Metody pośrednie

Opracowano szereg metod pośrednich dostosowanych do różnych typów komórek. W chwili obecnej największe zastosowanie mają metody, w których mierzy się:

- **suchą masę komórek** – metody tego typu zastosowane mogą być tylko w przypadku komórek które są w stanie przetrwać co najmniej kilkuminutowy pobyt w wodzie. Muszą to więc być komórki posiadające ścianę komórkową: bakterie, drożdże, grzyby, algi itp.
- **zawartość białka** – zawiesinę komórek w bezbiałkowym podłożu, np. buforze o odpowiedniej sile jonowej, poddaje się lizie i oznacza zawartość białka metodami kolorymetrycznymi
- **światło rozproszone** – w takich metodach komórki mogą się znajdować w dowolnym, klarownym podłożu. Pomiar ma charakter nieniszczący i zawiesina po pomiarze może być dalej inkubowana

Wszystkie metody pośrednie wymagają wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Jej przygotowanie wymaga dla kilku (kilkunastu) próbek zawiesiny wyznaczenie gęstości komórek metodą bezpośrednią (zliczanie) i daną metodą pośrednią. Przez uzyskane punkty doświadczalne prowadzi się następnie linię kalibracyjną korzystając z metody najmniejszych kwadratów.



Wyznaczona linia kalibracyjna może być następnie wykorzystana w rutynowych pomiarach gęstości zawiesiny komórek. Przy każdej zmianie warunków prowadzenia doświadczenia: zmiana podłoża, rodzaju komórek itp. należy ponownie przeprowadzić procedurę kalibracyjną.

Liczniki komórek

W latach '60 XXw. pojawiły się pierwsze urządzenia służące do zliczania komórek. Były to tzw. **liczniki komórek**. Ich działanie opierało się na zliczaniu skokowych zmian wybranych parametrów roztworu pojawiających się gdy w „polu widzenia” licznika pojawiała się komórka. Po wielu próbach powszechne zastosowanie znalazły przyrządy, w których rejestrowano:

- przewodnictwo jonowe roztworu – technika Coultera
- natężenie światła przechodzącego – cytometry przepływowe.

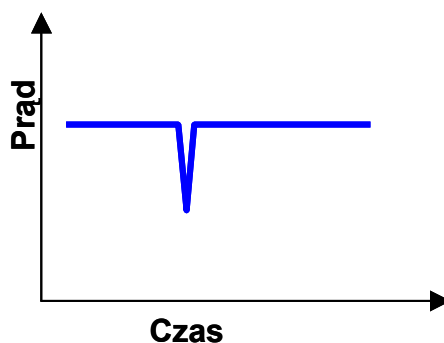
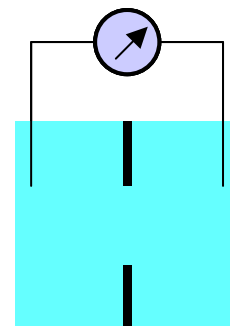
Rozwój układów elektronicznych i sprzężenie licznika komórek z komputerem uczyniło z nich bardzo użyteczne narzędzia badawcze. Współczesne liczniki komórek nie tylko zliczają komórki, ale określają również niektóre ich parametry.

Metoda Coultera

Rozważmy przepływ prądu jonowego przez mały otwór. Przy stałej różnicy potencjałów między elektrodami natężenie prądu zależy od:

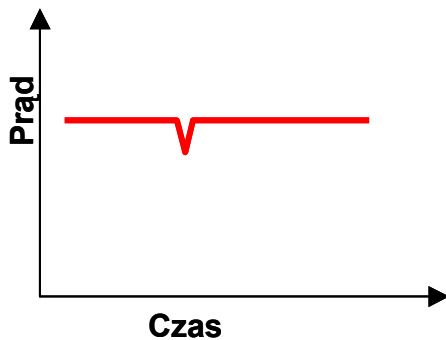
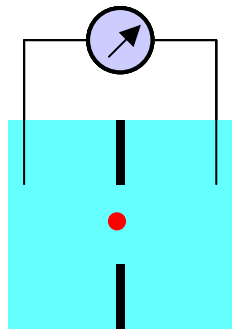
- rodzaju i stężenia elektrolitu
- efektywnego przekroju otworu.

Gdy w otworze znajdzie się obiekt nieprzewodzący, np. komórka, efektywny przekrój otworu ulega zmniejszeniu. W efekcie spada natężenie płynącego w obwodzie prądu. Gdy obiekt przejdzie przez otwór natężenie prądu wraca do wartości początkowej. Typowy przebieg zmian prądu w obwodzie pokazuje poniższy rysunek.

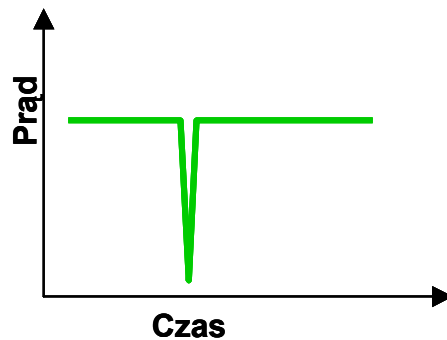
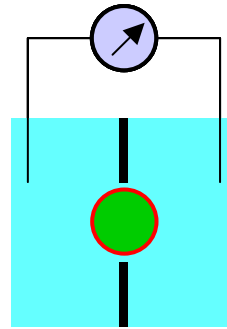


Stopień obniżenia natężenia prądu zależy przy tym od wzajemnej relacji średnicy otworu i wielkości komórki. W komercyjnych licznikach Coultera stosuje się wymienne naczynka pomiarowe o różnych średnicach otworów dostosowanych do różnych typów komórek.

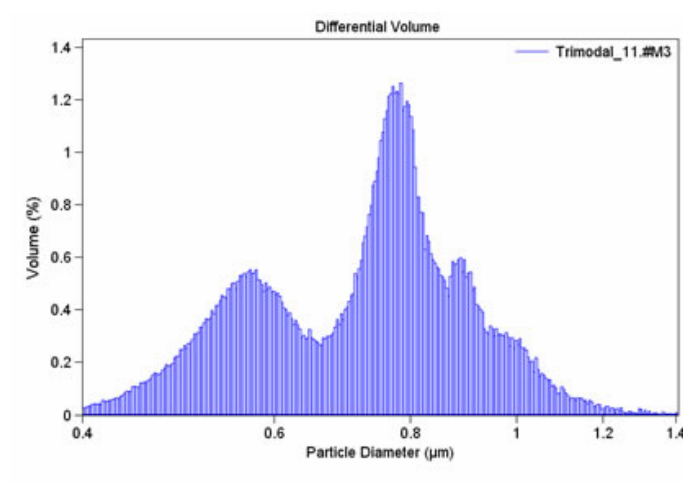
Mały obiekt



Duży obiekt



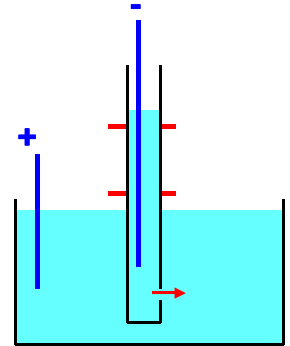
Układ elektroniczny sprzężony z głównym obwodem pomiarowym zlicza ilość takich spadków prądu oraz ich głębokość. Cyfrowa i statystyczna obróbka zapisanych impulsów pozwala uzyskać wiele dodatkowych informacji o analizowanej zawieszynie. Możliwe jest np. określenie jednorodności populacji komórek pod względem ich wielkości. Poniższy rysunek przedstawia przykład niejednorodnej zawieszynie zawierającej przynajmniej 3 różne subpopulacje komórek.



Licznik nie rozpoznaje obiektów przechodzących przez otwór, lecz tylko rejestruje fakt takiego przejścia. Tym samym rejestruje przejście nie tylko komórek (żywych lub martwych) ale również wszelkiego rodzaju „paprochów” obecnych w zawieszynie. Dlatego też wszystkie płyny wykorzystywane do pracy z licznikiem muszą być bardzo starannie filtrowane.

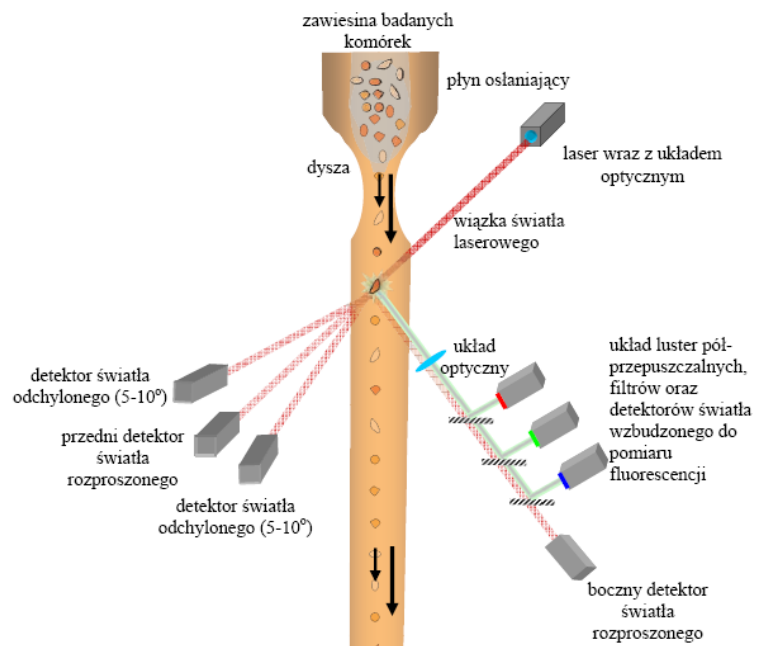
Aby uniknąć sytuacji, gdy w otworze znajdzie się więcej niż jedna komórka (byłoby to potraktowane jako pojawienie się jednej komórki o podwójnej wielkości) należy podczas pomiaru stosować bardzo rozcieńczone zawiesiny. Może to wymagać rozcieńczenia zawiesiny roboczej przed pomiarem na liczniku.

Podstawowym, nieelektronicznym elementem licznika Coultera jest próbówka z kalibrowanym otworkiem częściowo zanurzona w większym naczyniu zawierającym zawiesinę komórek w elektrolicie. W obu naczyniach zanurzone są platynowe elektrody. Przed pomiarem do próbówki zasysany jest roztwór, który następnie wypływa przez kalibrowany otwór. Pomiar rozpoczyna się, gdy menisk płynu w próbówce minie czujnik i kończy się, gdy menisk osiągnie drugi czujnik. Tym samym pomiar dotyczy zawsze określonej objętości roztworu, np. 1 ml, niezależnie od jej lepkości i gęstości.



Cytometr przepływowy

W cytometrze przepływowym wprowadzamy cienki, wolno płynący strumień zawiesiny do szybko, ale laminarnie płynącego roztworu roboczego. Strumień zawiesiny zostanie porwany przez roztwór roboczy i utworzy cienki stabilny i ściśle osiowy strumień komórek. W komorze roboczej przyrządu strumień komórek natrafia na starannie zogniskowany promień światła wzbudzającego, np. z lasera. Wokół

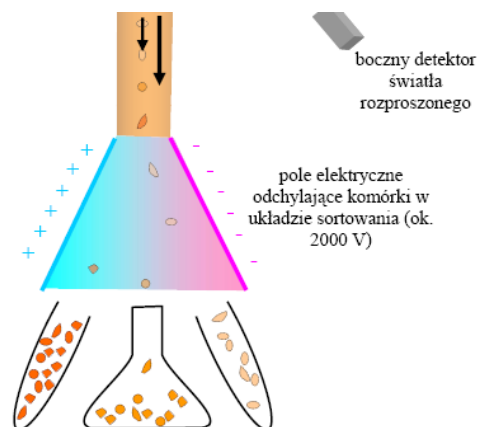


komory roboczej rozmieszczone są detektory światła. Z punktu widzenia pracy cytometru najważniejszy jest detektor światła przechodzącego FSC (ang. *Forward Scatter*), detektor światła rozproszonego pod kątem 90° SSC (ang. *Side Scatter*) oraz zaopatrzone w filtry barwne detektory światła fluorescencji FL1, FL2 i FL3.

Do samego liczenia komórek wystarczy detektor FSC lub SSC, jednakże współczesne cytometry przepływowe służą nie tyle do prostego zliczania komórek, co do oceny stanu komórki i jej funkcji. Dlatego też zaopatrzone są w detektory światła fluorescencji. Dobierając odpowiedni zestaw

barwników fluorescencyjnych można uzyskać dogłębny wgląd w stan i funkcję pojedynczych komórek.

Niektóre współczesne cytometry przepływowe wyposażone są dodatkowo w tzw. układ sortowania. W typowym rozwiązaniu układ ten sterowany jest komputerowo na podstawie danych zebranych podczas gdy komórka przechodziła przez komorę pomiarową. Zastosowanie pola elektrycznego o odpowiedniej polaryzacji pozwala podzielić komórki opuszczające cytometr na 3 frakcje.



Gromadzenie danych

Sprzężony z układem optoelektronicznym komputer rejestruje zjawiska zachodzące w komorze pomiarowej cytometru. Sygnałem uruchamiającym zapis danych jest spadek natężenia sygnału w detektorze FSC (światło przechodzące). Program komputerowy interpretuje to jako pojawienie się w komorze pomiarowej obiektu wartego rejestracji. W odpowiedzi na taki sygnał komputer zapisuje wartości sygnałów pochodzących z kanałów pomiarowych: FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 i ewentualnie kanałów dodatkowych. Powstaje w ten sposób pojedynczy rekord danych, który poza wartościami sygnałów z poszczególnych kanałów zawiera również numer kolejny zapisu.

Dostępna liczba kanałów pomiarowych zależy od stopnia skomplikowania układu optycznego oraz klasy i ceny przyrządu. Zawsze dostępne są kanały światła przechodzącego (FSC) i rozproszonego (SSC) oraz 3 kanały fluorescencji. Przy typowej konstrukcji układu optycznego światło oświetlające komórki ma barwę **niebieską**, a kanały fluorescencyjne rejestrują światło **zielone**, **pomarańczowe** i **czerwone**. W droższych modelach dostępne są jeszcze dodatkowe kanały pomiarowe rejestrujące rozproszenie niskokątowe i fluorescencję wywołaną światłem wzbudzającym o innych barwach (od 1 do 3 kanałów).

Prezentacja wyników

W typowych zagadnieniach badawczych rejestruje się dla danej zawiesiny komórek kilka tysięcy rekordów. Zapisane na dysku komputera dane są następnie przedstawiane w formie graficznej i poddawane analizie numerycznej i statystycznej.

Wizualizacja danych obejmuje:

- histogramy jedno- i dwuwymiarowe

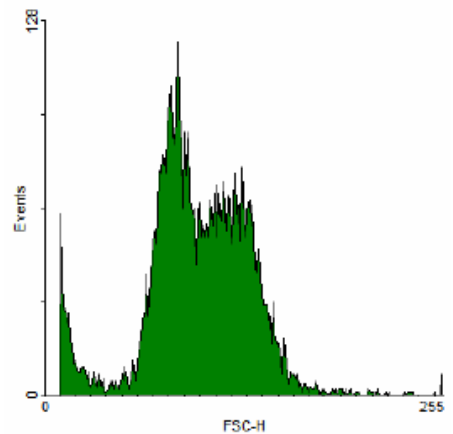
- wykresy rozrzutu (cytogramy)

Na podstawie uzyskanych danych graficznych ustala się liczbę subpopulacji komórek i odpowiadające im zakresy wartości parametrów w odpowiednich kanałach. Następnie zliczane są rekordy należące do poszczególnych subpopulacji. Można w ten sposób uzyskać dane statystyczne dotyczące względnej liczebności subpopulacji.

W postaci histogramów jednowymiarowych możliwa jest niezależna prezentacja wyników zarejestrowanych w poszczególnych kanałach pomiarowych. Histogramy takie służą przede wszystkim do oceny jednorodności populacji komórek.

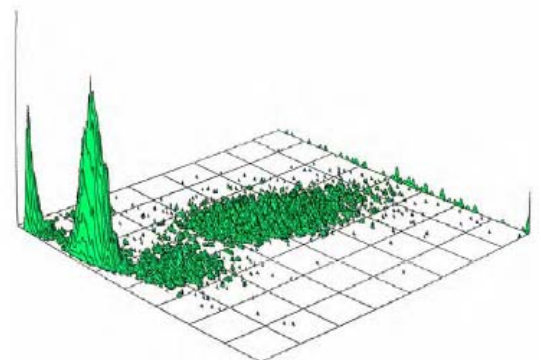
Na podstawie histogramu można:

- określić użyteczny zakres odczytów z danego kanału
- ocenić jednorodność populacji komórek
- ustalić liczbę subpopulacji
- wyznaczyć typowe wartości parametrów dla poszczególnych subpopulacji



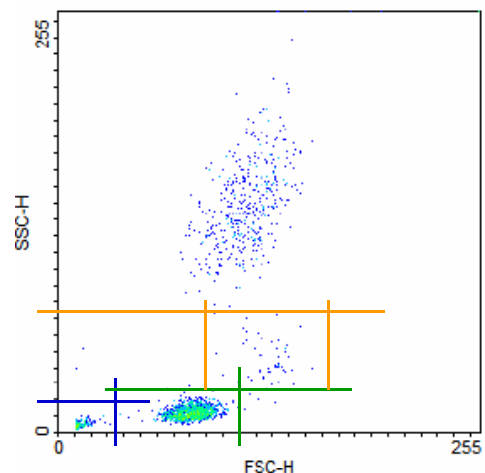
Zamieszczony obok histogram kanału FSC pokazuje wyraźnie występowanie dwóch, częściowo nakładających się subpopulacji komórek oraz obecność sygnałów pochodzących od innych obiektów, np. fragmentów komórek (zleczenia po lewej stronie wykresu dla skrajnie małych sygnałów FSC). Rozłączny podział populacji komórek tylko w oparciu o ten parametr nie jest możliwy.

Histogramy dwuwymiarowe pozwalają na analizę populacji komórek jednocześnie ze względu na 2 parametry. Na trzeciej osi wykresu mamy liczbę zarejestrowanych rekordów o danej wartości parametrów. Prezentacja taka pozwala lepiej wejrzeć w strukturę populacji. Jednakże przy populacjach zawierających liczne subpopulacje może dochodzić do przesłaniania niektórych z nich (efekt cienia).



Sposobem wizualizacji pozwalającym wyeliminować efekt cienia są wykresy rozrzutu (cytogramy). Na wykresach takich każdy rekord przedstawiony jest w postaci pojedynczego punktu. Przy dużej lokalnej gęstości punktów zlewają się one tworząc jednolitą plamę.

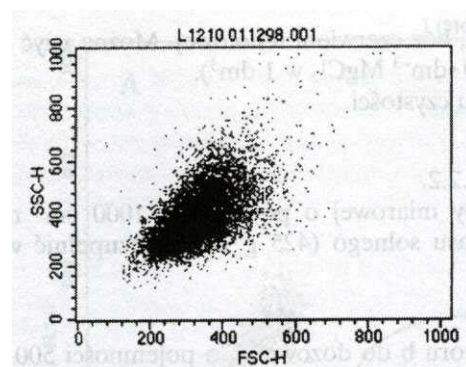
W niektórych typach oprogramowania istnieje możliwość ustalania barwy punktu w zależności od lokalnej gęstości. Na wykresie obok obszary o dużej gęstości zaznaczone są jaśniejszym kolorem. Na cytogramach stosunkowo łatwo można wyznaczyć zakresy występowania poszczególnych subpopulacji. Po ustaleniu tych zakresów program oblicza względne liczebności poszczególnych subpopulacji i drukuje je w postaci tabelki albo na samym cytogramie albo w odpowiednim pliku raportu.



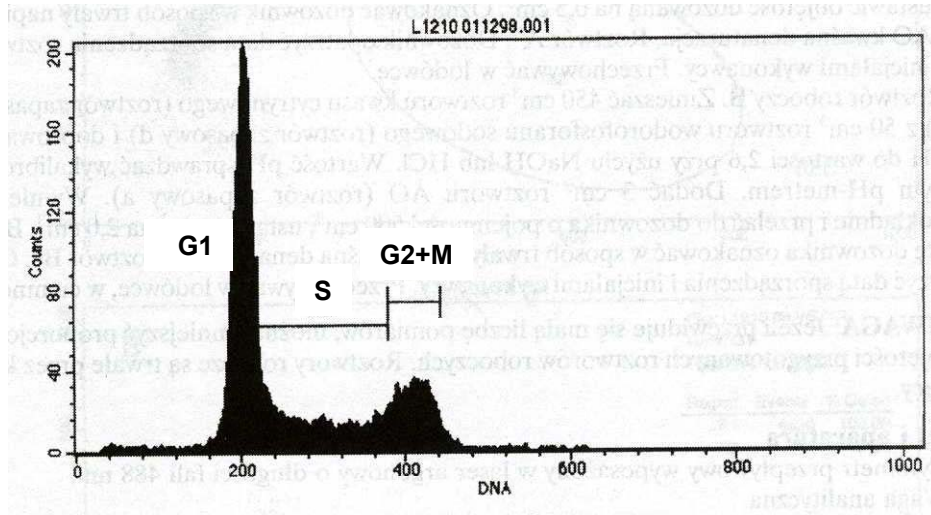
Przykład I – barwienie oranżem akrydyny

Oranż akrydyny (OA) jest barwnikiem fluorescencyjnym wiążącym się metachromatycznie z kwasami nukleinowymi. Po interkalacji do dwuniciowego DNA cząsteczki OA wzbudzone światłem niebieskim fluoryzują na zielono. Związanie OA z jednoniciowym DNA lub RNA indukuje fluorescencję czerwoną, umożliwia to niezależne określenie zawartości DNA i RNA w poszczególnych komórkach.

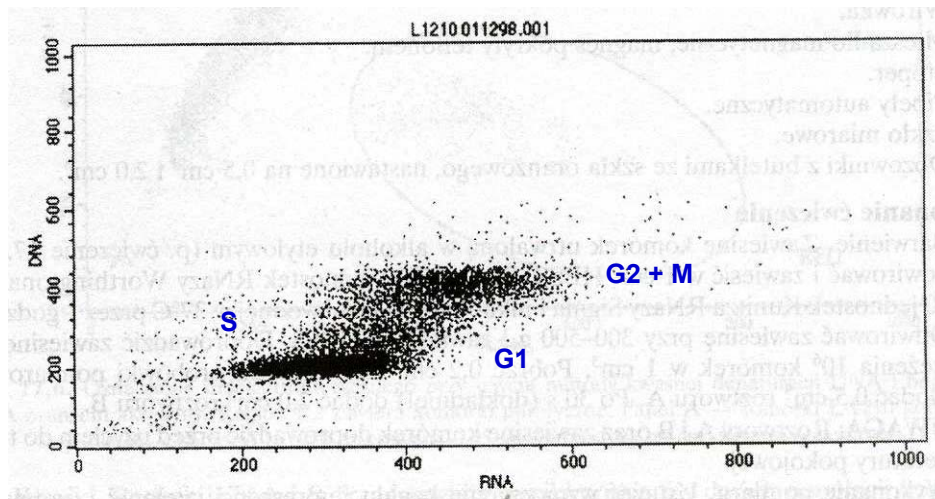
Cytogram w układzie FSC-SSC pokazany obok sugeruje jednorodną populację komórek o dużym rozrzucie wielkości i stopnia uziarnienia. Rozrzut ten jest nietypowy jak na populację jednego typu komórek. Dlatego w następnym kroku wykonano jednowymiarowe histogramy kanałów FL1 (fluorescencja zielona – DNA) i FL3 (fluorescencja czerwona – DNA).



Najciekawszy obraz uzyskano z kanału FL1. Na histogramie wartości pomiarów w tym kanale widać wyraźnie co najmniej 2 subpopulacje komórek o wartościach sygnału ok. 200 i ok. 400 jednostek. Można z tego wnosić, że komórki drugiej subpopulacji zawierają 2 razy więcej DNA niż komórki subpopulacji pierwszej. W żywej komórce podwojenie ilości DNA obserwowane jest w fazie G2 i w fazie M (mitoza). Podstawowa ilość DNA występuje z kolei w fazie G1 cyklu komórkowego. W fazie S (synteza) ilość DNA jest zmienna i zależy od postępu działań syntetycznych. Komórki w tej fazie cyklu tworzą na histogramie ciągle spektrum komórek zawierających pośrednią ilość DNA.



Cytogram w układzie fluorescencja zielona (DNA)-fluorescencja czerwona (RNA) potwierdza taką interpretację.



W obecności niektórych substancji, np. pewnych związków przeciwnowotworowych, obraz cyklu komórkowego ulega charakterystycznym zaburzeniom. Sprawia to wrażenie jakby komórki gromadziły się tylko w niektórych fazach cyklu. Pozwala to wnioskować o mechanizmie molekularnego działania takich związków.

Przykład II – apoptoza a nekroza

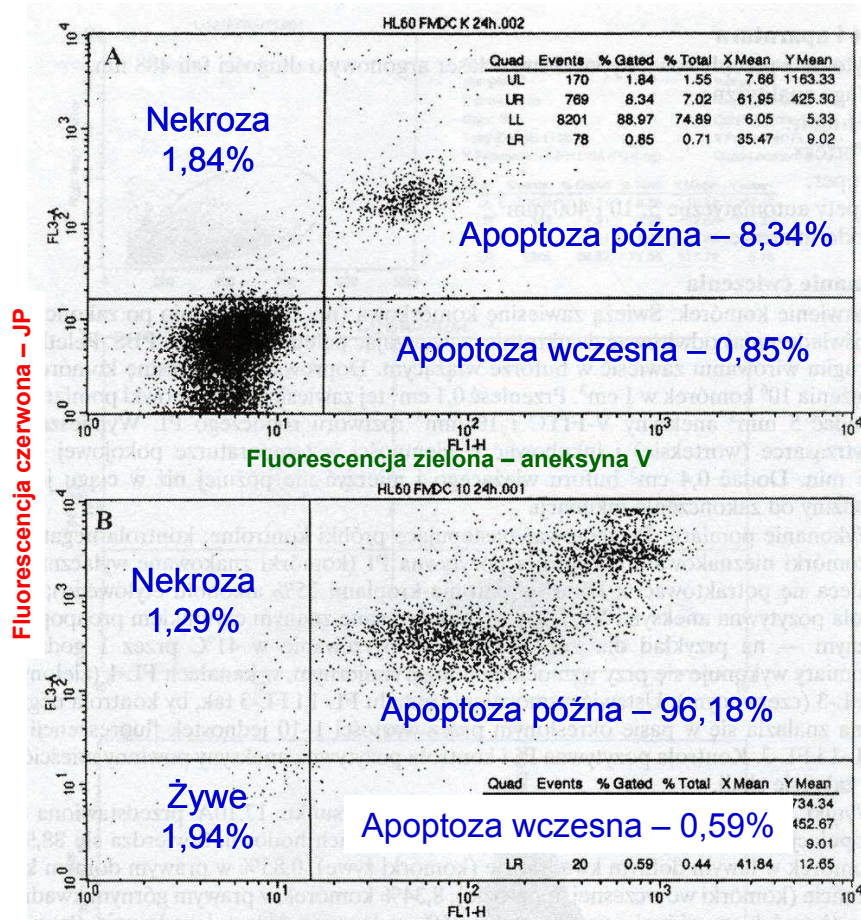
Cytopię przepływową można zastosować do określenia mechanizmu śmierci komórkowej. Trzeba jednak w tym celu dysponować odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi.

W zewnętrznej warstwie błony komórkowej komórek ulegających apoptozie (programowalnej śmierci) pojawia się charakterystyczny lipid – fosfatydyloseryna. W komórkach żywych występuje on tylko w warstwie wewnętrznej błony komórkowej. Stwierdzono, że niewielkie białko zwane aneksyną V wiąże wybiórczo do fragmentów błony komórkowej zawierających fosfatydyloserynę.

W handlu dostępna jest aneksyna V z przyłączoną kowalencyjnie fluoresceiną. Fluoresceina wzbudzona światłem niebieskim świeci na **zielono**.

W komórkach w których rozpoczął się proces nekrozy (martwicy) wzrasta przepuszczalność błony komórkowej w stosunku do niektórych barwników. Jednym z takich barwników jest jodek propydyny (JP), który po interkalacji do DNA świeci na **czzerwono**.

Tak więc barwiąc komórki mieszaniną aneksyny V związanej z fluoresceiną i jodkiem propydyny mamy możliwość ustalić mechanizm śmierci komórkowej indukowanej przez badany preparat.



Przedstawione powyżej cytogramy zarejestrowane zostały dla dwóch hodowli komórek. Panel górny przedstawia cytogram hodowli kontrolnej (bez badanego związku). Prawie 90% komórek w tej hodowli nie ulega wybarwieniu ani jednym ani drugim barwnikiem. Są to komórki żywe, prawdopodobnie dzielące się. Panel dolny przedstawia cytogram hodowli takich samych komórek w obecności związku przeciwnowotworowego. Rozkład komórek na cytogramie jest po 24 godz. zupełnie odmienny w porównaniu z hodowlą kontrolną. Ponad 96% komórek wykazuje silną fluorescencją zieloną, co wskazuje na zaawansowaną apoptozę. Komórki te wykazują jednocześnie silną fluorescencją czerwoną, gdyż w późnych etapach apoptozy również wzrasta penetracja JP do wnętrza komórek.