

Temat ćwiczenia: **Techniki stosowane w badaniach toksyczności *in vitro***

Miarą aktywności cytotoksycznej badanej substancji jest określenie stężenia hamującego, **IC₅₀** (ang. inhibitory concentration), dla którego wzrost i proliferacja komórek w hodowli zostają zahamowane w 50%, w stosunku do wzrostu komórek kontrolnych.

Związki chemiczne oddziałują na komórkę w różny sposób zaburzając jej procesy fizjologiczne, a zaistniałe zmiany można obserwować stosując różne techniki pomiarowe jak np.: kolorymetrię, fluorymetrię, bioluminescencję czy pomiar scyntylicyjny.

Stosowanych jest cały szereg testów do oceny aktywności cytotoksycznej wykorzystujących:

– zmiany w integralności błony komórkowej;

(1) barwnik **błękit trypanu** barwi wyłącznie martwe komórki, nie wnikając do cytoplazmy komórek żywych, co jest związane ze zmianą w integralności błony komórkowej. Komórki z zabarwioną na ciemnoniebiesko błoną komórkową zliczane są w komorze hemocytometru, w mikroskopie świetlnym.

(2) **dehydrogenaza mleczanowa** jest enzymem cytoplazmatycznym (test LDH), który na skutek zmian w integralności błony komórkowej przemieszcza się z komórki do pożywki hodowlanej. W teście LDH wykorzystuje się reakcję redukcji soli tetrazoliowej do barwnego formazanu, którego intensywność zabarwienia jest mierzona spektrofotometrycznie

- zmiany w aktywności lizosomów;

(1) barwnik **czerwień obojętna** przechodzi na drodze transportu biernego do cytoplazmy i gromadzi się w lizosomach. Zabarwione na czerwono komórki zliczane są w komorze hemocytometru lub spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji roztworu uzyskanego po rozpuszczeniu barwnika w 1% roztworze acetonu zawierającego 30% etanolu, po uprzednim usunięciu podłoża hodowlanego.

(2) **fosfataza kwaśna** (test PAC) jest to enzym lizosomalny należący do grupy fosfomonoesteraz. Aktywność enzymu jest mierzona przy pomocy przekształcenia p- nitrofenylofosforanu (pNPP) do p-nitrofenolanu (pNP), co koreluje z liczbą komórek. Ilość produktu reakcji jest określana spektrofotometrycznie

– aktywność enzymów związanych z metabolizmem komórki;

(1) **dehydrogenaza bursztynianowa** jest enzymem mitochondrialnym (test MTT), który redukuje rozpuszczalny w wodzie bromek tetrazoliowy do formazanu, wytrącającego się w podłożu w postaci nierozpuszczalnych, szarofioletowych kryształów. Intensywność zabarwienia roztworu po rozpuszczeniu kryształów, mierzona jest spektrofotometrycznie. Test MTT jest obecnie najczęściej stosowany do oceny działania cytotoksycznego.

(2) **N-acetylo-beta-D-glukozaminidaza** jest enzymem lizosomalnym (test NAG), który w przypadkach uszkodzenia komórki przechodzi do podłoża hodowlanego.

(3) test **alamarBlue** pozwala na ocenę aktywności enzymatycznej procesów utleniania i redukcji w odniesieniu do kontroli. W teście tym resauryny o barwie niebieskiej, która w

procesach oksydoredukcyjnych jest przekształcana w resorufinę o różowej fluorescencji. Pomiar ilości powstałego produktu może być przeprowadzony spektrofotometrycznie lub fluorymetrycznie.

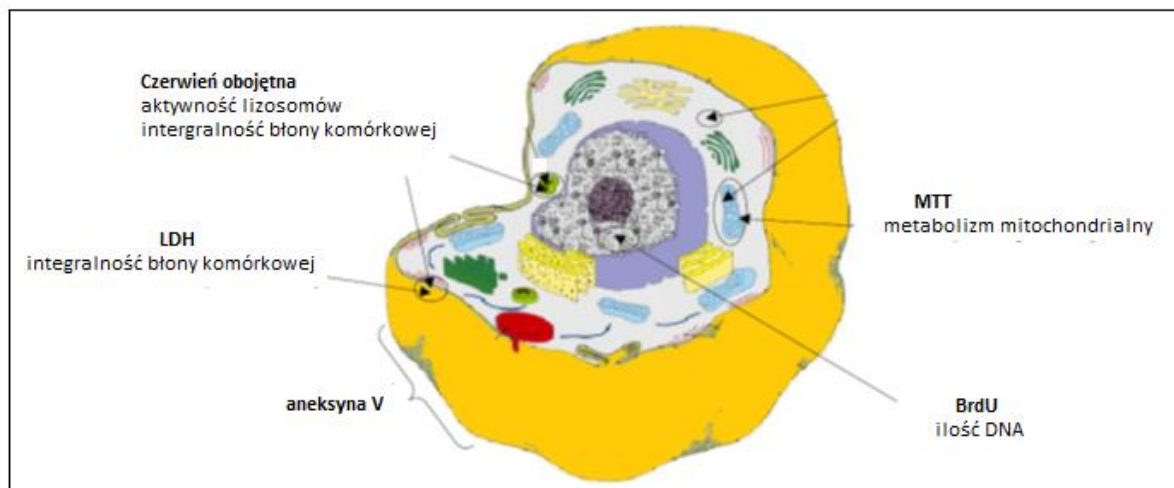
– zdolność komórki do podziałów, czyli proliferacji;

(1) najczęściej w tym celu stosuje się wbudowywanie prekursorów syntezy DNA, **trytowana tymidyna** – [H3] tymidyna i pomiar scyntylicyjny promieniowania β .

(2) alternatywą jest **bromodeoksyurydyna** (ang. bromodeoxyuridine, BrdU) syntetyczny analog nukleozydu tymidyny. Pomiaru dokonuje się za pomocą specyficznego przeciwciała sprzężonego z enzymem oraz reakcji enzymatycznej powyższego enzymu z chromogennym substratem pozwalającym na kolorymetryczną analizę.

– aktywacja szlaków programowanej śmierci komórki;

(1) barwienie komórek **aneksyną V** wiążącą fosfatydyloserynę, która we wczesnej apoptozie przemieszcza się na zewnątrz błony komórkowej. Pomiar wykonuje się w mikroskopie fluorescencyjnym lub z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.



Rycina 1. Testy stosowane do oceny cytotoksyczności wraz z parametrami mierzonymi.

Zastosowanie modeli komórkowych w badaniach toksykologicznych posiada wiele zalet, takich jak: szybkość i łatwość badania procesów komórkowych i molekularnych, powtarzalność, możliwość stosowania niewielkich ilości badanych substancji, czy możliwość pracy na komórkach ludzkich.

Ćwiczenie ma na celu praktyczne zapoznanie się w testem Alamarblue określającym cytotoksyczność poprzez pomiar aktywność enzymów komórkowych i przeprowadzenie poprawnej analizy otrzymanych wyników.

Przed przystąpieniem do pracy:

1. umyć ręce mydłem i płynem odkażającym;
2. założyć fartuch laboratoryjny i rękawiczki;
3. przenieść odczynnik alamarBlue do łaźni wodnej (37°C)
4. przygotować miejsce do pracy (pipety automatyczne, końcówki do pipet, płytka 96-dołkowa, pojemnik na odpady);

Wykonanie ćwiczenia:



Rycina 2. Schemat procedury dla testu alamarBlue .

1. Do hodowli komórkowej, traktowanej związkiem cytotoksycznym w różnych dawkach, za pomocą sterylnej pipety dodać odczynnik alamarBlue w ilości stanowiącej 10 % objętości pożywki w dołku hodowlanym;
 2. Przygotować próbę ślepą, poprzez dodanie do dołka z pożywką hodowlaną (nie zawierającą komórek) odczynnik alamarBlue jak w punkcie 1;
 3. Tak przygotowaną płytkę wstawić do inkubatora (37°C, 5% CO₂) na okres 1 godziny;
 4. Po inkubacji, przenieść pożywkę hodowlaną do korespondujących dołków płytki 96-dołkowej;
 5. Przenieść płytkę do czytnika spektrofotometrycznego i odczytać przy długości fali 570nm a następnie przy długości fali 600nm;
 6. Następnie przeprowadzić analizę uzyskanych wyników według zamieszczonych poniżej wzorów;
- A) Na podstawie uzyskanych wyników podać procent redukcji odczynnika alamarBlue w próbach badanych – wyjaśnić uzyskany wynik

$$\text{Procent redukcji alamarBlue} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(R1 \times N2) - (R2 \times N1)} \times 100$$

O1 = 80586 [molowy współczynnik ekstynkcji (E) dla formy utlenionej alamarBlue przy 570nm]

O2 = 117216 [E dla formy utlenionej alamarBlue przy 600nm]

R1 = 155677 [E dla formy zredukowanej alamarBlue przy 570nm]

R2 = 14652 [E dla formy zredukowanej alamarBlue przy 600nm]

A1 = [absorbancja dla dołka badanego przy 570nm]

A2 = [absorbancja dla dołka badanego przy 600nm]

N1 = [absorbancja dla próby ślepej przy 570nm]

N2 = [absorbancja dla próby ślepej przy 600nm]

B) Na podstawie uzyskanych wyników podać procent redukcji odczynnika alamarBlue w próbach badanych względem próby kontrolnej – wyjaśnić uzyskany wynik

$$\text{Różnica redukcji alamarBlue pomiędzy grupą badaną i kontrolną (\%)} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

P1 = [absorbancja dla próby kontrolnej przy 570nm]

P2 = [absorbancja dla próby kontrolnej przy 600nm]

Co student powinien umieć

- poprawnie zaplanować przeprowadzenie badania i wskazać potrzebny sprzęt niezbędny do doświadczenia;
- określić precyzyjnie jaki parametr mierzy i jakie są ograniczenia związane z dany typem pomiaru;
- umieć rzetelnie i starannie prowadzić zapis prac laboratoryjnych;
- poprawnie analizować otrzymane wyniki;

