

TESTY WITALNOŚCI KOMÓREK

Wstęp:

Każda komórka jest układem termodynamicznie otwartym wymieniającym ze swym otoczeniem materię i energię. Wymiana ta odbywa się poprzez błonę komórkową, której właściwości w dużej mierze decydują o kontrolowaniu przez komórkę swego wewnętrznego środowiska, co jest niezbędnym warunkiem korelacji wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych. Wszystkie trwałe uszkodzenia błony komórkowej prowadzą do śmierci komórki.

Testy żywotności (witalności) pozwalają na określenie naturalnego stanu błony komórkowej lub mierzą stan metaboliczny komórki i wskazują na potencjalną zdolność komórki do wzrostu i podziału i prawidłowej aktywności metabolicznej.

Można je podzielić na pewne grupy:

- I. - testy, które wykorzystują naturalną właściwość błony komórkowej jako bariery dla związków, które w fizjologicznym pH są anionami. Związki takie (barwniki) nie wnikają do żywych komórek ze względu na ujemny ładunek błony, ale po śmierci komórki (gdy błona zostanie trwale uszkodzona), ze względu na zanik potencjału pomiędzy zewnętrzną a wewnętrzną stroną błony, przenikają do wnętrza komórki barwiąc cytoplazmę lub jądro. Powszechnie stosowanym barwnikiem z tej grupy jest błękit trypanu, który wybarwia komórki martwe na kolor niebieski. Innymi barwnikami z tej grupy są: zielen lizaminowa, eozyna Y, erytrozyna B, nigrozyna.
- II. - testy, które oparte są na przechodzeniu przez błonę komórki drobnocząsteczkowych związków, które mogą być gromadzone w żywej komórce powodując jej wybarwienie. Powszechnie stosowanym związkiem z tej grupy jest dwuocian fluoresceiny, który szybko wnika do wnętrza komórki, gdzie pod wpływem esteraz uwalnia się zeń fluoresceina. Fluoresceina jest związkiem słabo rozpuszczalnym w wodzie w zakresie pH występującego w komórce, w związku z tym może dochodzić do jej znacznego nagromadzenia w komórce, co nie powoduje istotnej zmiany wartości osmotycznej wnętrza komórki. Utrzymywanie barwnika we wnętrzu komórki w dość wysokim stężeniu może zachodzić tylko w komórkach, które są zdolne do gromadzenia substancji w stężeniu wyższym niż występują one w środowisku, co w praktyce oznacza, że komórki takie mają nieuszkodzoną błonę i są żywe. Komórka, która nagromadziła w swym wnętrzu fluoresceinę jest widoczna w mikroskopie fluorescencyjnym, bo świeci na kolor zielony (fluorescencję wzbudza się światłem niebiesko-fioletowym). Uszkodzenie komórki pociąga za sobą natychmiastową dyfuzję fluoresceny do otaczającego środowiska i komórka staje się niewidoczna.
- III. Barwniki z tej grupy często używane są w testach żywotności opartych na podwójnych barwieniach, które umożliwiają uwidocznienie równocześnie komórek żywych i martwych. Powszechnie stosowanym testem podwójnego barwienia jest test z dwuocianem fluoresceiny (wybarwia komórki żywe) i bromkiem etydyny (wybarwia komórki martwe). Bromek etydyny, jodek propydydy, oranż akrydydy to związki (fluorochromy), które przechodzą przez uszkodzoną błonę i akumulują się w martwych komórkach dzięki specyficznemu wiązaniu się z kwasami nukleinowymi.
- IV. - testy, które polegają na wybarwieniu żywych komórek dzięki akumulacji barwników w pewnych organellach (np. wakuolach). Po śmierci komórki barwnik wydostaje się z wakuoli i dyfunduje do cytoplazmy (dochodzi do wyrównania stężeń barwnika między wnętrzem komórki w a otaczającym ją środowiskiem). Powszechnie używanym barwnikiem z tej grupy jest czerwień obojętna, barwnik rozpuszczalny w wodzie, który wnika do komórki żywej i akumuluje się we wnętrzu organelli o kwaśnym pH

(endosomy, lizosomy). Test żywotności z czerwienią obojętną trzeba stosować z dużą ostrożnością, gdyż wiele związków może odwracalnie zmieniać aktywność endocytozy fazy płynnej w żywych komórkach.

- V. - testy, które oparte są na określeniu aktywności metabolicznej komórek, np. aktywności oksydacyjnej komórki. Powszechnie stosowanym jest test MTT, który umożliwia pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Mierzy on żywotność komórek za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej (MTT - substratu rozpuszczalnego w wodzie, o zabarwieniu białym lub żółtym) do nierozpuszczalnego *formazanu* (o zabarwieniu ciemno-niebieskim). Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. Test MTT może być używany do określania żywotności komórek szczególnie w populacjach komórek już nie dzielących się, ale aktywnych metabolicznie. Musi jednak być stosowany z dużą ostrożnością, gdyż wiele komórek żywych może nie wykazywać aktywności oksydacyjnej mitochondriów.

Do precyzyjnych pomiarów żywotności komórek (np. przy ocenie cytotoksyczności badanych związków) warto skompilować 2 różne testy witalności np. test z błękitem trypanu i test z dwuocetanem fluoresceiny i bromkiem etydyny lub test z czerwienią obojętną i test z błękitem trypanu itp.

Ćwiczenie ma na celu praktyczne zapoznanie się z wybranymi testami żywotności komórek (wykonanie testów z błękitem trypanu oraz z dwuocetanem fluoresceiny i bromkiem etydyny), porównanie wyników uzyskanych 2 różnymi testami i przeprowadzenie poprawnej analizy otrzymanych wyników.

Materiały:

1. hodowle komórek prawidłowych - makrofagi linii P388D1
- komórki wysiane w małych szalkach Petriego (lub probówkach hodowlanych- „skosach”) w pożywce MEM z 10% FCS (płodową surowicą cielęcą) i antybiotykiem
2. hodowle komórek nowotworowych - melanoma B16 lub sarkoma XC
- komórki wysiane w małych szalkach Petriego (lub probówkach hodowlanych- „skosach”) w pożywce MEM z 10% SB (surowicą bydlęcą) i antybiotykiem
3. błękit trypanu (1% roztwór barwnika w PBS)
4. dwuocetan fluoresceiny (25µg/ml PBS)
5. bromek etydyny (1 mg/ml PBS)
6. 96% alkohol etylowy
7. pożywka hodowlana: MEM z 10% FCS i antybiotykiem
lub MEM z 10% SB i antybiotykiem (zależy od typu komórek)
8. 0,25% trypsyna w PBS
9. PBS

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotować mikroskop MB 30S do pracy w jasnym polu i kontraście-faz (dla obiektywu PhS 20x)
2. Przygotować (w probówkach) po 5 ml roztworów: 5% i 15% alkoholu etylowego (rozcieńczyć 96% wyjściowy roztwór alkoholu płynem hodowlanym MEM z 10% surowicą, tak aby końcowa objętość wynosiła 5 ml).
3. Wybrać do doświadczeń 1 linię komórek z przygotowanych hodowli *in vitro* i oglądać komórki pod mikroskopem odwróconym.

4. W jednym naczyniu z komórkami zmienić pożywkę hodowlaną na pożywkę zawierającą 5% alkoholu; naczynie umieścić w cieplarni w 37°C na 20 min.
5. W drugim naczyniu z komórkami zmienić pożywkę hodowlaną na pożywkę zawierającą 15% alkoholu; naczynie umieścić w cieplarni na 20 min.
6. W tym czasie z określić wyjściową żywotność komórek w hodowli (kontrola) – wykorzystać trzecie naczynie hodowlane z komórkami.
W tym celu:
 - a) zlać płyn z nad komórek do próbówki wirówkowej
 - b) przepłukać komórki ciepłym PBS
 - c) oderwać komórki od podłoża przez trypsynizację (dodać 0,5ml 0,25% trypsyny w PBS na około 1 min)
 - d) zawiesić komórki w pożywce hodowlanej (dodać 2 ml pożywki MEM z 10% z surowicą i starannie wymieszać), zawiesinę komórek wlać do próbówki z nadsączem, uzupełnić pożywką do 5ml i starannie wymieszać;
 - e) komórki odwirować (1000obr/min, przez 5 min); nadsącz zlać, a komórki zawiesić w 0,3ml pożywki i dokładnie rozpipetować
 - f) w przygotowanej zawieszynie oznaczyć żywotność komórek 2 sposobami: testem z błękitem trypanu oraz - testem z dwuocetanem fluoresceiny i bromkiem etydyny.
7. Po zakończonej inkubacji komórek w pożywce z 5% alkoholem oznaczyć żywotność komórek testem z błękitem trypanu oraz testem z dwuocetanem fluoresceiny i bromkiem etydyny (postępując analogicznie jak w punkcie 6).
8. Analogicznie postąpić z komórkami inkubowanymi w pożywce z 15% alkoholem.
9. Porównać wszystkie otrzymane wyniki.
Jakie błędy popełnia się przy stosowaniu poszczególnych testów?

Test żywotności z błękitem trypanu:

1. Na wyczyszczone szkiełko podstawowe dać kroplę (10 µl) 0,2% roztworu błękitu trypanu w PBS i kroplę (10µl) zawiesziny komórek (delikatnie wymieszać); pozostawić na 2 min, a następnie przykryć czystym szkiełkiem nakrywkowym.
2. Policzyc w mikroskopie MB30S (w jasnym polu) komórki niezabarwione (żywe) i zabarwione na kolor niebieski (martwe).
Określić wyjściową żywotność komórek w hodowli.

Test żywotności z dwuocetanem fluoresceiny i bromkiem etydyny:

1. Na wyczyszczone szkiełko podstawowe (do fluorescencji) dać kroplę (10µl) mieszaniny 1:1 roztworów dwuocetanu fluoresceiny (FDA) i bromku etydyny i kroplę (10µl) zawiesziny komórek (delikatnie wymieszać); przykryć czystym szkiełkiem nakrywkowym do fluorescencji.
3. Po 3 minutach policzyć w mikroskopie fluorescencyjnym BIOLAR FL(w świetle niebiesko-fioletowym) komórki świecące na kolor zielony (żywe) i świecące na kolor czerwony (martwe).
Uwaga: fluorescencję komórek oglądać przy włączonych filtrach 1 i 3, a wszystkie komórki oglądać przy włączonym filtrze 8 (a wyłączonych filtrach 1 i 3).
Określić wyjściową żywotność komórek w hodowli.

Żywotność komórek w badanej populacji należy wyrazić jako zawartość komórek żywych [%] w badanej populacji komórek.

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

1. Transport przez błonę komórkową.
2. Testy vitalności - rodzaje, zastosowanie, ograniczenia.
3. Barwniki stosowane do wizualizacji struktur w komórkach żywych i utrwalonych.