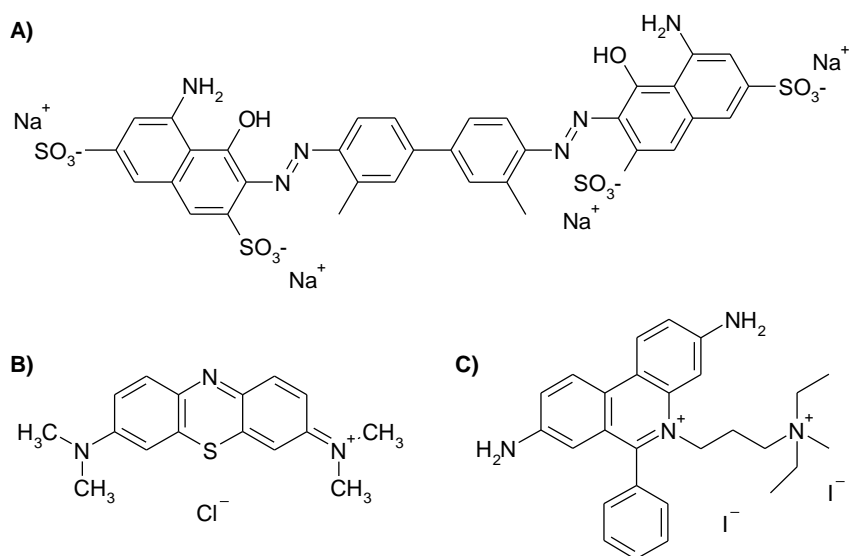


3. TESTY ŽIVOTASCHOPNOSTI A POČÍTÁNÍ BUNĚK

TEORETICKÝ ÚVOD:

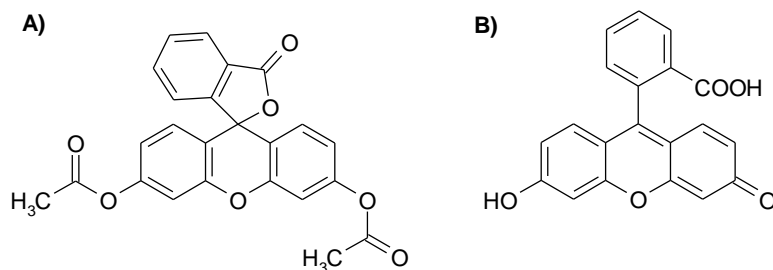
Při práci s buňkami je jedním ze základních sledovaných parametrů stanovení jejich životaschopnosti (viability). Tímto termínem se rozumí určení poměru živých buněk ku celkovému počtu buněk v populaci. Testování životaschopnosti je běžné při práci s buněčnými kulturami a metody studia viability jsou rovněž nezbytné například při určování cytotoxického účinku látek.

První skupina metod používaných pro studium viability je založena na neporušenosti a selektivní propustnosti plazmatické membrány živé buňky. Tyto metody využívají 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 trypanová nebo methylenová modř (Obr. 1A, B). Zástupcem barviv využívaných pro fluorescenční stanovení životaschopnosti je propidium jodid (Obr. 1C).



Obr. 1: Chemická struktura trypanové modři (A), methylenové modři (B) a propidium jodidu (C).

Další skupinu pak mohou tvořit metody studia životaschopnosti buněk založené na detekci funkčního metabolismu. Principem těchto metod je schopnost živé buňky metabolizovat určitý substrát na derivát, který je následně možné detekovat. Na tomto principu je postaven například testování životaschopnosti buněk pomocí fluorescein diacetátu (FDA; Obr. 2A). FDA 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 acetomethoxy derivátu calceinu (calcein AM). Calcein AM je hydrofobní sloučenina, která snadno prochází přes membránu živých, intaktních buněk. Hydrolýzou 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 počítačích komůrek ve spojení se světelnou mikroskopií, druhý přístup využívá automatizovaného počítání za pomoci speciálních přístrojů. Počítačové 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). Tím se zabrání dvojitmu počítání částic.

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

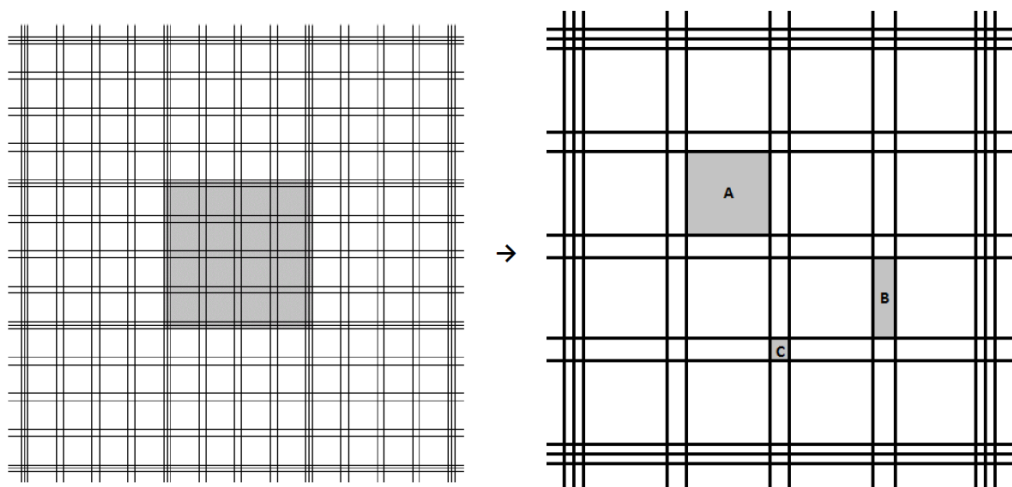
$$X = \frac{a \cdot 1000}{n \cdot V}$$

X ... koncentrace buněk v 1 ml suspenze

a ... stanovený počet buněk

n ... počet opakování (počet spočítaných čtverců)

V ... objem počítaného útvaru



Obr. 2. Počítací síť Bürkerovy komůrky.

Tab. 1: Velikost útvarů v počítačí 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

Při automatizované analýze koncentrace buněk v suspenzi jsou využívány specializované přístroje. Princip měření buněk se u jednotlivých typů přístrojů liší. Příkladem může být elektronické počítání částic, které je založeno na nasávání přesného objemu buněčné suspenze ve slabém elektrolytu úzkou štěrbinou mezi dvěma elektrodami. Průchod buňky způsobí zvýšení odporu, což vyvolá elektrický impuls, který je přístrojem zaznamenán.

Úkol č. 1: Stanovení životaschopnosti barvením trypanovou modří

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)

Chemikálie: 0,4% vodný roztok trypanové modří

Pomůcky: vortex, automatické pipety + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické pomůcky

Postup:

1. Na vortexu zhomogenizujte buněčnou kulturu.
2. Na podložní sklo napipetujte 20 μ l buněčné kultury a smíchejte ji s 5 μ l trypanové modří.
3. Nechte inkubovat po dobu 2 min a poté přikryjte krycím sklíčkem.
4. Pozorujte pod mikroskopem. Spočítejte počet živých a mrtvých buněk v 5ti zorných polích při zvětšení objektivu 40x, zapište do tabulky a stanovte viabilitu buněk.

Stanovení procentuální viability buněk:

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

5. Zjištěné hodnoty porovnejte s hodnotami svých spolužáků a srovnání uveďte do protokolu.

Stanovení životaschopnosti buněk Sf9 za fyziologických podmínek						
Zorné pole	1.	2.	3.	4.	5.	Celkem
Počet živých b.						
Počet mrtvých b.						
Výpočet % životaschopnosti						

Úkol č. 2: Stanovení vlivu vysokých a nízkých teplot na životaschopnost buněk Sf9

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)

Chemikálie: 0,4% vodný roztok trypanové modři, tekutý dusík

Pomůcky: vortex, automatické pipety + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické pomůcky, termoblok, kádinka, zkumavky

Postup:

1. Připravte si 2 zkumavky eppendorf a popište je svými iniciálami.
2. Na vortexu zhomogenizujte buněčnou kulturu a do každé zkumavky napipetujte 40 μl buněčné suspenze.
3. Jednu zkumavku ponořte do nádoby s tekutým dusíkem po dobu 20 min, druhou zkumavku do vodní lázně přehřáté na 90 °C po dobu 15 min.
4. Poté napipetujte 20 μl buněčné kultury a smíchejte ji s 5 μl trypanové modři.
5. Nechte inkubovat po dobu 2 min a poté přikryjte krycím sklíčkem.

6. Pozorujte pod mikroskopem. Spočítejte počet živých a mrtvých buněk v 5ti zorných polích při zvětšení objektivu 40x, zapište do tabulky a stanovte viabilitu buněk.
7. Zjištěné hodnoty porovnejte s hodnotami svých spolužáků a srovnání uveďte do protokolu.

Stanovení životaschopnosti buněk Sf9 po působení tekutého dusíku						
Zorné pole	1.	2.	3.	4.	5.	Celkem
Počet živých b.						
Počet mrtvých b.						
Výpočet % životaschopnosti						

Stanovení životaschopnosti buněk Sf9 po působení 90 °C						
Zorné pole	1.	2.	3.	4.	5.	Celkem
Počet živých b.						
Počet mrtvých b.						
Výpočet % životaschopnosti						

Úkol č. 2: Stanovení počtu buněk v suspenzi

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)

Chemikálie: PBS

Pomůcky: vortex, automatické pipety + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické pomůcky, zkumavky, Bürkerova komůrka

Postup:

1. Na vortexu zhomogenizujte buněčnou kulturu

2. Napipetujte 15 μ l suspenze na hranu krycího skla Bürkerovy komůrky tak, aby suspenze rovnoměrně pokrývala celou počítací plochu komůrky.
3. Nejprve při malém zvětšení objektivu (4x) najděte počítací síť a poté při větším zvětšení objektivu (10x) spočítejte buňky ve 3 velkých čtvercích ohraničených trojitou čarou, tj. čtverec o ploše $16 \times (A+2B+C)$.
4. Stanovte počet buněk v 1 ml suspenze a ze tří hodnot vypočítejte průměr.
5. Poté buněčnou suspenzi zředte 3x v roztoku PBS a stejným způsobem stanovte počet buněk v 1 ml suspenze.

	nezředěná suspenze			zředěná suspenze		
Čtverec Bürkerovy komůrky	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Počet buněk						
Počet buněk v 1 ml suspenze						
Průměr						

Otázky:

1. Vysvětlete rozdíly mezi principy při určování viability buněk pomocí barvení trypanovou modří a FDA. Vysvětlete, která z použitých metod barví živé a která neživé buňky a proč.
2. Jaké další typy počítacích komůrek znáte? Uveďte několik příkladů.