

Téma: Testy životaschopnosti buněk

Úvod:

Životaschopnost buněk je jedním ze základních parametrů, které jsou při práci s buněčnými kulturami posuzovány. Testování životnosti a cytotoxicity je založeno na měření podílu živých a mrtvých buněk v populaci. K určení životnosti buněk se používají nejčastěji fluorescenční a kolorimetrické testy, další možností jsou testy využívající radionuklidy.

Jednou ze skupin metod hodnocení viability je sledování životnosti buněk po působení barviv jak klasických, jako je například methylenová či trypanová modř, nebo fluorescenčních prób. Principem metody je selektivní propustnost plazmatické membrány živé buňky za předpokladu plně zachované membránové i funkční aktivity buňky. Methylenová modř prostupuje pouze do mrtvých buněk s narušenou strukturou plazmatické membrány a následně se uvnitř buňky hromadí, tím lze odlišit živé buňky od mrtvých. Živé buňky s intaktní plazmatickou membránou zůstávají totiž nezbarvené, nebo jsou jen velmi slabě zbarvené, protože methylenová modř plazmatickou membránou neprochází.

Dalším možným způsobem určování životnosti je detekce funkčního metabolismu buněk. V případě tohoto přístupu jde o zjišťování přítomnosti produktu metabolismu, který má jiné vlastnosti než substrát z něhož vzniká. Principem těchto testů je tedy schopnost živé buňky metabolizovat substrát na derivát, který je možno následně detekovat či kvantifikovat například měřením fluorescence. Na tomto principu je postaven také test životnosti buněk pomocí FDA (fluorescein diacetát). FDA je nepolární látka, která snadno prochází přes plazmatickou membránu. V živých buňkách je však metabolizována na vysoce polární fluorescein, pro který je už membrána nepropustná, a proto dochází k jeho hromadění uvnitř buňky. Fluorescein se navíc na rozdíl od FDA vyznačuje fluorescencí, kterou je možné detekovat. Fluorescence fluoresceinu je však značně závislá na pH. Excitační/emisní vlnová délka záření pro fluorescein je 490/513 nm při pH 9. FDA je v současné době nahrazován dalšími indikátory životnosti buněk jako je například calcein AM, 2',7'-bis-(2-karboxyetyl)-5-(a6)-karboxyfluorescein, acetoxymetyl ester (BCECF, AM), karboxyeosin diacetát, karboxyfluorescein diacetát, které vykazují vysoký záchyt v živých buňkách a silnou fluorescenci.

Určování životaschopnosti buněk nachází své uplatnění také v kryobiologii. Kryobiologie je obor zabývající se účinkem chladu a nízkých teplot na živé organismy, tkáně a buňky. Při zamrazení buněk na teplotu -5 °C nezamrzá sice ještě voda uvnitř buněk, ale dochází ke ztrátám vody z buněk vlivem osmotických dějů. Voda v okolí buňky zamrzá, čímž se vytváří pro buňky nepříznivé hypertonické prostředí. Při zamrazení na -38 °C zamrzá i voda uvnitř buněk. Vznikají zde ledové krystaly, které ničí jemné struktury buňky. Aby se daly buňky a tkáně zamrazit a nedošlo k jejich poškození, je nutné je předem ošetřit kryoprotektory. Mezi nejčastěji používané kryoprotektory patří glycerol a DMSO (dimethyl sulfoxid), z dalších lze pak jmenovat ethylenglykol, propylenglykol, glukózu, sacharózu nebo prolin. Obecně jde o látky s nízkou teplotou bodu mrazu. Buňky jsou těmito látkami během kryoprezervace nasyceny, tím dochází k vytěsnění vody z buněk a buňky se stávají mrazuodolnými. Takto upravené buňky jsou uskladněny při velmi nízkých teplotách okolo

-135 °C až -196 °C. Nevýhodou látek používaných jako kryoprezervanty je jejich toxicita, proto je nutné kryoprezervanty po rozmražení opět odstranit a určit viabilitu buněk.

Poznatků kryobiologie se využívá k uchovávání buněk v životaschopném stavu po dlouhou dobu. To je umožněno díky rychlému a hlubokému zmrazení buněk či malých kousků tkání. Takto lze uchovávat například spermie pro umělou inseminaci a vajíčka pro pozdější *in vitro* oplození, dále také jednoduché tkáně složené pouze z malého počtu buněčných typů, jako jsou například kostní štěpy, srdeční chlopně, rohovka, cévy či ranná embrya, aby došlo k rovnoměrnému promražení. Z tohoto důvodu nelze použít kryoprezervaci k uchovávání celých orgánů, ty lze udržovat v životaschopném stavu pouze několik hodin při teplotě okolo 0 °C. Významná je kryoprezervace také pro konzervaci potravin.

Úkol č. 1: Stanovení životaschopnosti buněk barvením methylenovou modří

Materiál: kvasinková suspenze *Saccharomyces cerevisiae* (kvasinka pивní) ve vodném roztoku sacharózy

Chemikálie: 0,1% vodný roztok methylenové modři

Pomůcky: pipeta; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Na vortexu jemně zhomogenizujte suspenzi kvasinek.
2. Na podložní sklo naneste 15 μ l kvasinkové suspenze a smíchejte ji s 10 μ l methylenové modři.
3. Suspenzi kvasinek nechte s barvivem inkubovat 2 minuty a poté překryjete krycím sklíčkem.
4. Pod mikroskopem při zvětšení objektivu 40x spočítejte v deseti zorných polích zbarvené a nezbarvené buňky. Počty zaznamenejte do tabulky a ze zjištěných hodnot stanovte viabilitu buněk. Zjištěné hodnoty porovnejte s hodnotami viability svých spolužáků a srovnání uveďte do protokolu.

Úkol č. 2: Stanovení životaschopnosti buněk barvením FDA

Materiál: kvasinková suspenze *saccharomyces cerevisiae* (kvasinka pивní) ve vodném roztoku sacharózy

Chemikálie: roztok FDA (fluorescein diacetát) o koncentraci 1 mg/ml

Pomůcky: pipeta; fluorescenční mikroskop OLYMPUS + mikroskopické potřeby

Postup:

1. Pracujte ve skupinách.
2. Na vortexu zhomogenizujte suspenzi kvasinek.
3. Přidejte 2 μ l roztoku FDA (1 mg/ml FDA) k suspenzi buněk. Pozn. 2 μ l roztoku FDA na 10^6 buněk v 1 ml média.
4. Buněčnou suspenzi jemně zvortexujte a nechte 15 inkubovat při 37 °C.
5. Vyhodnoťte životaschopnost buněk. Excitační spektrum fluoresceinu je 488 nm a emisní spektrum je 530 ± 20 nm.
6. V deseti zorných polích spočítejte zbarvené a nezbarvené buňky. Počty zaznamenejte do tabulky a ze zjištěných hodnot stanovte viabilitu buněk. Zjištěné hodnoty porovnejte s hodnotami viability svých spolužáků a srovnání uveďte do protokolu.

Úkol č. 3: Stanovení životaschopnosti buněk po hlubokém zamrazení

Materiál: kvasinková suspenze *Saccharomyces cerevisiae* (kvasinka pivní) ve vodném roztoku sacharózy

Chemikálie: 0,01% vodný roztok methylenové modři; roztok FDA (fluorescein diacetát) o koncentraci 1 mg/ml; tekutý dusík

Pomůcky: pipeta; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby; nádoba na tekutý dusík; kryozkumavka; vodní lázeň; pinzeta

Postup:

1. Na vortexu zhomogenizujte suspenzi kvasinek.
2. Do kryozkumavky napipetujte 0,5 ml suspenze kvasinek. Kryozkumavku uzavřete a popište.
3. Kryozkumavku ponořte na 20 minut do nádoby s tekutým dusíkem (-196 °C).
4. Po 20 minutách zkumavku pomocí pinzety vytáhněte z nádoby s tekutým dusíkem a vložte ji na 5 minut do vodní lázně vyhřáté na 37 °C.
5. Otestujte životnost buněk po hlubokém zmrazení stejným způsobem jako kontrolní suspenze. Stanovení životnosti methylenovou modří provede opět každý sám a viabilitu pomocí FDA stanovte ve skupinách. Zjištěné hodnoty porovnejte s hodnotami viability svých spolužáků a srovnání uveďte do protokolu.

Tabulka I: Hodnocení životaschopnosti buněk

Kontrolní suspenze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> naznačená methylenovou modří											
Zorné pole	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	průměr
Počet živých buněk											
Počet mrtvých buněk											
% životaschopnosti											

Hlubokozmrazená suspenze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> naznačená methylenovou modří											
Zorné pole	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	průměr
Počet živých buněk											
Počet mrtvých buněk											
% životaschopnosti											

Kontrolní suspenze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> naznačená FDA											
Zorné pole	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	průměr
Počet živých buněk											
Počet mrtvých buněk											
% životaschopnosti											

Hlubokozmrazená suspenze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> naznačená FDA											
Zorné pole	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	průměr
Počet živých buněk											
Počet mrtvých buněk											
% životaschopnosti											

Stanovení viability buněk (%):

% životaschopnost buněk = (počet živých buněk / celkový počet buněk) x 100

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. Zdůvodněte změnu v životnosti buněk po hlubokém zamrazení.
3. Pokuste se určit, který z použitých způsobů stanovení životnosti je přesnější a proč.
4. K nízkým teplotám jsou citlivější rostlinné či živočišné buňky? Zdůvodněte.

Použitá literatura:

<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>

<http://media.wiley.com/CurrentProtocols/0471161314/0471161314-sampleUnit.pdf>