

MIKRODYSEKCJA LASEROWA – NOWOCZESNA TECHNIKA WYKORZYSTYWANA W BIOLOGII MOLEKULARNEJ

LASER MICRODISSECTION – HIGH-TECH TECHNIQUE
APPLIED IN MOLECULAR BIOLOGY

Patrycja WIZIŃSKA, Piotr DZIĘGIEL

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie: Analizy molekularne przeprowadzane są najczęściej na hetero-gennym materiale biologicznym, a uzyskane w ten sposób wyniki obrazują stan rzeczy istniejący w różnych typach komórek, czyli również w komórkach niebędących obiektem naszego zainteresowania. Niniejszy artykuł ma na celu zapoznać czytelnika z techniką precyzyjnego pozyskiwania materiału do badań molekularnych, jaką jest mikrodysekcja laserowa. Metoda ta umożliwia pozyskanie nawet pojedynczych komórek z heterogennego materiału w stanie prawie niezmienionym pod względem zarówno morfologicznym, jak i biochemicznym. Niniejsze opracowanie stanowi streszczenie wiedzy o rodzajach mikrodysekcji laserowej, ogólnych zasadach ich działania oraz przykładach ich zastosowania.

Słowa kluczowe: mikrodysekcja laserowa, biologia molekularna.

Summary: Molecular analysis are mostly carried out in heterogeneous biological material, and results obtained in this way illustrate the status quo that existed in different cell types, also in cells that are not the object of our interest. This article aims to familiarize the reader with a technique for precisely obtaining material for molecular studies, which is laser microdissection. This method allows the separation of even a single cell from a heterogeneous material almost unchanged, both morphologically and biochemically. This publication is a summary of knowledge about the types of laser microdissection, the general principles of their operation and examples of their applications.

Key words: laser microdissection, molecular biology.

1. WSTĘP

Wyniki analiz molekularnych w dużej mierze zależą od jakości pozyskanego materiału. Tkankowy materiał biologiczny rzadko ma strukturę homogenną – komórki w nim występujące są różnorodne pod względem morfologicznym oraz funkcjo-

nalnym [10,11]. Badania przeprowadzone na próbkach tkankowych dają więc uśrednione wyniki reprezentowane przez dominujące ilościowo komórki z ograniczoną możliwością badania ich wybranych populacji [1,3].

Mikrodysekcja laserowa – LM, LMD, LAM (*laser microdissection, laser-assisted microdissection*) jest nowoczesną techniką umożliwiającą pozyskanie pojedynczych komórek bądź też ich jednorodnych populacji z heterogennego materiału [8,9,13]. Komórki pozyskuje się przy użyciu energii wiązki laserowej promieniowania ultrafioletowego UV (*ultraviolet*), bądź podczerwonego IR (*infrared*) zintegrowanego z zaawansowanym mikroskopem badawczym. Wykorzystanie lasera powoduje, iż metoda ta jest szybka, precyzyjna oraz umożliwia pozyskiwanie ściśle zdefiniowanego materiału biologicznego z różnorodnych preparatów histologicznych, cytologicznych bądź też hodowli komórkowych [15,22,41].

Mikrodysekcja laserowa nie została jeszcze szczegółowo opisana w literaturze polskojęzycznej, stąd celem niniejszej pracy jest przybliżenie czytelnikom tej techniki oraz podjęcie próby utworzenia polskiej nomenklatury odpowiadającej terminologii angielskiej.

2. RYS HISTORYCZNY

Próby precyzyjnego pozyskiwania jednorodnych populacji komórek z heterogennych struktur podejmowane były od dziesięcioleci. Niegdyś mikrodysekcja polegała na delikatnym zeszkrobaniu sterylnym narzędziem (m.in. igłą, skalpelem, żyłką) pożądaných komórek lub struktur z preparatu przygotowanego na szkiełku mikroskopowym. Jednakże niewystarczająca precyzja, długi czas wykonywania eksperymentu oraz możliwość zanieczyszczenia izolowanych komórek wymusiły poszukiwanie innych technik pobierania jednorodnego materiału biologicznego [11,25].

Udoskonaleniem metody manualnej jest użycie zautomatyzowanego mikromanipulatora. Urządzenie to ma ruchome ramię zakończone narzędziem umożliwiającym wyselekcjonowanie pożądaných komórek (tj. igła, szklana mikropipeta). Pomimo iż metoda ta odznacza się większą precyzją, wciąż jest czasochłonna, a otrzymany materiał nadal może łatwo ulec uszkodzeniu lub kontaminacji [10,27].

Mikrodysekcja laserowa stawiała swoje pierwsze kroki z początkiem lat 70 XX wieku, kiedy to z sukcesem zakończyły się eksperymenty wykorzystujące LM z dokładnością do mikrometrów przy zastosowaniu energii wiązki lasera UV. Jednakże wykorzystywany wówczas eksperymentalny sprzęt uniemożliwiał swobodne zastosowanie tej metody na szeroką skalę, gdyż nie istniało ogólnodostępne urządzenie, a jedynie jego prototyp [22,30].

W roku 1996 Emmert-Buck i wsp. [11] opublikowali na łamach czasopisma *Science* artykuł, w którym po raz pierwszy szczegółowo opisano jeden z rodzajów mikrodysekcji laserowej – LCM (*laser capture microdissection*) – mikrodysekcję laserową metodą wychwytywania wraz z szerokim spektrum jej zastosowania [2,21]. Technika ta umożliwia pozyskanie jednorodnych populacji komórek wykorzystując

do tego celu energię wiązki lasera IR. Pierwsze komercyjnie dostępne urządzenie do mikrodysekcji laserowej powstało niedługo później jako owoc współpracy wymienionych naukowców z inżynierami firmy Arcturus [10,25].

Ostatecznie udowodnienie, iż pozyskiwanie komórek metodą mikrodysekcji laserowej nie niszczy struktury kwasów nukleinowych oraz białek, pozwoliło na jej rozpowszechnienie w badaniach wykorzystujących techniki biologii molekularnej [25,33].

3. ETAPY MIKRODYSEKCJI LASEROWEJ

Najważniejszym elementem aparatury do mikrodysekcji laserowej jest odpowiedni laser (IR lub UV), który umożliwia precyzyjne pozyskanie materiału. Komórki obserwuje się za pomocą mikroskopu (prostego lub odwróconego) oraz połączonej z komputerem kamery, co umożliwia stały podgląd preparatu na ekranie. W najnowszych aparatach praca lasera oraz mikroskopu jest sterowana programem komputerowym. Jeżeli jednak aparat nie jest w pełni zautomatyzowany, niezbędny jest manualny manipulator kontrolujący ruchy stolika mikroskopu oraz parametry wiązki lasera [3,25,30].

Proces pozyskiwania pojedynczych komórek bądź też ich jednorodnych populacji z heterogennego materiału za pomocą mikrodysekcji laserowej składa się z kilku etapów. Odpowiednie przygotowanie wyjściowego materiału jest warunkiem koniecznym dla skutecznego przeprowadzenia dalszych analiz molekularnych [2,14,15,24].

Warunki przygotowania preparatów do mikrodysekcji laserowej różnią się w zależności od: rodzaju materiału wyjściowego, odmiany LM oraz dalszych analiz, jakie zamierzamy przeprowadzić na pozyskanych komórkach [9,12,40]. Dlatego tak trudno jest ujednolicić procedurę postępowania, aby uzyskać materiał o wysokiej jakości pozwalającej efektywnie wyizolować kwasy nukleinowe czy białka. Z tego względu niezbędne jest każdorazowe zoptymalizowanie ogólnego protokołu [21,23,33].

Materiałem wyjściowym do mikrodysekcji laserowej może być zarówno biologiczny materiał ludzki, zwierzęcy, jak i roślinny [25,27,37]. Ponadto większość aparatów do LM umożliwia pozyskiwanie żywych bakterii, pasożytów, drożdży lub plemników z heterogennych źródeł lub też komórek z hodowli komórkowych [3,25,30].

3.1. Pobieranie materiału biologicznego

Pobieranie materiału biologicznego do mikrodysekcji laserowej nie różni się w istotny sposób od standardów pozyskiwania próbek do analiz molekularnych. Należy jednak pamiętać, iż czas od pobrania do zabezpieczenia materiału może być bardzo istotnym parametrem dla dalszych badań [6,10,13].

3.2. Utrwalanie wyjściowego materiału

Idealny sposób utrwalania biologicznego materiału powinien zabezpieczać zarówno jego morfologię, jak również skład i budowę interesujących nas cząsteczek. Z

komórek pozyskanych metodą LM powinno być możliwe wyizolowanie z wysoką wydajnością DNA, RNA oraz białek, które nie są ani zmodyfikowane, ani zdegradowane [13,22,42]. Ogólnie zabezpieczanie wyjściowego materiału do dalszych badań molekularnych w tzw. utrwalaczach precypitujących (tj. w alkoholu czy acetonie) jest bardziej preferowane w porównaniu z użyciem utrwalaczy, które tworzą tzw. wiązania krzyżowe pomiędzy grupami chemicznymi utrwalacza a strukturami komórkowymi (np. formalina) [8,9,17,18].

3.3. Przygotowanie preparatów histologicznych oraz cytologicznych

Preparat histologiczny do mikrodysekcji laserowej przygotowuje się przez przygotowanie odpowiedniej grubości skrawków materiału tkankowego (przy użyciu mikrotomu w przypadku blochków parafinowych lub kriostatu w przypadku tkanek mrożonych). Następnie, pozyskany skrawek umieszcza się delikatnie na szkiełku mikroskopowym bądź specjalnie zaprojektowanej membranie (w zależności od rodzaju aparatury wykorzystywanej do LM) [12,14,39]. Preparaty cytologiczne wykonuje się na ogół na podstawowych szkiełkach mikroskopowych lub membranach przy wykorzystaniu wirówki do izolowania materiału cytologicznego – cytospiny [10,21].

W celu uwidocznienia interesujących nas populacji komórek stosuje się najczęściej podstawowe barwniki histologiczne (tj. hematoksylinę i eozynę (HE), fiolet krezyliu, zieleni metylową itd.). Barwienie HE pozwala na wybarwienie jąder komórkowych oraz cytoplazmy, co uwidacznia elementy morfologiczne umożliwiające zidentyfikowanie pożądanych komórek na podstawie ich budowy [6,11,12,18]. Techniki immunohistochemiczne (IHC) oraz immunofluorescencyjne (IF) pozwalają natomiast na bardzo specyficzną identyfikację charakterystycznych składników komórek i tkanek na zasadzie tworzenia się kompleksów antygen - przeciwciało sprzężonego z reakcją barwną [5,23,26,31]. Kolejnym krokiem jest odwadnianie (dehydratacja) preparatu, przy wykorzystaniu roztworów alkoholu etylowego o rosnących stężeniach i/lub ksylenu [20,30,33].

Aby unikać ryzyka wystąpienia modyfikacji chemicznych pozyskiwanego materiału, zoptymalizowano protokoły przez zminimalizowanie czasu inkubacji oraz ilości używanych odczynników [2,4,8,24].

3.4. Wycinanie komórek

Sposób wycinania komórek metodą mikrodysekcji laserowej zależy od rodzaju wykorzystywanego sprzętu (rodzaju LM), co szczegółowo opisane zostało w kolejnym rozdziale.

4. RODZAJE MIKRODYSEKCJI LASEROWEJ

Niezależnie od rodzaju mikrodysekcji laserowej ogólna zasada metody jest wspólna. W pierwszej kolejności badacz identyfikuje i zaznacza na monitorze właściwe komórki lub struktury. Energia wiązki odpowiedniego lasera umożliwia

wyselekcjonowanie pożądaných fragmentów z preparatu. Następnie pozyskiwany materiał umieszczany jest na wieczku probówki Eppendorfa specjalnie zaprojektowanego do tego celu na kilka różnych sposobów w zależności od konstrukcji aparatu do mikrodysekcji laserowej. Z tak zebranego materiału izoluje się następnie kwasy nukleinowe lub białka, które podlegają dalszej analizie molekularnej [30,42].

W anglojęzycznej literaturze możemy odnaleźć wiele podziałów mikrodysekcji laserowej. Jednakże najpopularniejsze kryteria podziału zależą od rodzaju użytego lasera oraz sposobu wyodrębniania i przenoszenia izolowanych obiektów na wieczko probówki. Zasadniczo wyróżniamy więc dwa rodzaje mikrodysekcji laserowej: LCM (*laser capture microdissection*) – mikrodysekcja laserowa metodą wychwytywania oraz LMM (*laser microbeam microdissection*) – mikrodysekcja laserowa z użyciem mikrowiązki [25,41]. Metoda LCM wykorzystuje energię wiązki lasera IR do pozyskania pożądaných komórek na zasadzie „wychwytywania” (*capture*), co dokładnie omówiono w podpunkcie 5.1. Drugi rodzaj mikrodysekcji laserowej, czyli metoda LMM, wykorzystuje natomiast skupioną energię wiązki lasera UV, dzięki czemu dokonujemy „wycinania” (*excision*) pożądaných obiektów. Szczegóły dotyczące tej metody zawarte są w podrozdziale 5.2. [22,27].

Metoda typu LMM odznacza się większą precyzją w porównaniu z metodą typu LCM. Dlatego też LMM jest bardziej odpowiednia do wycinania małych obiektów, gdy precyzja cięcia odgrywa bardzo istotną rolę. Natomiast LCM lepiej sprawdza się do pozyskania relatywnie dużych fragmentów preparatu w szybkim czasie [10].

4.1. Zasada działania LCM

Do wykonywania LCM (*laser capture microdissection*) – **mikrodysekcji laserowej metodą wychwytywania** służy standardowy sprzęt produkowany przez firmę Arcturus Bioscience pod nazwą Arcturus PixCell, natomiast jego w pełni zautomatyzowana wersja to Arcturus AutoPix. Aparatura ta ma regulację średnicy wiązki lasera IR, co umożliwia dostosowanie jej do pozyskiwanego obszaru komórek [15,25,42]. Ogólne zasady działania tej metody ilustruje rycina 1 stworzona na podstawie Pinzani i wsp. [30], Ohtsu i wsp.[27] oraz Sluka [33].

Preparat obserwowany jest w świetle mikroskopu odwróconego. Wieczko probówki Eppendorfa z termoplastyczną membraną umieszczone zostaje na zaznaczonym przez badacza obszarze preparatu. Membrana ta wykonana jest z etylenowego octanu winylu – EVA (*ethylene vinyl acetate*), dzięki czemu możliwe jest jej stopienie z pobieranymi komórkami za pomocą energii wiązki lasera IR. Następnie po scaleniu się komórek z membraną siły adhezyjne umożliwiają selektywne wychwytywanie pożądaných obiektów na wieczko probówki Eppendorfa, gdzie są one zbierane do dalszych analiz [1,3,11].

4.2. Zasada działania LMM

Metoda LMM (*laser microbeam microdissection*) – **mikrodysekcja laserowa z użyciem mikrowiązki** polega na wycinaniu zaznaczonych obiektów skupioną wiązką lasera UV poprzez rozerwanie wiązań (tzw. ablacja świetlna) [10,30].

Wyróżnia się trzy odmiany mikodysekcji laserowej z użyciem mikrowiązki w zależności od sposobu przenoszenia zaznaczonych obiektów na wieczko probówki: LMPC, LMG, LMAL (rozwiniecie skrótów poniżej).

4.2.1. Zasada działania LMPC

Do przeprowadzania LMPC (*laser microdissection and collection by pressure catapulting*) – **mikrodysekcji laserowej metodą katapultowania** oferowany jest system PALM Microbeam głównie przez firmę Carl Zeiss MicroImaging [15,18,22]. Ogólne zasady działania LMPC ilustruje rycina 2 stworzona na podstawie Pinzani P i wsp. [30] oraz Sluka [33].

Rozpoznawanie odpowiednich obiektów w preparacie odbywa się przy wykorzystaniu mikroskopu odwróconego. W metodzie tej preparat na szkiełku mikroskopowym dodatkowo pokryty jest membraną z polietylenu naftalenu – PEN (*polyethylene naphthalate*), a pożądane komórki pozyskuje się w sposób bezkontaktowy, co minimalizuje ryzyko uszkodzenia i zanieczyszczenia [30,35]. W tym rodzaju mikrodysekcji występują dwa rodzaje wiązki lasera UV. Pierwszy typ to wiązka skupiona, która powoduje wspomnianą ablację, natomiast wiązka rozproszona powoduje oderwanie wyselekcjonowanych fragmentów na zasadzie tzw. katapulty ciśnieniowej (*pressure catapulting*). Oderwane fragmenty zostają umieszczone na wieczku probówki Eppendorfa, skąd są zbierane do dalszych badań [33,42].

4.2.2. Zasada działania LMG

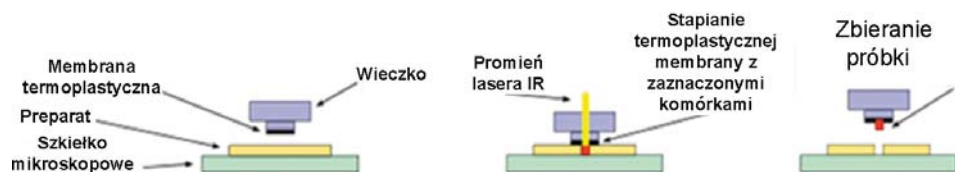
W pełni zautomatyzowany sprzęt do LMG (*laser microdissection and collection by gravity*) – **mikrodysekcji laserowej metodą opadania grawitacyjnego** stworzyła firma Leica Mikrosystems [15,18,22]. Ogólna zasada działania LMG przedstawia rycina 3 stworzona na podstawie Pinzani i wsp. [30] oraz Ohtsu i wsp.[27].

Pierwszą istotną cechą wyróżniającą ten typ mikrodysekcji laserowej jest zastosowanie do obserwacji komórek standardowego (prostego) mikroskopu świetlnego. Ponadto ponieważ preparat umieszczony jest na membranie PEN możliwe jest grawitacyjne opadanie wyciętych komórek na wieczko probówki po ich uprzednim wycięciu laserem UV [33,42].

4.2.3. Zasada działania LMAL

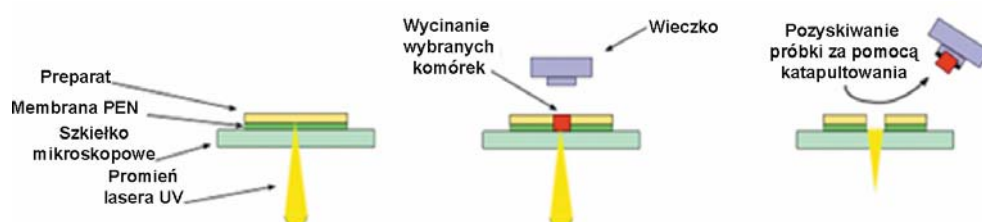
Do posługiwania się LMAL (*laser microdissection and collection by adhesive lid*) – **mikrodysekcją laserową metodą sił adhezyjnych** Firma Molecular Machines and Industries (MMI) wprowadziła serię aparatów nowej generacji o nazwie MMI CellCut oraz MMI SmartCut [10,18]. Zasadę działania LMAL obrazuje rycina 4 stworzona na podstawie Pinzani i wsp. [30], natomiast precyzję cięcia przedstawiają zdjęcia pozyskanych komórek na rycinie 5.

Membrana PET wykonana z polietylenu tereftalanu (*polyethylene terephthalate*) rozpięta jest na metalowej ramce, a na niej bezpośrednio umieszczany jest materiał biologiczny. Tak przygotowany preparat zabezpiecza się dodatkowo poprzez nałożenie sterylnej szkiełki mikroskopowej od strony preparatu. Następnie na



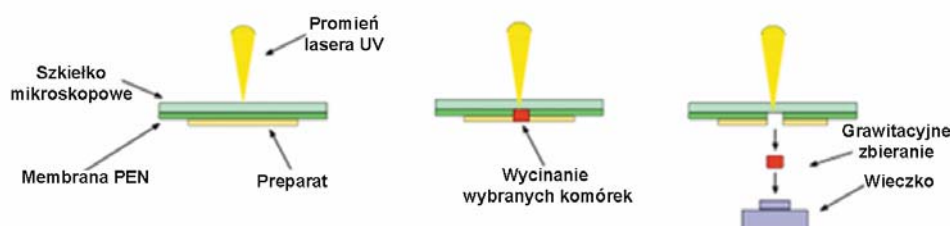
RYCINA 1. Zasada działania mikrodysekcji laserowej metodą wychwytywania LCM w modyfikacji własnej (szczegółowy opis w tekście)

FIGURE 1. Operating principles of laser capture microdissection LCM in own modification (detailed description in the manuscript)



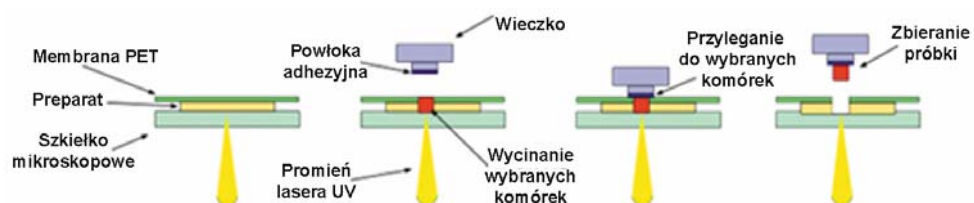
RYCINA 2. Zasada działania mikrodysekcji laserowej metodą katapultowania LMPC w modyfikacji własnej (szczegółowy opis w tekście)

FIGURE 2. Operating principles of laser microdissection and collection by pressure catapulting LMPC in own modification (detailed description in the manuscript)



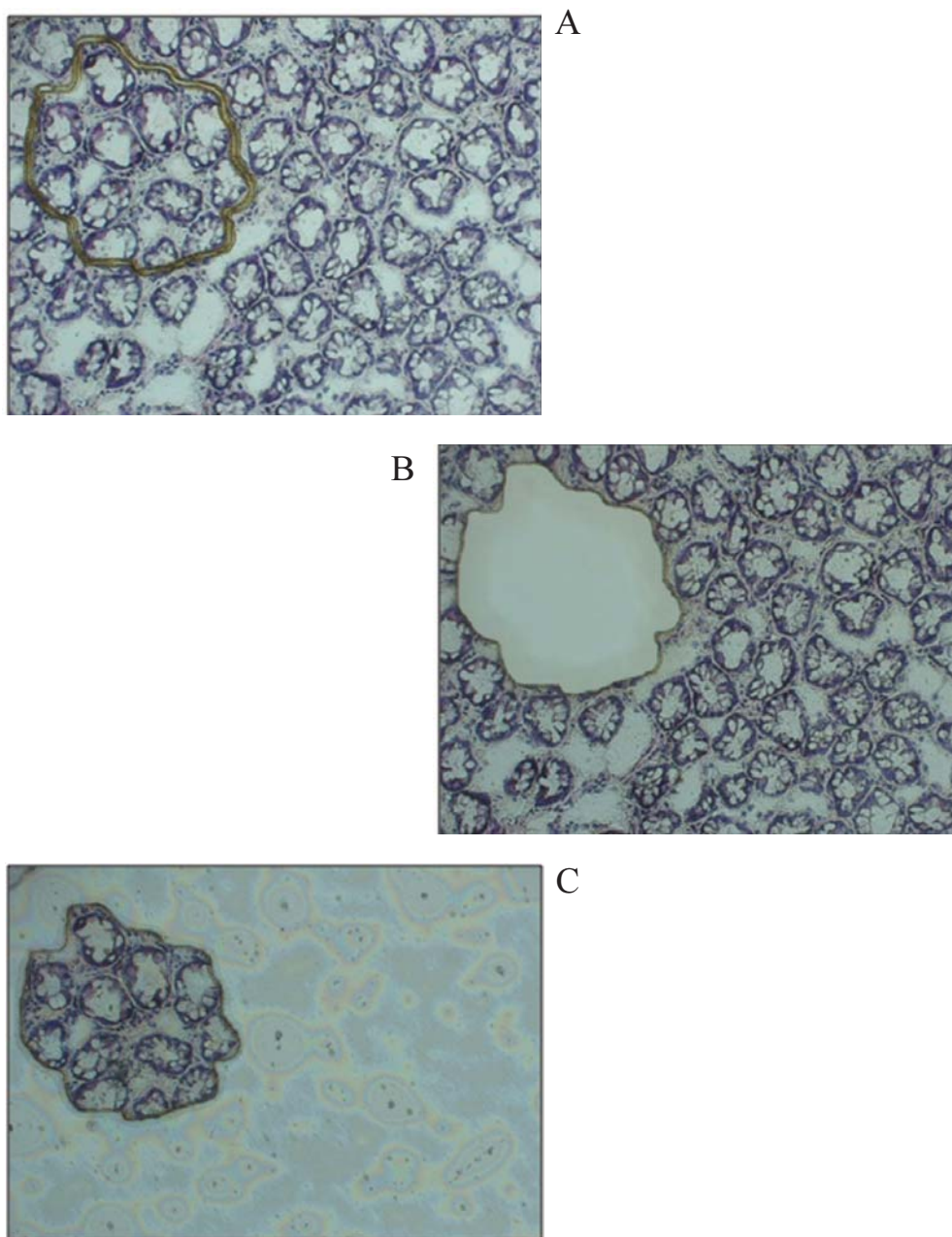
RYCINA 3. Zasada działania mikrodysekcji laserowej metodą opadania grawitacyjnego LMG w modyfikacji własnej (szczegółowy opis w tekście)

FIGURE 3. Operating principles of laser and collection by gravity LMG in own modification (detailed description in the manuscript)



RYCINA 4. Zasada działania mikrodysekcji laserowej metodą sił adhezyjnych LMAL w modyfikacji własnej (szczegółowy opis w tekście)

FIGURE 4. Operating principles of laser microdissection and collection by adhesive lid LMAL in own modification (detailed description in the manuscript)



RYCINA 5. Przykładowe zdjęcia komórek błony śluzowej jelita grubego pozyskiwanych z wykorzystaniem sprzętu CellCut firmy MMI: A. Komórki w preparacie histologicznym – barwienie hematoksyliną i eozyną (HE). B. Preparat histologiczny po wycięciu zaznaczonego obszaru. C. Komórki na adhezyjnym wieczku probówki Eppendorfa

FIGURE 5. Exemplary photos of colonic mucosa cells collected with the CellCut equipment of MMI company: A. Cells marked in histological specimen – hematoxylin and eosin stain (HE). B. Histological specimen after laser microdissection. C. Cells on adhesive lid after laser microdissection

wyciętym obszarze preparatu umieszcza się adhezyjne wieczko, które umożliwia precyzyjne pozyskanie wyciętych komórek [33,42].

Szczytowym osiągnięciem mikrodysekcji laserowej są w pełni zautomatyzowane aparaty firmy Molecular Devices o nazwie Arcturus XT lub Veritas, które wykorzystują zarówno laser IR, jak i UV. Dzięki takiemu połączeniu sprzęt ten umożliwia precyzyjne pozyskiwanie zarówno pojedynczych komórek, jak i dużych obszarów z badanego preparatu z dużą precyzją oraz w krótkim czasie [22,36,37].

5. MOLEKULARNA ANALIZA POZYSKANEGO MATERIAŁU

Po precyzyjnym pozyskaniu pożądanych komórek na wieczko, są one przenoszone bezpośrednio do probówki Eppendorfa z odpowiednim buforem, którego wybór zależy od cząsteczek jakie chcemy izolować oraz od rodzaju dalszych analiz molekularnych. Z obszernych danych literaturowych wynika, że materiał uzyskany metodą mikrodysekcji laserowej jest z powodzeniem wykorzystywany do izolacji i analizy DNA, RNA czy białek [3,11,15]. Z uwagi na fakt, iż mikrodysekcja laserowa dostarcza materiału w ilości rzędu nano- lub pikogramów często niezbędny jest proces preamplifikacji, aby uzyskać wystarczającą ilość wyjściowego materiału do dalszych badań [7,9,12]. Etapem wyjściowym dla analizy genów jest amplifikacja fragmentów badanego DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (*polymerase chain reaction*), natomiast w analizie ekspresji genów pierwszym etapem jest namnożenie cDNA na matrycy dojrzałego mRNA metodą odwrotnej transkrypcji łańcuchowej reakcji polimerazy RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) [8,14,20]. Jednakże przy pracy z białkami, należy wziąć pod uwagę fakt, że nie istnieją metody ich amplifikacji i dalsza analiza ograniczona jest do początkowych ilości pozyskanego materiału [6,17,18].

6. ZALETY I WADY MIKRODYSEKCJI LASEROWEJ

Mikrodysekcja laserowa zapewnia bardzo precyzyjne, szybkie i efektywne izolowanie pożądanego materiału [1,3]. Technika ta umożliwia pozyskanie komórek w praktycznie niezmienionym stanie, zarówno pod względem morfologicznym, jak i biochemicznym. Ponadto zmniejszenie prawdopodobieństwa kontaminacji powoduje, iż wyizolowane fragmenty preparatu mogą być z powodzeniem użyte do badań molekularnych [3,4,25]. Wszystkie te zalety spowodowały, że LM szybko stała się popularna w badaniach, gdzie kluczowym aspektem jest wyodrębnienie morfologicznie jednorodnych typów komórek z przeznaczeniem do analiz molekularnych [10,21].

Oprócz zalet, mikrodysekcja laserowa ma jednakże pewne ograniczenia. Jest ona niewątpliwie techniką kosztowną w porównaniu z innymi metodami pozyskiwania jednorodnych komórek. Wysokie koszty obejmują zarówno wymagania sprzętowe, jak również potrzebę zakupu specjalnie zaprojektowanych membran oraz probówek

Eppendorfa z odpowiednim wieczkiem [3,30]. Realny problem stanowi także niewielka ilość izolowanego materiału, która często jest niewystarczająca do dalszych analiz molekularnych – w przypadku kwasów nukleinowych możemy posłużyć się namnożeniem odpowiednich cząsteczek, natomiast w przypadku białek pozostaje nam jedynie połączenie materiału z kilku próbek [13,29,42]. Inną niedogodnością może być również czas wymagany do zebrania dostatecznej ilości potrzebnych komórek, jednakże jest on rekompensowany wysoką czystością pozyskanego materiału [9,30].

7. ZASTOSOWANIE MIKRODYSEKCJI LASEROWEJ

Odnaleźć można liczne prace opisujące zastosowanie mikrodysekcji laserowej w onkologii eksperymentalnej, medycynie sądowej, genetyce, immunologii, neurobiologii, diagnostyce, mikrobiologii, wirusologii czy też w badaniach farmaceutycznych [22,39,41]. Materiał pozyskiwany tą metodą może być z powodzeniem wykorzystywany w całym zakresie biologii molekularnej oraz wszystkich dziedzinach nauki wymagających precyzji i homogenności badanych próbek [11,16,21,25]. Ponieważ jedną z głównych trudności w badaniach z zakresu onkologii jest heterogenność materiału, szczególnie cenne jest tu zastosowanie mikrodysekcji laserowej do określenia charakterystycznych zmian molekularnych w zdefiniowanych typach komórek. Rozszyfrowanie profilu genetycznego i białkowego zmian przednowo-tworowych może dawać wskazówki o naturze przemian zachodzących podczas tej choroby [6,7,32,40]. Badania DNA umożliwiają między innymi: wykrywanie mutacji punktowych, określenie ubytku fragmentu chromosomów, jak również analizę metylacji DNA. Zdobyte w ten sposób informacje w istotny sposób poszerzają naszą wiedzę o procesach biologicznych [9,28,34]. Mikromacierze ekspresyjne umożliwiają natomiast przeanalizowanie ekspresji tysięcy genów w jednym eksperymencie. Dlatego połączenie mikrodysekcji laserowej z technologią mikromacierzy gwarantuje nam pełniejsze zrozumienie zróżnicowanych procesów fizjologicznych oraz patologicznych [5,19,23,31,36]. Ponadto zaawansowane technologie analizy białek (bazujące na takich metodach jak: dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakryloamidowym, spektroskopia masowa czy wysokosprawna chromatografia cieczowa) uzupełniają w pełni analizę molekularną jednorodnych populacji komórek [18,26,28,32,35].

PODSUMOWANIE

Dzięki postępowi, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie inżynierii laserów, elektronice, optyce oraz informatyce, możliwe stało się rozwinięcie tak zaawansowanej technologicznie metody pozyskiwania jednorodnego materiału z heterogennych struktur, jaką jest mikrodysekcja laserowa. Obecnie uważa się, iż określenie profilu ekspresji genów oraz białek w jednorodnych populacjach komórek stanowi najbardziej obiecującą analizę biologii molekularnej. Ponadto wykorzystywanie tego precyzyjnego narzędzia w badaniach z zakresu medycyny, owocuje identyfikowaniem

kolejnych biomarkerów różnych schorzeń, co ma znaczenie prognostyczne oraz pozwala określać nowe cele terapeutyczne.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy serdecznie dziękują Panu Profesorowi dr Andrzejowi Mazurowi za cenne wskazówki podczas redagowania pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ACHREM W, PARAFINIUK-PACHOLSKA M. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) i metoda laserowego pozyskiwania mikroskrawków (LCM) w genetycznych badaniach kryminalistycznych. *Problemy kryminalistyki* 2009; **263**: 12–18.
- [2] BEVILACQUA C, MAKHZAMI S, HELBLING JC, DEFRENAIX P, MARTIN P. Maintaining RNA integrity in a homogeneous population of mammary epithelial cells isolated by Laser Capture Microdissection. *BMC Cell Biology* 2010; **11**: 95.
- [3] BLATT R, SRINIVASAN S. Defining disease with laser precision: laser capture microdissection in gastroenterology. *Gastroenterology* 2008; **135**: 364–369.
- [4] BOTTLNER M, BAR F, VON KOSCHITZKY H, TAFAZZOLI K, ROBLICK UJ, BRUCH HP, WEDEL T. Laser microdissection as a new tool to investigate site-specific gene expression in enteric ganglia of the human intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2010; **22**: 168–172.
- [5] BROWN AL, SMITH DW. Improved RNA preservation for immunolabeling and laser microdissection. *RNA* 2009; **15**: 2364–2374.
- [6] BU LN, YANG SY, LI FT, SHANG WL, ZHANG W, HUO SF, NAN YD, TIAN YX, DU J, LIN XL, LIU YF, LIN YR, RONG BX. Study of differential proteins in lung adenocarcinoma using laser capture microdissection combined with liquid chip-mass spectrometry technology. *Chin Med J* 2010; **123**: 3309–3313.
- [7] CARETTI E, DEVARAJAN K, COUDRY R, ROSS E, CLAPPER ML, COOPER HS, BELLACOSA A. Comparison of RNA amplification methods and chip platforms for microarray analysis of samples processed by laser capture microdissection. *J Cell Biochem* 2008; **103**: 556–563.
- [8] DE SPIEGELAERE W, CORNILLIE P, VAN POUCKE M, PEELMAN L, BURVENICH C, VAN DER BROECK W. Quantitative mRNA expression analysis in kidney glomeruli using microdissection techniques. *Histol Histopathol* 2011; **26**: 267–275.
- [9] DIETRICH D, LESCHER R, TETZNER R, KRISPIN MK, HAEDICKE W, SCHUSTER M, KRISTIANSEN G. Analysis of DNA Methylation of Multiple Genes in Microdissected Cells From Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissues. *Histochemistry* 2009; **57**: 477–489.
- [10] DOMAZET B, MACLENNAN GT, LOPEZ-BELTRAN A, MONTIRONI R. Laser Capture Microdissection in the Genomic and Proteomic Era: Targeting the Genetic Basis of Cancer. *Int J Exp Pathol* 2008; **1**: 475–488.
- [11] EMMERT-BUCK MR, BONNER RF, SMITH PD, CHUAQUI RF, ZHUANG Z, GOLDSTEIN SR, WEISS RA, LIOTTA LA. Laser Capture Microdissection. *Science* 1996; **274**: 998–1001.
- [12] ERICKSON HS, ALBERT PS, GILLESPIE JW, RODRIGUEZ-CANALES J, MARSTON LINEHAN W, PINTO PA, CHUAQUI RF, EMMERT-BUCK MR. Quantitative RT-PCR gene expression analysis of laser microdissected tissue samples. *Nat Protoc* 2009; **4**: 902–922.
- [13] EUN JW, JEONG HS, KIM EJ, AHM YM, PARK WS, LEE JY, NAM SW. Evaluation and application of RNAs derived from laser microdissected specimens using DNA microarray for expression genomics. *BioChip J* 2010; **4**: 322–328.
- [14] FILLIERS M, DE SPIEGELAERE W, GOOSSENS K, BURVENICH C, VANDAELE L, CORNILLIE P, VAN SOOM A. Laser capture microdissection for gene expression analysis of inner cell mass and trophectoderm from blastocysts. *Anal Biochem* 2011; **408**: 169–171.
- [15] GOMEZ SK, HARRISON KJ. Laser microdissection and its application to analyze gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Pest Manag Sci* 2009; **65**: 504–511.

- [16] GREGG JL, BROWN KE, MINTZ EM, PIONTKIVSKA H, FRAIZER GC. Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. *BMC Cancer* 2010; **10**: 165-178.
- [17] GUO T, WANG W, RUDNICK PA, SONG T, LI J, ZHUANG Z, WEIL RJ, DEVOE DL, LEE CS, BALGLEY BM. Proteome Analysis of Microdissected Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissue Specimens. *J Histochemistry & Cytochemistry* 2007; **55**: 763-772.
- [18] GUTSEIN HB, MORRIS JS. Laser Capture Sampling and Analytical Issues in Proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2007; **4**: 627-637.
- [19] HAYASHI Y, MATSUNAGA T, YAMAMOTO G, NISHII K, USUI M, YAMAMOTO M, TACHIKAWA T. Comprehensive analysis of gene expression in the junctional epithelium by laser microdissection and microarray analysis. *J Periodontal Res* 2010; **45**: 618-625.
- [20] JAIS A, KLEIN D, WOLFESBERGER B, WALTER I. Gene expression profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in various cell types of the canine lymph node using laser capture microdissection (LCM). *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; **140**: 207-14.
- [21] KENNGOTT R, AL-BANAW A, VERMEHREN M, WENDL J, SINOWATZ F. Application of laser-assisted microdissection for gene expression analysis of mammalian germ cells. *Anat Histol Embryol* 2010; **39**: 219-226.
- [22] LIU A. Laser capture microdissection in the tissue biorepository. *J Biomol Tech* 2010; **21**: 120-125.
- [23] MARSELLI L, THORNE J, DAHIYA S, SGROIDC, SHARMA A, BONNER-WEIR S, MARCHETTI P, WEIR GC. Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS One* 2010; **5**: e11499.
- [24] MORROGH M, OLVERA N, BOGOMOLNIV F, BORGES PI, KING TA. Tissue preparation for laser capture microdissection and RNA extraction from fresh frozen breast tissue. *Biotechniques* 2007; **43**: 41-42, 44, 46.
- [25] MURRAY GI. An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochemica* 2007; **109**: 171-176.
- [26] MURUGESAN N, MACDONALD JA, LU Q, WU SL, HANCOCK WS, PACTER JS. Analysis of mouse brain microvascular endothelium using laser capture microdissection coupled with proteomics. *Methods Mol Biol* 2011; **686**: 297-311.
- [27] OHTSU K, TAKAHASHI H, SCHNABLE PS, NAKAZONO M. Cell type-specific gene expression profiling in plants by using a combination of laser microdissection and high-throughput technologies. *Plant Cell Physiol* 2007; **48**: 3-7.
- [28] PATEL V, HOOD B, CONRADS T, MOLINOLO A, LEE N, BRAISTED J, KRIZMAN D, VEENSTRA T, GUTKIND J. Proteomic Analysis of Laser-Captured Paraffin-Embedded Tissues: A Molecular Portrait of Head and Neck Cancer Progression. *Clinical Cancer Research* 2008; **14**: 1002-1014.
- [29] PAULA, YECHOOR V, RAJA R, CHAN L. Microarray gene profiling of laser-captured cells: a new tool to study atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis* 2008; **200**: 257-263.
- [30] PINZANI P, ORLANDO C, PAZZAGLI M. Laser-assisted microdissection for real-time PCR sample preparation. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; **27**: 140-159.
- [31] ROY S, PATEL D, KHANNA S, GORDILLO GM, BISWAS S, FRIEDMAN A, SEN CK. Transcriptome-wide analysis of blood vessels laser captured from human skin and chronic wound-edge tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 14472-71447.
- [32] SKVORTSOV S, SCHAFER G, STASYK T, FUCHSBERGER C, BONN GK, BARTSCH G, KLOCKER H, HUBER LA. Proteomics profiling of microdissected low- and high-grade prostate tumors identifies lamin a as a discriminatory biomarker. *J Proteome Res* 2011; **10**: 259-268.
- [33] SLUKAP, O'DONNELL L, MCLACHLAN RI, STANTON PG. Application of laser-capture microdissection to analysis of gene expression in the testis. *Prog Histochem Cytochem* 2008; **42**: 173-201.
- [34] SONNE SB, ALMSTRUP K, DALGAAED M, JUNCKER AS, EDSGARD D, RUBAN L, HARRISON NJ, SCHWAGER C, ABDOLLAHIA, HUBER PE, BRUNAK S, GJERDRUM LM, MOORE HD, ANDREWS PW, SKAKKEBAEK NE, RAJPERT-DE MEYTS E, LEFFERS H. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res* 2009; **69**: 5241-5250.
- [35] STINGL C, VAN VILSTEREN FG, GUZEL C, TEN KATE FJ, VISSER M, KRISHNADATH KK, BERGMAN JJ, LUIDER TM. Reproducibility of protein identification of selected cell types in Barrett's esophagus analyzed by combining laser-capture microdissection and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2011; **10**: 288-298.

- [36] SUWABE K, SUZUKI G, TAKAHASHI H, SHIONO K, ENDO M, YANO K, FUJITAM, MASUKO H, SAITO H, FUJIOKA T, KANEKO F, KAZAMA T, MIZUTA Y, KAWAGISHI-KOBAYASHI M, TSUTSUMI N, KURATA N, NAKAZONO M, WATANABE M. Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray. *Plant Cell Physiol* 2008; **49**: 1407–1416.
- [37] TANG X, ZHANG ZY, ZHANG WJ, ZHAO XM, LI X, ZHANG D, LIU QQ, TANG WH. Global gene profiling of laser-captured pollen mother cells indicates molecular pathways and gene subfamilies involved in rice meiosis. *Plant Physiol* 2010; **154**: 1855–1870.
- [38] WANG Y, ANTONOPOULOS DA, ZHU X, HARRELL L, HANAN I, ALVERDY JC, MEYER F, MUSCH MW, YOUNG VB, CHANG EB. Laser capture microdissection and metagenomic analysis of intact mucosa-associated microbial communities of human colon. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; **88**: 1333–1342.
- [39] WANG WZ, OESCHGER FM, LEE S, MOLNAR Z. High quality RNA from multiple brain regions simultaneously acquired by laser capture microdissection. *BMC Mol Biol* 2009; **10**: 69.
- [40] WANG S, WANG L, GAO X, LI J, WU Y, ZHU H. Improvement of tissue preparation for laser capture microdissection: application for cell type-specific miRNA expression profiling in colorectal tumors. *BMC Genomics* 2010; **11**: 163.
- [41] VANDEWOESTYNE M, DEFORCE D. Laser capture microdissection in forensic research: a review. *Int J Legal Med* 2010; **124**: 513–521.
- [42] VON EGGELING F, MELLE C, ERNST G. Microdissecting the proteome. *Proteomics* 2007; **7**: 2729–2737.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 05.10. 2010 r.

Przyjęto: 02.06. 2011 r.

mgr inż. Patrycja Wizińska

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna we Wrocławiu

ul. Chalubińskiego 6a, 50-368 Wrocław

e-mail: patrycjawizinska@gmail.com