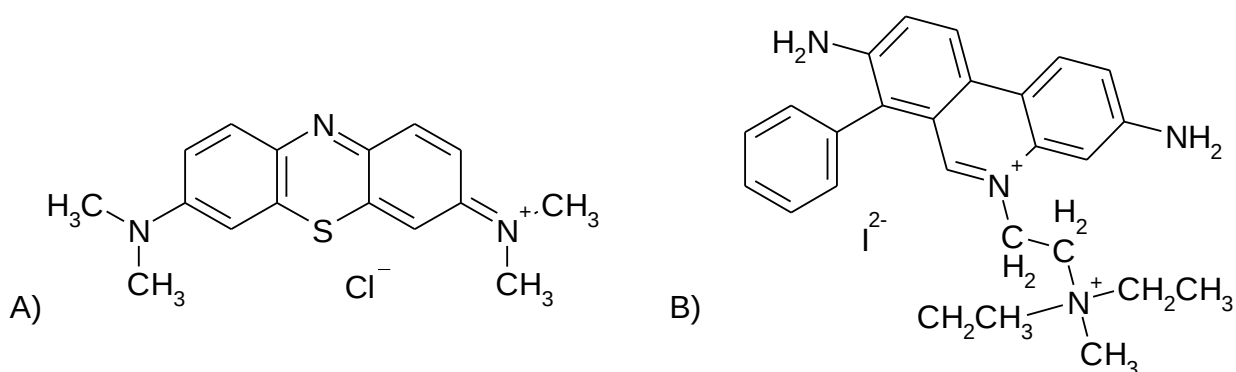


Téma: Testy životaschopnosti a Počítání buněk

Úvod:

Při práci s buňkami je jedním ze základních sledovaných parametrů stanovení jejich životaschopnosti (viability). Tímto termínem se rozumí určení poměru živých a mrtvých buněk v populaci. Testování životaschopnosti je nezbytné při určování cytotoxického účinku některých látek, při běžné práci s buněčnými kulturami nebo například v kryobiologii, která se zabývá účinkem nízkých teplot na živé organismy, orgány a buňky.

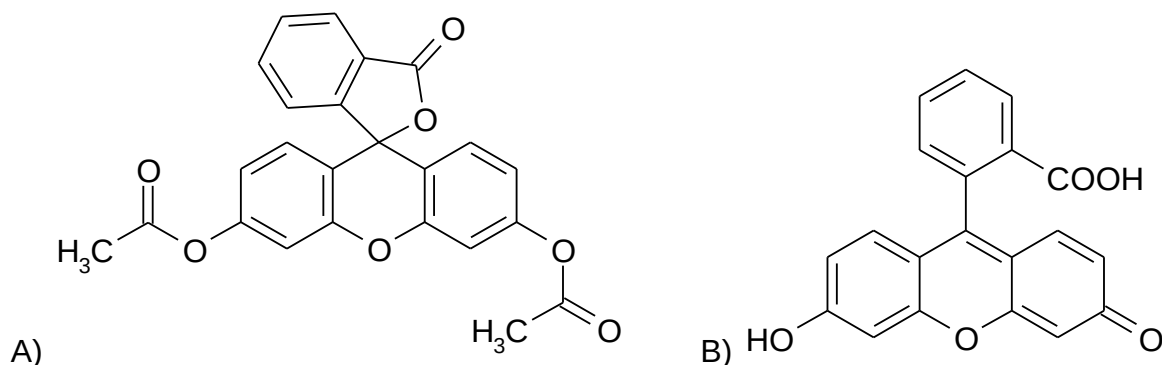
První skupina metod pro analýzu viability je založena na neporušenosti a selektivní propustnosti plazmatické membrány živé buňky, která využívá barviv s nízkou molekulovou hmotností nesoucích kladný nebo záporný náboj. Tyto sloučeniny mohou procházet pouze přes porušenou membránu mrtvých buněk, zatímco živé buňky zůstávají nezbarvené, neboť jejich intaktní membrána barvivo nepropustí. Tuto skupinu metod můžeme rozdělit na testy kolorimetrické a fluorescenční. Příkladem barviva využívaného pro kolorimetrické stanovení buněčné viability může být například methylenová modř (Obr. 1A). Zástupcem barviv využívaných pro fluorescenční stanovení životaschopnosti je propidium jodid (Obr. 1B).



Obr. 1: chemická struktura methylenové modři (A) a propidium jodidu (B).

Další skupinu pak mohou tvořit metody studia životaschopnosti buněk založené na detekci funkčního metabolismu. Principem těchto metod je schopnost živé buňky metabolizovat substrát na derivát, který je následně možné detekovat. Na tomto principu je postaven například test životaschopnosti buněk pomocí FDA (fluorescein diacetát). FDA (Obr. 2A) je nepolární látka, která snadno prostupuje plazmatickou membránou. V živých buňkách je poté FDA metabolizován na vysoce

polární fluorescein (Obr. 2B), pro který je již membrána dále nepropustná, a proto dochází k jeho hromadění uvnitř buňky. Molekula fluoresceinu se vyznačuje fluorescencí, kterou je možné následně detekovat. Excitační vlnová délka záření pro fluorescein je 490 nm, po ozáření světlem o této vlnové délce dochází k emisi záření o vlnové délce 513 nm.



Obr. 2: chemická struktura fluorescein diacetátu (A) a fluoresceinu (B).

Na podobném principu je založeno také testování viability za pomoci calceinu AM. Acetomethoxy derivát calceinu je hydrofobní sloučenina, která snadno prochází přes membránu živých, intaktních buněk. Hydrolyzou calceinu AM intracelulárními esterasami vzniká calcein, hydrofilní silně fluorescenční sloučenina (Excitační/emisní vlnová délka calceinu je 495/515 nm).

Další nezbytnou dovedností při práci v biologických a medicínských oborech je přesné stanovení počtu buněk ve vzorku. Své nezastupitelné místo nachází například v hematologii při stanovování zastoupení jednotlivých krevních elementů ve vzorku krve.

Pro určení koncentrace buněk v suspenzi se využívají dva základní přístupy. První využívá speciálních počítacích komůrek ve spojení se světelnou mikroskopií, druhý přístup využívá automatizovaného počítání za pomoci speciálních přístrojů.

Počítací komůrky jsou tvořeny silným podložním sklem se dvěma vyrytými počítacími sítěmi s přesně danou plochou a hloubkou. Jednou z nejčastěji využívaných počítacích komůrek je Bürkerova komůrka. Počítací síť Bürkerovy komůrky je tvořena 9 velkými čtverci (každý o ploše 1 mm²), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců (jejich plocha je 0,04 mm²) (Obr. 3 a Tab. 1).

Při počítání buněk pomocí počítací komůrky je nejprve nanesen malý objem testované suspenze mezi krycí a podložní sklo. Takto připravená počítací komůrka se vloží do zorného pole světelného mikroskopu a po zaostření se může přistoupit k samotnému počítání částic. Při počítání mikroskopických částic pomocí počítacích komůrek se započítávají pouze ty, které se nacházejí uvnitř čtverce a částice, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkají dvou stanovených stran (např. horní a levá) (Obr. 4). Tím se zabrání dvojímu počítání částic.

Pro stanovení koncentrace částic v 1 ml suspenze se používá výpočet:

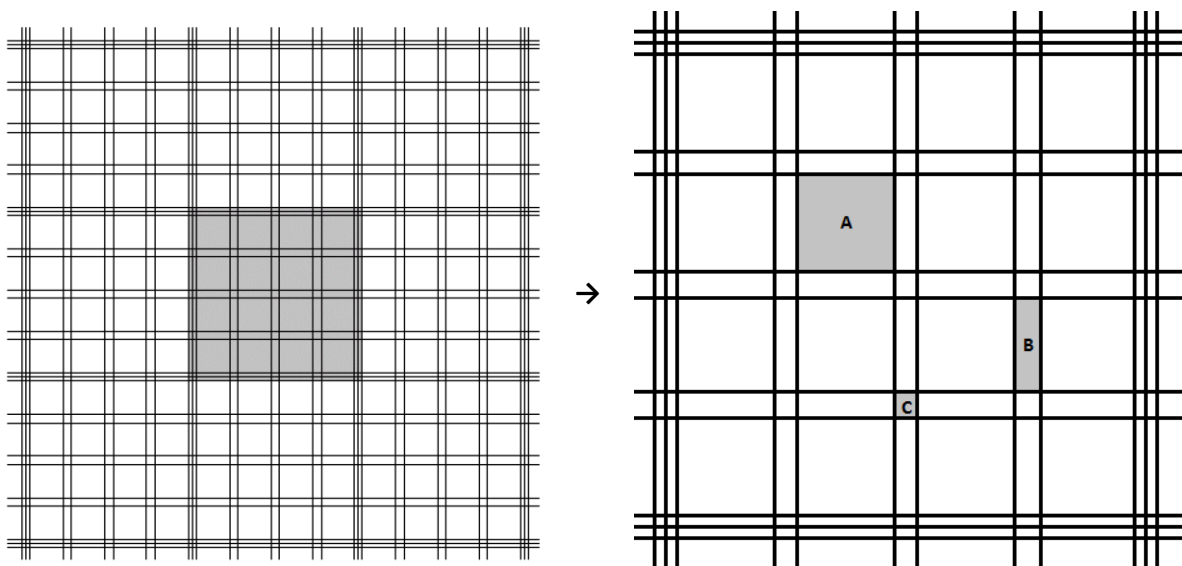
$$X = \frac{a \cdot 1000}{n \cdot V}$$

X... koncentrace buněk v 1 ml suspenze

a... stanovený počet buněk

n... počet opakování (počet spočítaných čtverců)

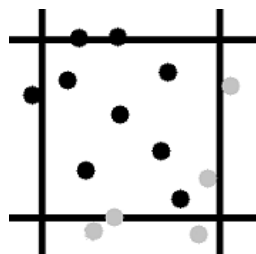
V... objem počítaného útvaru



Obr. 3: Počítací síť Bürkerovy komůrky.

Tab. 1: Velikost útvarů v počítací síti Bürkerovy komůrky.

	Rozměry	Plocha	Hloubka	Objem
Velký čtverec	1 x 1 mm	1 mm ²	0,1 mm	0,1 mm ³
Čtverec A	0,2 x 0,2 mm	0,04 mm ²	0,1 mm	0,004 mm ³
Obdélník B	0,05 x 0,2 mm	0,01 mm ²	0,1 mm	0,001 mm ³
Čtverec C	0,05 x 0,05 mm	0,0025 mm ²	0,1 mm	0,00025 mm ³



Obr. 4. Pravidlo pro počítání částic v počítací komůrce. Do celkového počtu částic se započítávají pouze ty, které leží nebo se dotýkají dvou zvolených stran, v tomto případě horní a levá (označeny černě). Částice dotýkající se pravé a spodní strany nezapočítáváme (označeny šedě).

Úkol č. 1: Stanovení životaschopnosti *Saccharomyces cerevisiae* barvením methylenovou modří

Chemikálie: 0,1% vodný roztok metylenové modři

Postup:

- Pro stanovení procentuální viability buněk se používá vzorec:

$$\% \text{ žitواسchapnost} = (\text{počet živých buněk} / \text{celkový počet buněk}) \times 100$$

- | Stanovení životaschopnosti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--------|
| Zorné pole | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. | průměr |
| Počet živých buněk | | | | | | | | | | | |
| Počet mrtvých buněk | | | | | | | | | | | |
| Výpočet % životaschopnosti | | | | | | | | | | | |

Úkol č. 3: Stanovení koncentrace buněk v suspenzi

Biologický materiál: suspenze buněčné linie Sf9

Chemikálie: PBS

Pomůcky: vortex, Bürkerova komůrka, automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop

Postup:

1. Dobře zhomogenizujte buněčnou suspenzi pomocí vortexu.
2. Napipetujte 15 μ l buněčné suspenze na hranu krycího skla Bürkerovy komůrky tak, aby suspenze rovnoměrně pokrývala celou počítací plochu komůrky.
3. Bürkerovu komůrku vložte do zorného pole mikroskopu a při malém zvětšení objektivu (4x) nejprve najděte počítací síť.
4. Při větším zvětšení objektivu (10x) potom spočítejte buňky v 10 čtvercích (čtverec A).
5. Vypočítejte průměrný počet buněk v 10 čtvercích.
6. Stanovte koncentraci buněk v 1 ml suspenze.
7. Poté buněčnou suspenzi 5x zředte přidáním PBS a stejným způsobem napipetujte 15 μ l buněčné suspenze i do prostoru druhé počítací sítě.
8. Spočítejte buňky v 10 čtvercích, stanovte koncentraci buněk v 1 ml suspenze.
9. Výsledky obou počítání porovnejte.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	celkem
Počet buněk Původní koncentrace											
Počet buněk Zředěná suspenze											

Výpočet koncentrace buněk v 1 ml suspenze:

Otázky:

1. Vysvětlete rozdíly mezi principy při určování životnosti buněk pomocí barvení methylenovou modří a FDA, zaměřte se na vztah propustnosti plazmatické membrány k použitým barvivům. Zdůvodněte, která z použitých metod barví živé a která neživé buňky.
2. Jaké další typy počítacích komůrek znáte? Uveďte několik příkladů.