

Zastosowanie cytometrii przepływowej w medycynie weterynaryjnej

URSZULA LISIECKA, KRZYSZTOF KOSTRO, ŁUKASZ JAROSZ

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Lisiecka U., Kostro K., Jarosz Ł.

Applying flow cytometry in veterinary medicine

Summary

The number of ways in which flow cytometry may be applied in veterinary sciences is continually increasing, especially in the fields of immunology, oncology, pharmacology and microbiology. White blood cell analysis by flow cytometry, and in particular, the study of leukocyte antigens, phagocytosis and intracellular killing, is being applied to an ever growing number of animal species. Moreover, flow cytometry enables red blood cell analysis, including reticulocyte count and maturity, identification of anti-erythrocyte antibodies and intraerythrocyte parasites detection. Through flow cytometry it is possible to make a speedy and precise diagnosis of neoplasms. In diseases of the haematopoietic system, such as leukemia and lymphomas this method allows the cell line which has become malignant to be precisely established. When appropriate procedures are used, solid tissues such as tumors can be investigated, and if there is no direct access to tumors, it is possible to study cells from secondary lesions – e.g. pleural fluid or peritoneal fluid. Flow cytometry can provide information about sperm parameters, such as sperm cell chromatin structures or differentiations between X and Y bearing sperm cells. The flow cytometry method enables a wide range of diseases to be diagnosed by studying apoptosis, i.e. programmed cell death. When adequate, modified procedures are applied, it can be utilized in diagnosing bacterial and viral infections and it is the only method which makes it possible to determine cytokines produced by different cell populations, and cytokine sets produced by a single cell.

Keywords: flow cytometry, immunophenotyping, apoptosis, cytokines

Cytometria przepływowa (flow cytometry – FCM) ma obecnie szeroki wachlarz zastosowań w rutynowej diagnostyce klinicznej człowieka, ale jej wykorzystanie wzrasta także w naukach weterynaryjnych, zwłaszcza w immunologii, onkologii, farmakologii i mikrobiologii. Użycie przeciwciał monoklonalnych, specyficznych w stosunku do konkretnego epitopu na komórkach krwi zwierząt towarzyszących człowiekowi oraz stanowiących źródło pożywienia, poszerzyło spektrum testów o potencjalnym zastosowaniu klinicznym. Zalicza się tu takie testy, jak: określanie liczby niedojrzałych i dojrzałych retikulocytów, wykrywanie immunoglobulin wiążących się z komórkami krwi, immunofenotypowanie białaczek i chłoniaków, analizowanie komórek różnych populacji szpiku kostnego oraz pojedynczych komórek różnych populacji w zawiesinie, niezwiązanych z podłożem w płynach tkankowych bądź komórkach tkanek i narządów świeżych, zamrożonych lub utrwalonych w parafinie celowo uwolnionych z otaczającej je substancji międzykomórkowej (2, 15, 30).

Analiza układu białokrwinkowego

Leukocyty można analizować w pełnej krwi lub jako komórki izolowane w gradiencie gęstości. Badanie leu-

kocytów w pełnej krwi jest możliwe dzięki wydzielaniu grup komórek przy pomocy programu komputerowego – tak zwane ustalanie okna, bramkowanie. Wcześniej należy z krwi usunąć erytrocyty przez dodanie buforu lizującego. Badanie leukocytów polega najczęściej na oznaczaniu ich immunofenotypu, zestawu antygenów różnicowania (CD – Cluster Designation, Cluster Differentiation), który jest charakterystyczny dla danej populacji komórek (2). Przy zastosowaniu odpowiednich przeciwciał można ocenić zarówno ekspresję określonej cząsteczki CD na powierzchni różnego typu komórek, jak i ekspresję różnych antygenów na komórkach jednego typu (15, 20).

Cytometrię przepływową można wykorzystać do oceny stanu czynnościowego neutrofilów. Jedną z najważniejszych funkcji tych komórek jest fagocytoza. Do jej oceny używa się cząstek, które są fagocytowane przez komórki żerne. Są one znakowane barwnikami fluorescencyjnymi (izotiocyanian fluoresceiny – FITC, oranż akrydyny). Dotychczas w badaniach używano cząstek lateksu (1,8 μm), nanocząstek (0,3 μm), zymosanu, liposomów, krwinek czerwonych, mikroorganizmów (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i wiele innych) lub grzybów (*Candida albicans*, drożdże piekarnicze).

Aby określić dokładnie procent fagocytyzujących monocytów i granulocytów oraz aktywność fagocytarną (średnia ilość sfagocytowanych bakterii w przeliczeniu na jedną komórkę), stosuje się komercyjnie dostępny test Phagotest (Orpegen, Niemcy). Jest to szybki test, który pozwala określić aktywność fagocytarną w niewielkiej objętości krwi pełnej lub w płynie stawowym. Jego składnikiem są bakterie *E. coli* znakowane FITC, opsonizowane przeciwciałami i składowymi dopełniacza pulowanej surowicy (11, 34).

W oparciu o ocenę metabolizmu tlenowego komórki można wykazać, czy materiał pochłonięty przez neutrofile został zdegradowany. W tym celu wykrywa się produkty powstałe w czasie aktywacji systemu oksydazy NADPH. W cytometrii przepływowej do wykazania obecności produktów aktywacji oksydazy stosuje się dwuoctan 2'7'-dichlorofluorescyny (DCFH-DA). Jest to mała cząstka, nie wykazująca fluorescencji, która po przeniknięciu przez błonę wewnątrz komórki ulega przekształceniom przez enzymy komórkowe do 2'7'-dichlorofluoresceiny (DCF), która emituje sygnał fluorescencyjny (530 nm). Inna metoda polega na zastosowaniu utleniania wewnątrzkomórkowego hydroetydyny (HE) do bromku etydyny, który wykazuje czerwoną fluorescencję. Aby wykazać obecność w komórce tych dwóch metabolitów, należy zastosować bardzo silne stymulatory wybuchu oddechowego, na przykład estry forbolu (PMA) (11, 34). W laboratoriach stosuje się ponadto wystandaryzowane testy, takie jak Bursttest (Orpegen). Stymulatorem wybuchu tlenowego jest słaby aktywator N-formylometionylleucynofenylalanina (FMLP) oraz opsonizowane *E. coli*. Substancją, która ulega przekształceniom w komórce, jest DHR 123. Można określić intensywność fluorescencji powstałej rodaminie 123 i dzięki temu zbadać aktywność enzymatyczną.

Badanie reaktywnych pochodnych tlenu (ROS) może przyczynić się do wykrycia szeregu chorób zakaźnych oraz oceny zaburzeń czynności neutrofilów. Podobne badania wykorzystano do oceny zmian funkcjonalnych neutrofilów u bydła oraz identyfikacji zwierząt podatnych na chroniczne zapalenie wymion wywołane przez *Staphylococcus aureus* (13, 34). Cytometria przepływowa została także z powodzeniem zastosowana do oceny fagocytozy oraz zabijania wewnątrzkomórkowego u świń, psów, kotów, królików, bydła, a nawet u wielorybów (6, 11, 13, 23).

Analiza układu czerwonokrwinkowego

Cytometryczna analiza erytrocytów dotyczy przede wszystkim określania liczebności i dojrzałości retikulocytów, identyfikowania przeciwciał skierowanych przeciwko erytrocytom oraz wykrywania ich wewnątrzkomórkowych pasożytów. Erytrocyty można analizować w pełnej krwi pobranej na antykoagulant lub izolować z warstwy erytrocytów powstałej po wirowaniu krwi całkowitej. Cytometrię stosuje się często do badania konfliktu serologicznego między matką a płodem. Zwykle stosuje się do tego celu przeciwciała przeciwko płodowej hemoglobinie F. Jest to precyzyjny i czuły test, pozwalający odróżnić erytrocyty płodowe od dojrzałych erytrocytów zawierających małą ilość hemoglobiny F (2).

Ocena liczby retikulocytów jest oparta na pomiarze intensywności fluorescencji RNA zawartego w retikulocycie. Do barwienia RNA retikulocytów stosowane są fluorochromy, takie jak: oranż tiazolowy, oranż akrydyny, auramina czy bromek etydyny. Kluczowym parametrem jest odsetek retikulocytów o wysokiej zawartości RNA, których cechą charakterystyczną jest zwiększona intensywność fluorescencji (21). U zwierząt cytometria przepływowa była stosowana do oznaczania liczby retikulocytów u psów i kotów i w obu przypadkach rezultaty były porównywalne z obliczeniami manualnymi (30).

Cytometria przepływowa jest stosowana z powodzeniem do wykrywania wewnątrzerytrocytarnych pasożytów. Erytrocyty inkubuje się z hydroetydynamą, która jest pochłaniana przez żywe komórki i przekształcana do etydyny. Etydyna jest fluorochromem, wiążącym się z DNA pasożyta. Ta technika została wykorzystana do prześledzenia cyklu rozwojowego *Babesia bovis* w erytrocytach bydłęcych, a w erytrocytach psich do identyfikacji komórek zainfekowanych *Babesia gibsoni*. Cytometria jest także pomocna w ocenie skuteczności leków przeciwmalarycznych. Zainfekowane zarodźcem malarii ludzkie erytrocyty barwi się z użyciem barwnika Hoechst 33258. Zaletą cytometrii jest to, że pozwala ona na wykrycie pasożyta występującego nawet w bardzo małej ilości (30).

Zastosowanie cytometrii przepływowej w hematologii weterynaryjnej może mieć miejsce przy ocenie ilościowej niedojrzałych płytek krwi, które były badane we krwi ludzi, psów i koni w sposób podobny do stosowanego przy analizie retikulocytów (21, 31). Wiele testów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej jest udoskonalanych w celu identyfikacji krążących w organizmie płytek aktywowanych. Do testów tych zalicza się m.in.: wiązanie fibrynogenu do płytek, stosowanie przeciwciał przeciwko płytkowym markerom zależnym od aktywacji, wykrywanie płytkowych mikrocząstek, badanie zmiany kształtu oraz detekcja agregatów płytki-leukocyty. Obecność przeciwciał skierowanych przeciwko płytkom, która pozwala wykryć trombocytopenię, ehrlichiozę i badać procesy nowotworzenia, była badana u ludzi i psów (21, 31). Testy te są pomocne w ocenie stanu zdrowia zwierząt.

Diagnostyka nowotworów

Bardzo ważne z punktu widzenia kliniki jest wykorzystanie cytometrii przepływowej w rutynowej diagnostyce schorzeń układu krwiotwórczego, takich jak białaczki i chłoniaki. Cytometria przepływowa umożliwia ocenę dokładnej liczby komórek zmienionych nowotworowo oraz określenie linii komórkowej, z jakiej pochodzi nowotwór oraz jego potencjalnej złośliwości.

Wskaźnikiem złośliwości nowotworu są klonalność i zawartość (ploidia) DNA. Klonalność jest dowodem na to, że linia komórek białaczkowych pochodzi od pojedynczej komórki. Pojawienie się dodatkowych pików na histogramie obrazującym zawartość DNA świadczy o aneuploidalności i jest wskaźnikiem procesów nowotworzenia (21, 30). Różne typy białaczek i chłoniaków charakteryzują się często drobnymi różnicami profilów antygenowych, dzięki temu można je rozróżnić za pomocą cytometrii przepływowej (30). Zastosowanie kli-

niczne immunofenotypowania w weterynaryjnej onkologii wiąże się z diagnozą psich białaczek i chłoniaków złośliwych (5) oraz kocich ostrych białaczek mieloidalnych i limfoidalnych (30). Dodatkowo cytometria w przepływającym strumieniu cieczy umożliwia badanie skuteczności chemioterapii, co udowodniono prowadząc tego typu analizę limfocytów krwi obwodowej u psów z wielocentrycznym chłoniakiem, przed leczeniem i po podaniu cytostatyków (5). Cytometria umożliwia ponadto wykrycie choroby resztkowej (MRD – minimal residual disease) u pacjentów z ostrymi białaczkami. Dokładność i czułość badania pozwala wykryć nawet pojedyncze komórki białaczkowe (21).

Kolejne zastosowanie cytometrii przepływowej odnosi się do charakterystyki antygenowej i ilościowej komórek szpiku kostnego (21). Metoda ta umożliwia m.in. określanie liczby różnych komórek szpiku poprzez ich barwienie dwuocianem 2'7'-dichlorofluoresceiny, wiążącym się preferencyjnie z komórkami zawierającymi peroksydazę, a następnie analizowanie pod kątem zielonej fluorescencji i rozpraszania światła FSC. W ten sposób możliwe jest odróżnienie populacji proliferujących i dojrzałych komórek mieloidalnych, proliferujących i dojrzałych komórek erytroidalnych oraz megakariocytów. Możliwe jest także analizowanie nie barwionych próbek szpiku, przy którym, bazując na stopniu rozpraszania światła FSC i SSC, identyfikuje się segmentowane neutrofile, metamielocyty, niedojrzałe komórki mieloidalne i erytroidalne oraz dojrzałe komórki erytroidalne. Jodek propidyny, jak również bromodeoksyurydyna są wykorzystywane dodatkowo do określania aktywności proliferacyjnej szpiku (21).

Jedną z największych zalet cytometrii przepływowej jest możliwość przy braku dostępu do guza pobrania i badania komórek z wtórnego źródła zmiany chorobowej np. płynu opłucnowego czy otrzewnowego (10). Jeżeli badana jest tkanka twarda, komórki muszą zostać rozbite mechanicznie lub enzymatycznie. Metodę enzymatyczną stosuje się wówczas, jeżeli materiał guza zawiera wiele martwych komórek, dużą ilość podścieliska lub zwłóknienia. Świeżo pobrany materiał z guza powinien być transportowany i przechowywany w specjalnym podłożu (nie w formalinie) w temperaturze 4°C. Materiał przeznaczony do badania powinien zawierać jak najwięcej interesującej nas tkanki, natomiast jak najmniej tkanki tłuszczowej, włóknistej, naczyń krwionośnych (warstwy naczyniowej) i komórek nekrotycznych (10).

Ocena proliferacji komórek

Cytometrię przepływową wykorzystuje się z powodzeniem do scharakteryzowania cyklu komórkowego różnych rodzajów komórek w hodowlach. Zastosowanie w tej metodzie barwienia z użyciem jodku propidyny umożliwiło obliczenie procentu komórek znajdujących się w fazie G₀/G₁, S i G₂/M. Do badania cyklu często stosuje się oznaczanie zawartości DNA po jego kwaśnej denaturacji. Po dodaniu do hodowli substancji blokującej komórki w fazie M, np. winblastyny i określeniu indeksu mitotycznego (liczby komórek będących w trakcie podziału mitotycznego) w różnym czasie po dodaniu tej substancji, możemy obliczyć czas podwojenia (gene-

ration time) populacji komórek. Prowadząc hodowlę komórkową lub tkankową można śledzić stan hodowli po zabarwieniu DAPI – sulforodaminą i oranżem akrydyny. Nagłe pogorszenie się rozdzielczości histogramu DNA przy prowadzeniu regularnej kontroli hodowli może świadczyć o zakażeniu mykoplazmą.

Proliferację nowotworów można badać analizując fazę S cyklu komórkowego. Jeżeli odsetek komórek znajdujących się w tej fazie przekroczy kilkanaście procent, oznacza to wzrost proliferacji. W przypadku np. raka sutka wzrost liczby komórek w fazie S stanowi samodzielny czynnik rokowniczy. Badając cykl komórkowy należy także zwrócić uwagę na antygeny towarzyszące proliferacji, takie jak Ki-67 czy PCNA. Istnieje zależność pomiędzy ich ekspresją a postępem choroby nowotworowej. Cytometryczna ocena zawartości DNA jest stosowana także w badaniach cytogenetycznych. Ilość kwasu nukleinowego ocenia się wtedy w poszczególnych chromosomach przy użyciu odpowiednich fluorochromów (np. DAPI czy jodku propidyny). Proliferujące limfocyty można wykryć, znakując je przeciwciałami przeciwko receptorowi dla interleukiny 2 (CD25) lub receptorowi dla transferyny (CD71). Oba te receptory znajdują się na powierzchni zaktywowanych limfocytów. Można także wykorzystać fakt, że proliferujące komórki wbudowują analog tymidyny – bromodeoksyurydynę (BrdU), którą można wykryć za pomocą przeciwciał anti-BrdU (2).

Ocena parametrów nasienia

Badanie jakości nasienia polega zwykle na wykrywaniu nieprawidłowej struktury chromatyny plemników. DNA znakuje się oranżem akrydyny (AO). Barwnik ten, łącząc się z DNA dwuniciowym, daje zieloną fluorescencję, natomiast w połączeniu z jednoniciowym DNA świeci na czerwono. Zwiększona liczba komórek o czerwonej fluorescencji świadczy o nieprawidłowej strukturze chromatyny plemników. Plemniki można także znakować rodaminą 123 i jodkiem propidyny PI, dzięki czemu wykrywa się zmiany w potencjale błony mitochondrialnej, a co za tym idzie – ruchliwości plemników. Czerwona fluorescencja pochodząca od PI świadczy o dużej liczbie martwych komórek, natomiast intensywne zielone fluorescencje są wskaźnikami żywotności i dużej ruchliwości plemników. Wyniki oceny żywotności plemników w nasieniu ogierów z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz innych metod były porównywalne. Za pomocą cytometrii badano żywotność i integralność akrosomu psich plemników oraz żywotność i integralność błony komórkowej plemników knura (25). Dzięki technicom cytometrycznym wykrywa się w ludzkim nasieniu komórki takie, jak leukocyty czy komórki prostaty, co jest pomocne we wcześniejszym wykryciu raka prostaty (24). Cytometria umożliwia ponadto określenie niewielkich różnic w zawartości DNA w plemnikach niosących chromosomy X i Y. Plemniki zawierające chromosom X lub Y sortuje się za pomocą specjalnego typu cytometrów wyposażonych w sortery komórkowe, dzięki temu możliwa jest regulacja płci zwierząt hodowlanych (1, 22).

Badanie apoptozy

Apoptoza jest czynnym procesem, który przyczynia się do regulacji liczby komórek w organizmie. Zachwianie równowagi między proliferacją komórek a ich śmiercią prowadzi do powstania licznych schorzeń. W komórkach apoptotycznych następują zmiany składu fosfolipidów w błonie zewnętrznej komórki – pojawia się tam, przeniesiona z części wewnętrznej błony fosfatydyloseryna. Do jej wykrycia stosuje się aneksynę V związaną chemicznie z barwnikiem fluorescencyjnym (najczęściej FITC). Równocześnie wybarwia się komórki jodkiem propidyny, który pozwala ocenić integralność błony komórkowej. Następnie bada się fluorescencję za pomocą cytometru. Komórki żywe nie barwią się żadnym odczynnikiem, komórki nekrotyczne barwią się jodkiem propidyny, a komórki apoptotyczne barwią się w różnym stopniu aneksyną V. Komórki barwiące się jednocześnie aneksyną V i jodkiem propidyny znajdują się w późnym stadium apoptozy (28).

Apoptozę można także badać, wykrywając pęknięcia łańcucha DNA w komórkach apoptotycznych. W tym celu stosuje się trifosforan deoksyurydyny (dUTP) lub bromodeoksyurydyny (Br-dUTP) sprzężony z fluoresceiną lub digoksygeniną, który przy użyciu enzymów, takich jak terminalna transferaza czy polimeraza DNA jest wbudowywany w miejscach pęknięć łańcucha DNA. Fluorescencja Br-dUTP połączonego z kwasem nukleinowym jest następnie mierzona cytometrycznie. Jest ona proporcjonalna do liczby pęknięć łańcucha DNA. Ten sposób badania apoptozy zwany jest metodą TUNEL (28).

Za pomocą cytometrii przepływowej możliwe jest badanie aktywacji kaspaz (proteinaz cysteinowych) – enzymów, które są obecne w komórkach apoptotycznych. Najczęściej wykrywa się kaspazę 3, stosując komercyjne zestawy odczynników (kity), które zawierają substraty fluorescencyjne, rozszczepiane przez kaspazę.

Ocena apoptozy może mieć znaczenie w zrozumieniu przebiegu wielu chorób zwierząt i człowieka (choroby nowotworowe, autoagresja, choroby neurodegeneracyjne i infekcyjne). W badaniach klinicznych za pomocą cytometrii oznaczano spontaniczną i indukowaną apoptozę limfocytów w przebiegu infekcji wirusem HIV u ludzi (20) oraz apoptozę w przebiegu infekcji wirusem niedoboru odporności u kotów (FIV) (19). Badano także apoptozę leukocytów u bydła (27), trzody chlewnej (29), kotów (8, 19) i psów (34). Porównywano proces apoptozy zdrowych i zainfekowanych wirusem *Panleukopenia* limfocytów kotów (8). U trzody chlewnej oznaczano apoptozę zainfekowanych wirusem choroby Aujeszky'ego leukocytów krwi obwodowej (29). Ponadto badano apoptozę kocich, mysich i szczurzych tymocytów (34).

Diagnostyka i patogeniza zakażeń bakteryjnych i wirusowych

Przy użyciu cytometrii przepływowej zakażenia bakteryjne i wirusowe można badać bezpośrednio bądź pośrednio, monitorując zmiany, jakie zachodzą w układzie immunologicznym. W wyniku zakażenia bakteryjnego następują duże zmiany w komórkach obronnych. Jedną

z tych zmian jest tzw. „paraliż immunologiczny”, który jest spowodowany utratą przez monocyty krwi antygeny HLA-DR. Zmiany ekspresji tego antygeny możemy śledzić dzięki cytometrii przepływowej (33).

Za pomocą cytometrii można także badać oddziaływanie wirusa z komórką, określając ekspresję wybranych antygenów powierzchniowych i cytoplazmatycznych komórki, z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych. Analizując fenotypy komórek zakażonych wirusem można monitorować przebieg zakażenia i określać jego rokowania (18). Za pomocą tej metody śledzono stan chorych zakażonych wirusem HIV (20). W diagnostyce weterynaryjnej cytometrię przepływową stosowano między innymi do oceny progresji infekcji kocimi wirusami FIV i FeLV (19), wirusami białaczki bydła, wirusem BIV i BLAD (wrodzonym zespołem niedoboru leukocytarnych cząstek adhezyjnych). Analizowano komórki odpornościowe we krwi owiec w przebiegu doświadczalnego zakażenia wirusem BIV (12) oraz wykrywano zakażenia wirusem zapalenia tętnic koni w nasieniu ogierów (4). Badano także zmiany w subpopulacjach limfocytów u kurcząt zakażonych *Salmonella enteritidis* (32).

Cytometrię przepływową można zaadaptować także do bezpośredniej wieloparametrowej analizy mikroorganizmów, jednak ze względu na to, że różnią się one od organizmów eukariotycznych, niezbędna jest modyfikacja standardowych procedur wykorzystywanych do charakteryzowania komórek zwierzęcych. Barwienie barwnikiem fluorescencyjnym – bromkiem etydydy (BE) pozwala także na wykrycie bakterii w płynach fizjologicznych, takich jak: żółć, wydzieliny ropne z ran, płyn surowiczy oraz wydzieliny oskrzelowe (33).

Cytometria znajduje zastosowanie w bezpośrednim badaniu komórek bakteryjnych do zliczania i wykrywania określonych gatunków bakterii w populacjach mieszanych, np. *Legionella pneumophila* w wieżach chłodniczych (9), *Listeria monocytogenes* w mleku (3), *Escherichia coli* O157:H7 w zanieczyszczonym mięsie (14) oraz subpopulacji bakterii w produktach probiotycznych (probiotykach) i produktach mlecznych (3).

Cytometrię można także wykorzystać w badaniach serologicznych. Za jej pomocą wykrywano przeciwciała przeciwko *Yersinia pestis* w surowicach pobranych od chorych na dżumę pacjentów. Możliwa jest także detekcja przetrwalników (spor) bakteryjnych np. *Bacillus anthracis* (26).

Metoda cytometrii przepływowej znajduje także zastosowanie w testowaniu wrażliwości bakterii na antybiotyki. Do detekcji martwych komórek bakterii stosuje się barwniki wiążące się z DNA, np. jodek propidyny, oraz barwniki wiążące się z DNA i RNA, takie jak SYTO-13 czy SYTO-17. Barwienie komórek oranżem akrydyny pozwala ocenić zmiany integralności błony komórkowej wskutek działania antybiotyków (33).

Cytometria przepływową została z powodzeniem zastosowana do detekcji wirusów z rodzin *Baculoviridae*, *Herpesviridae*, *Myoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Picornaviridae*, *Podoviridae*, *Retroviridae* i *Siphoviridae*. Kwasy nukleinowe wirusów barwiono używając takich barwników, jak: SYBR Green I, SYBR Green II, OliGreen, PicoGreen, YO-PRO oraz YOYO-1. Prowadzone są także

badania leków antywirusowych przeciwko ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (HIV), wirusowi cytomegalii oraz wirusom opryszczki (HSV) (17, 18).

Oznaczanie poziomu cytokin

Cytokiny są nośnikami informacji między układem odpornościowym a nerwowym i hormonalnym. Populacje limfocytów produkują określone, specyficzne tylko dla nich zestawy cytokin. W trakcie procesów chorobowych synteza cytokin może być zaburzona, więc analizując ich ekspresję możemy wnioskować o stanie funkcjonalnym układu odpornościowego.

Cytometria przepływowa umożliwia oznaczanie różnych cytokin produkowanych przez odrębne populacje komórek, a także zestawów cytokin produkowanych przez pojedynczą komórkę. Po 4-6-godzinnej inkubacji z czynnikiem stymulującym, wewnątrzkomórkowe cytokiny znakuje się przeciwciałami połączonymi z fluorochromem (16). Zazwyczaj stosuje się stymulatory poliklonalne, takie jak: lektyny, konkanawalina A (ConA), estry forbolu (PMA), jonomycyna, niektóre przeciwciała monoklonalne i superantygeny (7). Aby syntetyzowane cytokiny nie były wydzielane na zewnątrz komórki, stosuje się inhibitory transportu białek, takie jak brefeldyna A czy monensyna (7, 16).

Badanie cytokin wewnątrzkomórkowych może stanowić pomoc w diagnostyce zakażeń bakteryjnych, wirusowych, pasożytniczych, chorób nowotworowych, autoimmunizacyjnych, alergicznych i niedoborów odporności. Stosuje się je obecnie przy różnicowaniu limfocytów. Na przykład, jedyną różnicą między subpopulacjami Th1 i Th2 jest spektrum wydzielanych cytokin (7). W przyszłości badanie cytokin może znaleźć zastosowanie w monitorowaniu działania leków i innych środków terapeutycznych *in vivo* (7, 16).

Piśmiennictwo

- Bochenek M., Smorąg Z.: Regulacja płci u bydła poprzez separację plemników X i Y – wstępne wyniki badań. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 50-52.
- Brown M., Wittwer C.: Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* 2000, 46, 1221-1229.
- Bunthof Ch. J., Abee T.: Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2934-2942.
- Cierpisz J., Golnik W., Laskowska A., Ugoriski M.: Wykrywanie zakażeń wirusem zapalenia tętnic koni w nasieniu ogierów metodą cytometrii przepływowej. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 626-627.
- Culmsee K., Simon D., Mischke R., Nolte I.: Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. *J. Vet. Med. A.* 2001, 48, 199-206.
- De Guise S., Flipo D., Boehm J. R., Martineau D., Beland P., Fournier M.: Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995, 47, 351-362.
- Drela N.: Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej – zastosowanie i problemy. *Post. Biol. Kom.* 2001, 28, 129-146.
- Ikeda Y., Shinozuka J., Miyazawa T., Kurosawa K., Izumiya Y., Nishimura Y., Nakamura K., Cai J., Fujita K., Doi K., Mikami T.: Apoptosis in feline panleukopenia virus-infected lymphocytes. *J. Virol.* 1998, 72, 6932-6936.
- Ingram M., Cleary T. J., Price B. J., Castro A.: Rapid detection of *Legionella pneumophila* by flow cytometry. *Cytometry* 1982, 3, 134-147.
- Iwazkiewicz-Pawłowska A., Holownia A.: Cytometria przepływowa – przydatność diagnostyczna, lecznicza i rokownicza w litych guzach. *Pol. Mer. Lek.* 1999, 6, 104-106.
- Kostro K., Wojcicka-Lorenzowicz K., Leśniewska K., Madany J., Majer-Dziedzic B.: Cytometryczna ocena aktywności fagocytarnej i metabolizmu tlenowego granulocytów krwi obwodowej królików z przewlekłą trichofitozą. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 423-426.
- Kozaczyńska B., Bicka L., Kuźmak J., Winnicka A.: Analiza komórek odpornościowych krwi owiec w przebiegu doświadczalnego zakażenia wirusem (BIV). *Medycyna Wet.* 2001, 57, 129-134.
- Krakowski L., Kostro K., Wrona Z., Krakowska I., Brodzki P., Piech T., Kostrzewa A.: Metabolizm tlenowy neutrofilów i monocytów krwi w okresie okołoporodowym u krów zdrowych i z zatrzymaniem łożyska. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1080-1083.
- Kusunoki H., Bari M. L., Kita T., Sugii S., Uemura T.: Flow cytometry for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with latex beads sensitized with specific antibody. *J. Vet. Med. B.* 2000, 47, 551-559.
- Lisiecka U., Kostro K., Jarosz Ł.: Cytometria przepływowa jako nowoczesna metoda w diagnostyce i prognozowaniu chorób. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 998-1001.
- Maino V. C.: Rapid assessment of antigen induced cytokine expression in memory T cells by flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 63, 199-207.
- Marie D., Vault D., Partensky F.: Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 1649-1655.
- McSharry J. J.: Analysis of virus-infected cells by flow cytometry. *Methods* 2000, 21, 249-257.
- Momoi Y., Mizuno T., Nishimura Y., Endo Y., Ohno K., Watari T., Goitsuka R., Tsujimoto H., Hasegawa A.: Detection of apoptosis induced in peripheral blood lymphocytes from cats infected with feline immunodeficiency virus. *Arch. Virol.* 1996, 141, 1651-1659.
- Owens M. A., Loken M. R.: Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. Quality assurance for quantitative immunophenotyping. Wiley-Liss, Inc. 1995.
- Pietruczuk M.: Cytometria przepływowa w diagnostyce laboratoryjnej. *Diagnostyka laboratoryjna* 2004, 4, 8-10.
- Pena A. I., Quintela L. A., Herradon P. G.: Flow cytometric assesment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 1999, 34, 495-502.
- Riber U., Lind P.: Interaction between *Salmonella typhimurium* and phagocytic cells in pigs. Phagocytosis, oxidative burst and killing in polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, 67, 259-270.
- Ricci G., Presani G., Guaschino S., Simeone R., Perticarari S.: Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. 2000. *Human Reprod.* 15, 1329-1337.
- Siemieniuch M., Bielas W., Dubiel A., Zbyryt I., Chorbiński P.: Ocena żywotności i integralności błon komórkowych plemników knura w nasieniu świeżym i mrożonym. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 184-187.
- Stopa P. J.: The flow cytometry of *Bacillus anthracis* spores revisited. *Cytometry* 2000, 41, 237-244.
- Van Oostveldt K., Dosogne H., Burvenich C., Paape M. J., Brochez V., Van den Eeckhout E.: Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, 70, 125-133.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods* 1995, 184, 39-51.
- Wang F. I., Pang V. F., Hahn E. C.: Flow cytometric analysis of porcine peripheral blood leukocytes infected with pseudorabies virus. *J. Leuk. Biol.* 1988, 43, 256-264.
- Weiss D. J.: Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet. Clin. Pathol.* 2002, 31, 72-74.
- Weiss D. J., Townsend E.: Evaluation of reticulated platelets in dogs. *Comp. Haematol. Int.* 1998, 8, 166-170.
- Wieličko A., Kuczkowski M., Mazurkiewicz M.: Zachowanie się subpopulacji limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ u kurcząt w przebiegu zakażenia *Salmonella enteritidis*. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 527-530.
- Woźniak-Kosek A., Reiss J., Kawiak J.: Cytometria przepływowa w klinicznych analizach bakteriologicznych. *Post. Mikrobiol.* 2003, 42, 235-254.
- Zeman K.: Wykorzystanie cytometrii przepływowej do badań granulocytów obojętnochłonnych. Materiały z I Konferencji szkoleniowej nt. Przeciwciała monoklonalne w immunologii i diagnostyce. Puławy 1995, s. 99-117.

Adres autora: mgr Urszula Lisiecka, ul. Krasińskiego 12/100, 20-709 Lublin; e-mail: ula.lisiecka@op.pl