

PODSTAWY BIOLOGII KOMÓRKI

Bankowanie komórek i ocena ich żywotności

Wstęp

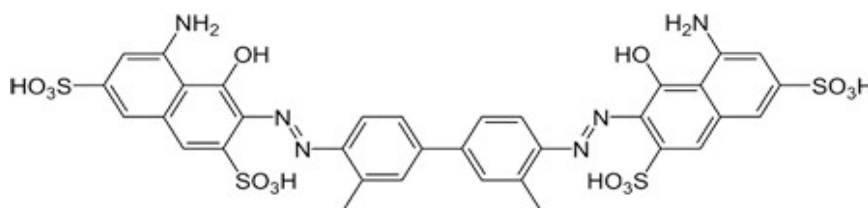
Jedną z rutynowych metod laboratoryjnych stosowanych we współczesnej biologii jest długotrwałe przechowywanie żywych komórek w obniżonej temperaturze. Metoda ta jest szczególnie przydatna dla zabezpieczenia wyselekcjonowanych linii komórkowych o często unikalnych właściwościach. Bankowanie komórek pozwala również na przerwanie pracy z danym rodzajem komórek na dowolny okres czasu. Zamrożone komórki najczęściej przechowywane są w ciekłym azocie.

Zamrażaniu komórek często towarzyszy nieodwracalne uszkodzenie będące wynikiem powstawania dużych kryształków lodu. Zjawisku temu w dużym stopniu zapobiega zamrażanie w obecności krioprotektantów – najczęściej glicerolu lub dimetylosulfotlenku (DMSO). Aby uzyskać maksymalny stopień przeżywalności komórek, należy je stosunkowo wolno zamrażać i szybko odmrażać. Zamrażanie nie może jednak być zbyt wolne, gdyż sytuacja taka sprzyja powstawaniu kryształków lodu. Z drugiej strony czas zamrażania musi być wystarczający na zadziałanie środków zabezpieczających (DMSO, glicerol). Optymalna prędkość obniżania temperatury w trakcie zamrażania wynosi 1 °C/min. Przeprowadzając mrożenie komórek w zamrażarce programowanej można sterować dynamiką mrożenia indywidualnie dla bankowanej linii komórkowej wykorzystując zoptymalizowane protokoły.

Bankowaniu należy poddawać komórki będące w dobrej kondycji, gdyż pomimo najwyższej ostrożności i stosowaniu odpowiednich krioprotektantów, proces ten nie jest dla komórek obojętny i może mu towarzyszyć wzmożona śmiertelność. W celu oceny kondycji komórek, zarówno przed procesem bankowania, jak i po rozmrożeniu komórek, wskazana jest ocena ich żywotności przy użyciu wybranych testów.

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 środowiska, co jest niezbędnym warunkiem koordynacji wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych. Ponieważ wszystkie trwałe uszkodzenia błony komórkowej prowadzą do śmierci komórki, większość testów żywotności (witalności) komórek hodowanych *in vitro*, nastawiona być powinna na określenie jej integralności. Alternatywnie szereg technik mierzy stan metaboliczny komórki, w ten sposób wskazując na potencjalną zdolność komórki do prawidłowej aktywności metabolicznej, a w konsekwencji do wzrostu i podziału.

Testy, które wykorzystują naturalną właściwość błony komórkowej jako bariery dla związków, powinny wykorzystywać związki będące anionami w fizjologicznym pH. Nie wnikają one do żywych komórek ze względu na ujemny ładunek nieuszkodzonej błony, ale po śmierci komórki (gdy błona zostanie trwale uszkodzona i następuje zanik potencjału pomiędzy zewnętrzną a wewnętrzną stroną błony) przenikają do wnętrza komórki barwiąc cytoplazmę lub/i jądro. Najpowszechniej stosowanym barwnikiem z tej grupy jest błękit trypanu (Ryc. 1), który wybarwia komórki martwe na kolor niebieski, ale podobne zastosowanie mogą mieć również zieleń lizaminowa, eozyna Y i erytrozyna B.



Ryc.1. Wzór strukturalny błękitu trypanu.

Podejściem alternatywnym do technik wykorzystujących wyżej wymienione związki jest zastosowanie substancji, które w formie zestryfikowanej swobodnie penetrują nienaruszoną błonę komórkową, natomiast ich de-estryfikacja powoduje wytrącenie w formie wolnej. Prowadzi to do znacznego nagromadzenia substancji w cytoplazmie. Przykładem takich substancji jest calceinaAM i dwuocian fluoresceiny. Koncentracja fluoresceiny w komórce możliwa jest wyłącznie gdy: (i) błona komórkowa jest nienaruszona i (ii) w komórce aktywne są enzymy, w tym te z grupy esteraz. Taka komórka widoczna jest w mikroskopie fluorescencyjnym, gdyż fluoresceina w niej zawarta emituje światło zielone w odpowiedzi na wzbudzenie światłem niebieskim. Ocenę żywotności usprawnia jednocześnie uwidocznienie komórek martwych, np. dzięki zastosowaniu barwników w minimalnym stopniu zdolnych do penetracji nienaruszonych błon komórkowych, natomiast akumulujących się w uszkodzonych (martwych) komórkach dzięki ich zdolności do wiązania się z kwasami nukleinowymi. W testach tych stosuje się np. jodek propydyiny, oranż akrydyiny a przede wszystkim bromek etydyiny. Powyższe podejście pozwala na odmienne wybarwienie komórek żywych (na kolor zielony) i martwych (czerwony/pomarańczowy), przez co są one bardzo łatwe do rozróżnienia.

Innymi dość powszechnie stosowanymi procedurami analizy żywotności komórek są testy określające aktywność metaboliczną komórek. Powszechnie stosowanym testem z tej grupy 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. Sole tetrazolowe są redukowane do formazanu dzięki działaniu dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu aktywnego tylko w komórkach o nienaruszonym metabolizmie i łańcuchu oddechowym. Ilość formazanu zostaje obliczona kolorymetrycznie i koreluje z liczbą żywych komórek.

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z podstawową procedurą bankowania komórek, jak i ocena ich żywotności przy użyciu popularnej metody z zastosowaniem błękitu trypanu.

Wykonanie ćwiczenia

1. Podzielić się na 4 zespoły.
2. **Wykonać pasaż komórek hodowanych w otrzymanym naczyniu:**
 - a. ocenić liczebność komórek w hodowli pod mikroskopem odwróconym, jak również obserwując „pod światło” dno naczynia hodowlanego
 - b. z naczynia zlać płyn hodowlany po czym natychmiast:
 - c. delikatnie zalać komórki ok. 1 ml roztworu PBS, przepłukać je, po czym roztwór usunąć i natychmiast:
 - d. komórki zalać ok. 1 ml roztworu 0.25% trypsyny (trypsynę rozprowadzić dokładnie po całym dnie naczynia) na ok. 10 sekund;
 - e. następnie usunąć nadmiar trypsyny pozostawiając w naczyniu jej niewielką objętość, komórki inkubować w obecności trypsyny od 20 sekund do 2 minut, kontrolując (pod światło” stopień odrywania się komórek od podłoża (ewentualnie naczynie wstrząsnąć celem przyspieszenia procesu).

- f. natychmiast po oderwaniu się komórek od podłoża (obserwowanym „pod światło” lub w mikroskopie odwróconym), komórki zawiesić w 2ml pożywki hodowlanej (MEM + 5% surowicy cielęcej + antybiotyki), w ten sposób inaktywując trypsynę
 - g. uzyskaną zawiesinę przenieść pipetą do probówki, zamknąć i wirować 5 min. przy 1000 obr./min.
 - h. po odwirowaniu nadsącz zlać, pelet zalać 1 ml świeżej pożywki, a komórki dokładnie lecz delikatnie rozpipetować
- 3. Oznaczyć liczbę i żywotność komórek:**
- a. policzyć (świeżo rozpipetowane!) komórki w komorze Bürkera (wykorzystać 10 μ l zawiesiny komórek)
 - b. określić przy pomocy błękitu trypanu żywotność komórek:
 - na wyczyszczone szkiełko podstawowe nakropić 10 μ l roztworu błękitu trypanu w PBS i następnie 10 μ l zawiesiny komórek (delikatnie wymieszać „rozpipetowując”); pozostawić na 2 minuty, usunąć ewentualne pęcherzyki powietrza, a następnie przykryć czystym szkiełkiem nakrywkowym
 - policzyć w mikroskopie (w kontraście faz) komórki niezabarwione (żywe) i zabarwione na kolor niebieski (martwe), określić wyjściową żywotność komórek w hodowli (obliczyć % komórek żywych)
- 4. Przygotowanie komórek do oceny wpływu etanolu na ich żywotność**
- a. Przenieść do osobnej probówki typu eppendorf objętość zawiesiny zawierającą 100 tys. komórek w celu przeprowadzenia inkubacji z alkoholem etylowym.
 - b. Do poszczególnych probówek zaaplikować objętość alkoholu etylowego (o stężeniu 96%) tak, żeby uzyskać ostateczne stężenie wynoszące 5, 10 lub 15% (jedno stężenie na podgrupę).
 - c. W przypadku próby kontrolnej sporządzonej przez jedną z podgrup, proszę nie dodawać alkoholu do zawiesiny komórek.
 - d. Tak przygotowane zawiesiny proszę poddać inkubacji przez 20 min w cieplarni.
- 5. Przeprowadzić proces bankowania komórek:**
- a. „rozpipetować” ponownie zawiesinę komórek
 - b. 0,8 ml zawiesiny komórek przenieść do probówki mrożeniowej, dodać 0,1 ml surowicy (FBS) oraz 0,1 ml DMSO (DMSO należy dodawać na końcu) i delikatnie wymieszać
 - c. probówki zamknąć, umieścić pudełku z polistyrenu i przenieść do zamrażarki na okres 1 godziny (uwaga: optymalny czas mrożenia w -80°C wynosi 2 godziny, po czym komórki zwykle są umieszczane w butli z ciekłym azotem)
- 6. Ocena żywotności komórek inkubowanych z etanolem**
- a. Zawiesinę komórek poddaną inkubacji z alkoholem etylowym rozpipetować delikatnie. Pobrać z niej 10 μ l i przeprowadzić test żywotności w sposób analogiczny jak poprzednio.
 - b. Porównując wyniki pomiędzy podgrupami ocenić, jak alkohol etylowy wpływa na żywotność badanych komórek.
- 7. Odbankowanie komórek:**
- a. probówki z zamrożonymi komórkami rozmrozić (umieścić w zlewce z letnią wodą)
 - b. rozmrożoną zawiesinę przenieść natychmiast do probówki (15 ml) i dodawać kroplami 3 ml świeżej pożywki hodowlanej (po dodaniu każdej kropli delikatnie wstrząsnąć probówką w celu przemieszania)
 - c. zwirować zawiesinę komórek (1000 obrotów na minutę, 5 minut)

- d. delikatnie wyjąć probówki z wirówki, przenieść pod komorę laminarną, zdecydowanym ruchem zlać roztwór pożywki znad osadu (peletu) komórek
- e. zawiesić pelet komórek w 1 ml świeżej pożywki hodowlanej i dokładnie, ale jednocześnie delikatnie „rozpipetować” (ok. 15-20 razy)
- f. oznaczyć żywotność komórek (patrz punkt 3b)

Zakres materiału obowiązujący do ćwiczeń

- Hodowla tkanek, jej rozwój i znaczenie dla rozwoju nauki.
- Hodowle pierwotne i linie komórkowe.
- Bankowanie komórek.
- Testy witalności - rodzaje, zastosowanie, ograniczenia.

Proponowana literatura

„Hodowla komórek i tkanek” pod redakcją Stanisławy Stokłosowej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006

Rozdz. 1 str. 2-6

Rozdz. 5 str. 45-50

Rozdz. 6 str. 51-60

Rozdz. 11 str. 140-152

Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. - Freshney RJ, 2010 Wiley-Blackwell

Rozdz. 19. Cryopreservation str. 317-327

Rozdz. 21. Cytotoxicity str. 365-376

Methods in Molecular Biology, vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition. Edited by: J.G. Day and G.N. Stacey © Humana Press Inc., Totowa, NJ – rozdziały 3, 16, 19. (dla zainteresowanych)

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am.J.Physiol. 247, 1984 (dla zainteresowanych)

<http://www.prostatecancercentre.ca/wp-content/uploads/2014/10/Mazur.pdf>