



F7DIBFM Biochemické a fyzikální metody v medicíně

Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

OSMOTICKÁ REZISTENCE ERYTROCYTŮ; BUNĚČNÁ VIABILITA, INDUKCE APOPTÓZY U BUNĚČNÉ KULTURY

Autor: Ing. Jana Štěpanovská

Použití krve při pokusu je spojeno s rizikem přenosu virových onemocnění krví: hepatitida A, AIDS, Creutzfeldt-Jakobova nemoc. Při manipulaci s krví je povinné používat rukavice a mechanické pipety. Zároveň je potřeba dodržovat zvláštní bezpečnostní opatření - pracovat obezřetně, používat pro hemolýzu krev dodanou vyučujícími pocházející z transfúzního centra / prasečí krev.

TEORETICKÝ ÚVOD

Osmotický tlak lze považovat za tlak, který je potřebný k tomu, aby zabránil difúzi vody bariérou pomocí osmózy. Jinými slovy, označuje to, jak tvrdě by voda „tlačila“, aby se dostala přes bariéru, aby mohla difundovat na druhou stranu.

Osmotický tlak je určen koncentrací rozpuštěné látky - voda se „bude více snažit“ difundovat do oblastí s vysokou koncentrací rozpuštěné látky, jako je sůl, než do oblastí s nízkou koncentrací. Ve skutečnosti samozřejmě osmotický tlak není „touhou“ vody po pohybu, ale spíše rozšířením přirozeného zákona, podle kterého se veškerá hmota náhodně rozloží v čase. Pokud jsou koncentrace látek ve dvou oblastech odlišné a oblasti se navzájem dotýkají, náhodný pohyb částic způsobí, že látky difundují, dokud nebude roztok v celé oblasti jednotný.

Osmóza je zvláštní difúze vody polopropustnou membránou. V případě osmózy se tedy rozpuštěné látky nemohou pohybovat, protože nemohou projít membránou. Voda se však může pohybovat a také se pohybuje - prochází membránou do oblasti s vyšší koncentrací rozpuštěné látky.

To může způsobit změnu celkového objemu vody na každé straně membrány: strana membrány s více rozpuštěnými látkami může skončit s mnohem větším množstvím vody. Změna bilance vody může vést k destrukci buněk - prasknutí (tzv. plazmoptýza) nebo dehydratace (tzv.

Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku,
CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské
inženýrství, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

plazmolýza). Intracelulární prostředí se svým složením liší od extracelulárního prostředí. Pokud se extracelulární prostředí změní, může dojít k poškození buněk.

Hemolýza představuje proces uvolňování hemoglobinu z červených krvinek, jde o speciální případ plazmolýzy. Červené krvinky (erytrocyty) jsou bezjaderné buňky, jejichž buněčná membrána za standardních podmínek hemoglobin nepropouští. Erytrocyty mají tvar bikonkávního disku. Díky tomuto tvaru mohou erytrocyty měnit svůj objem, aniž by došlo ke zvětšení jejich povrchu. Existují dva mechanismy vedoucí k hemolýze:

1. Osmotická hemolýza:

V hypotonickém roztoku zvětší erytrocyty svůj objem natolik, že dojde ke změně struktury membrány a uvolnění hemoglobinu. Tento jev osmotické hemolýzy umožňuje měřit křehkost červených krvinek. Křehkost erytrocytů fyziologicky závisí na jejich stáří. Bývá také zvýšená u některých typů nemocí.

2. Neosmotická hemolýza:

K neosmotické hemolýze dochází buď přímou destrukcí membrány erytrocytů, nebo vlivem defektů membrány (např. sférocytóza), či defektem samotného hemoglobinu (např.: srpkovitá anémie).

Přímá destrukce membrány vzniká následujícími způsoby:

- fyzickým poškozením: otřes, zmrazení, vysoké teploty, vystavení radiaci
- působením chemikálií: detergenty, fosfatáza; toxická hemolýza vlivem působení jedu či léků
- imunologickou poruchou: společným znakem těchto poruch je fixace protilátky na erytrocyty, která vede k jejich zničení
- enzymatickou poruchou: hemolytické anémie způsobené konstitučními enzymopatiemi (nedostatek G-6-P-DH)



Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

FYZIKÁLNÍ A FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝ ÚVOD

ABSORPCE

Absorpce světla je pohlcení a zeslabení záření v průběhu jeho šíření prostorem. Při absorpci světla záleží na složení roztoku, kterým světlo prochází. Pro absorpci platí Lambert-Beerův zákon

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

A ... absorpance, jednotka: -

I ... intenzita prošlého světla, jednotka: $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$

I_0 ... intenzita dopadajícího světla, jednotka: $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$

OSMOTICKÝ TLAK

Osmotický tlak (Pa) je úměrný celkové koncentraci všech rozpuštěných částic

$$\Pi = c \cdot R \cdot T \cdot i$$

R ... univerzální plynová konstanta, $R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$

T ... termodynamická teplota, jednotka: K

c ... koncentrace rozpuštěné látky, jednotka: $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$

i ... počet osmoticky aktivních částic, bezrozměrné

VLASTNOSTI HEMOGLOBINU

Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku,
CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské
inženýrství, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244

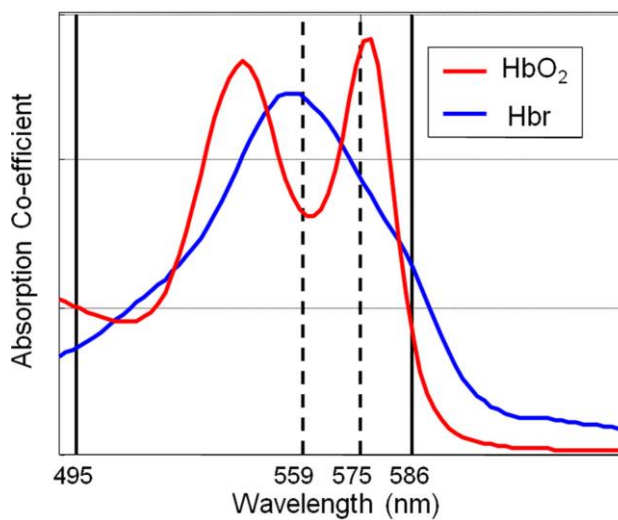


EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury



Obrázek 1: Závislost absorbance hemoglobinu (Hbr) a oxyhemoglobinu (HbO₂).

Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku,
CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské
inženýrství, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

PŘÍSTROJE

- spektrofotometr
- centrifuga
- osmometr
- analytické váhy

POMŮCKY

- parafilm
- rukavice
- papírové utěrky
- skleněné pipety
- mechanické pipety
- špičky k mechanickým pipetám
- mikrozkušavky (eppendorfký)
- stojan na mikrozkušavky
- zkumavky
- stojan na zkumavky
- kádinky (100 ml)
- lžičky na nabírání sypkých chemikálií
- míchátko
- popisovače
- nůžky
- buničina

CHEMIKÁLIE

- krev
- líh
- destilovaná voda
- NaCl



OSMOTICKÁ REZISTENCE ERYTROCYTŮ

STANDARDNÍ KŘIVKA

Standardní křivka slouží k převodu hodnot absorpce získaných pomocí spektrofotometru na % hemolýzy. Tímto měřením zjistíme, ke kolika procentní hemolýze došlo. Standardní křivku získáme změřením absorpce roztoků hemoglobinu, jejichž koncentrace odpovídá známým úrovním hemolýzy pro zkoumanou krev. Abychom tohoto dosáhli, budeme provádět postupné ředění supernatantu 100% hemolyzovaného roztoku. Standardní křivku sestavíme po změření absorpce známých zředění roztoku hemolyzované krve.

Pozor: Veškeré práce provádíme s maximální přesností a velkou opatrností!!!

POSTUP

1. Připravíme roztok 100% hemolyzované krve. V kádince rozmícháme 0,25 ml krve ve 25 ml destilované vody. Roztok opatrně promícháme a označíme kádinku.
2. Připravíme roztok 0% hemolyzované krve. V kádince rozmícháme 0,25 ml krve s 25 ml 0,14M roztokem NaCl. Roztok opatrně promícháme a označíme kádinku.
3. Oba roztoky necháme 30 minut odstát.
4. Do 10 mikrokumavek napipetujeme po 1 ml nehemolyzované krve. Jednotlivé mikrokumavky označíme.
5. Do 10 mikrokumavek napipetujeme po 1 ml hemolyzované krve. Jednotlivé mikrokumavky označíme.
6. Všech 20 mikrokumavek umístíme do centrifugy. Postup a parametry centrifugace viz *Postup při centrifugaci*.
7. Pomocí mechanické pipety přeneseme supernatanty hemolyzované krve do zkumavky. To samé provedeme i s nehemolyzovanou krví.
Pozor: Při přenášení supernatantu musíme dát pozor, aby nedošlo k porušení peletu!!!
8. Kombinací roztoků hemolyzované a nehemolyzované krve připravíme roztoky o objemu 1 ml, ve kterých je koncentrace hemolyzované krve od 0% až po 100% hemolyzovanou krev. Požadované objemy zaznamenejte do tabulky. Roztoky připravíme do popsaných mikrokumavek, kde je opatrně promícháme.
9. Roztoky přeneseme do předem prověřených kyvet (viz *Kontrola použitých kyvet*).

Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

10. Provedeme měření ve spektrofotometru (viz *Postup při práci se spektrofotometrem*). Jako referenci ve spektrofotometru použijte roztok s 0% hemolýzou krve. Tuto referenci použijte i v úloze 4.2.
11. Měření zaznamenejte do tabulky a vynesete standardní křivku, kterou využijete pro další úlohu.

POKUS S OSMOTICKOU ODOLNOSTÍ ERYTROCYTŮ

Cílem pokusu je zjistit % hemolýzy zkoumaných červených krvinek v solných roztocích s klesající koncentrací a změřit rozdílnou osmolaritu roztoků. Tento test představuje standardní postup pro určení hemolytických anémií. Touto metodou získáme přehled o chování populace erytrocytů v hypotonických roztocích a zjistíme, do jaké míry jsou schopny odolávat hypotonii.

1. Ze základního 0,2M roztoku NaCl připravíme po 10 ml roztoků o molárních koncentracích: 0,14; 0,12; 0,10; 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05. Tyto koncentrace se nachází okolo očekávaného bodu hemolýzy. Vytvořte tabulku, kde zaznamenáte použité objemy 0,2M roztoku NaCl a vody.
2. Roztoky připravte do 8 skleněných zkumavek, které budou označeny danými koncentracemi.
3. Zkumavky uzavřete parafilmem a několikrát obraťte, aby došlo k promíchání roztoků.
4. Pomocí mechanické pipety přidejte do každé zkumavky přesně 0,1 ml krve.
5. Zkumavky opět překryjte parafilmem a znovu opatrně promíchejte.

Pozor: Míchejte opatrně, aby nedošlo k mechanické hemolýze!!!

6. Jednotlivé roztoky nechejte 30 minut odstát.
7. Připravte si 16 označených mikrozkušavek. Před pipetováním zkumavku ještě jednou opatrně obraťte, aby se roztok znovu promíchal. Do mikrozkušavek napipetujte 1 ml odpovídajícího roztoku, ke každé koncentraci 2 mikrozkušavky.
8. Mikrozkušavky umístěte do centrifugy. Využijte postup viz *Postup při centrifugaci*.
9. Proved'te měření ve spektrofotometru. Použijte *Postup při práci se spektrometrem*.
10. Změřte osmolaritu roztoků, využijte *Postup při práci s osmometrem*.
11. Výsledky měření zpracujte do přehledné tabulky.
12. Proved'te analýzu dle bodu 8 a uveďte ji do protokolu.



Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

POSTUP PŘI CENTRIFUGACI

1. Zapneme centrifugu a umístíme do ní označené mikroskopické mikrozkušavky. Mikroskopické mikrozkušavky umístíme do centrifugy vždy proti sobě, aby byla centrifuga vyvážená.
2. Centrifugu zavřeme a nastavíme program:
 - a. otáčky (RPM): 2000
 - b. čas: 8 minut
3. Zapneme námi navolený program.
4. Po skončení programu centrifugu otevřeme a vyndáme z ní mikroskopické mikrozkušavky

Pozor: Nezastavujte centrifugu rukama!

POSTUP PŘI PRÁCI SE SPEKTROMETREM

KONTROLA POUŽITÝCH KYVET

Pozor: Povrch kyvet musí být vždy udržován v naprosté čistotě! Otřete jej měkkým hadříkem a dbejte na to, abyste povrch nepoškrábali pipetami (plastová jehla!). Ověřte, zda všechny kyvety uvádějí stejné hodnoty absorpce pro kontrolní roztok.

1. Vyberte vhodné kyvety.
2. Pomocí mechanické pipety do všech kyvet napipetujeme 1 ml 0,2M roztoku NaCl.
3. Spustíme spektrometr: Applications(stiskněte 1) → single Wavelength (stiskněte 1).
4. Zvolte požadovanou vlnovou délku a potvrďte zeleným tlačítkem.
5. Vložte první vzorek a naměřte jej jako referenci (stisknutím modrého tlačítka OA/100%T). Hodnoty absorpce jednotlivých vzorků by se neměly lišit. Pokud bude v některé z nich výrazná odchylka, je potřeba kyvetu vyměnit.

NAMĚŘENÍ SPEKTRA

1. Do kyvet přeneste přibližně 1ml supernatantu 0% hemolyzované krve a 100% hemolyzované krve.

Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

2. Vložte kyvetu s nehemolyzovanou krví do spektrofotometru.
3. Zvolte Wavescan (stiskněte 3), nastavte rozmezí 400 až 700 nm a potvrďte zeleným tlačítkem
4. Stiskněte modré tlačítko OA/100% pro načtení reference.
5. Vyměňte vzorky a stiskněte zelené tlačítko.
6. Odečtěte z grafu vhodnou vlnovou délku pro měření absorpance vzorků.

MĚŘENÍ ABSORBANCE

1. Pomocí mechanické pipety do kyvet napipetujeme 1 ml supernatantu jednotlivých vzorků z mikrozkmavek (po centrifugaci). Jako kontrolní vzorek (referenci) použijeme supernatant z úlohy 4.1 0% hemolýzy,.

Pozor: Při pipetování dávejte pozor, aby nedošlo k porušení peletů.

2. Kyvetu umístíme do spektrofotometru a spustíme jej: Applications → Single Wavelength
3. Zvolte vhodnou vlnovou délku
4. První vzorek (nehemolyzovanou krev) naměřte jako referenci stisknutím modrého tlačítka OA/100% T.
5. Postupně proměřte ostatní vzorky. Po umístění kyvety do spektrofotometru vždy stiskněte zelené tlačítko.

Pozor: Pro vzorky s absorpací přesahující 2,0 zřeďte 1:1 s vodou, příp. jiným poměrem. (A nezapomeňte potom výsledné hodnoty přepočíst na původní ředění – resp. předpokládanou absorpci, tj. např. násobit dvěma).

Pozor: Průběžně kontrolujte, zda kontrolní kyveta stále ukazuje nulovou absorpaci.



Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

POSTUP PŘI PRÁCI S OSMOMETREM

1. Zapněte osmometr a vyčkejte přibližně 6 minut, dokud se neobjeví značka “---“.
2. Naneste mechanickou pipetou malé množství měřeného vzorku do mikrozkušavky.

Pozor: Vzorek vypouštějte rovnoměrně a nanášejte opatrně po stěně mikrozkušavky, aby nevznikala žádná bublina.

3. Vysuňte opatrně hlavici a otočte ji směrem k sobě.
4. Opatrně nasadte mikrozkušavku na skleněnou elektrodu.
5. Vraťte opatrně hlavici zpět do měřicí komory a zahajte měření.
6. Stikněte tlačítko START/STOP
7. Zaznamenejte hodnotu a ihned po měření vysuňte hlavici a pomocí západky sundejte mikrozkušavku a čidlo opatrně očistěte buničinou. Vložte na hlavici prázdnou zkušavku a vraťte do měřicí komory.

URČENÍ OSMOTICKÉ ODOLNOSTI ERYTROCYTŮ ZKOUMANÉ KRVE

1. Sestrojte standardní křivku, tj. graf závislosti % hemolýzy na koncentraci roztoku NaCl.
2. Stanovte % hemolýzy roztoků z úlohy 4.2 na základě měření absorbance.
3. Určete koncentrace NaCl odpovídající 15%, 50%, 85% a 100% hemolýzy.
4. Porovnejte naměřené hodnoty osmolarity s teoretickou (vypočtenou) hodnotou.
5. Co by z hlediska dynamiky populace erytrocytů znamenala asymetrie křivky závislosti % hemolýzy na koncentraci roztoku NaCl, nebo posunutí jejího maxima?
6. Sestrojte graf % hemolýzy v závislosti na osmolaritě.



Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

PŘÍSTROJE

- Centrifuga
- Pipety
- Inverzní světelný mikroskop s fázovým kontrastem a kamerou
- Laboratorní inkubátor/temperovaná vodní lázeň

POMŮCKY

- rukavice
- mikrozkušavky (eppendorfký)
- Petriho misky

CHEMIKÁLIE

- Buněčná suspenze ve falkonce
- Kultivační lahev s narostlou buněčnou kulturou (75 cm²)
- destilovaná voda
- NaCl
- PBS
- Ethanol (50%)

POSTUP

ŘÍZENÝ ROZPAD BUNĚK

Cílem pokusu je sledovat vliv různé osmolarity roztoků na viabilitu buněk. Připravte koncentrační řadu roztoků NaCl o molaritách: 20, 140, 280, 400 a 550 mmol/l, od každého roztoku 0,5 ml.

Připravenou buněčnou suspenzi ve falkonce umístěte do centrifugi a buňky stočte při nastavení: 300G, 5 min. Po vyjmutí z centrifugy vylijte supernatant a buněčnou peletu rozmíchejte v 1 ml PBS. Tuto suspenzi udržujte v laboratorním inkubátoru nebo vodní lázni při teplotě 37°C.

Odeberte 50 µl buněčné suspenze v PBS a přidejte je do Petriho misky, ve které se již nachází první roztok NaCl. Petriho misku uzavřete a umístěte na mikroskop s fázovým kontrastem. Po ustálení obrazu nastavte zorné pole na určitou skupinu buněk a zapněte sledování na kameře, aby byl pořizován obrazový záznam každou minutu. Buňky snímejte alespoň po dobu 10 – 15 min.

Návod na cvičení 1: Osmotická rezistence erytrocytů; buněčná viabilita, indukce apoptózy u buněčné kultury

Postup opakujte pro všechny roztoky.

Dle obrazových záznamů stanovte okamžik plazmoptýzy/plazmolýzy. Vykreslete křivku závislosti rozpadu buněk na času a koncentraci roztoku.

INDUKCE APOPTÓZY U BUNĚČNÉ KULTURY

Při tomto pokusu dojde k řízené buněčné smrti vyvolané rozdílným osmotickým tlakem.

Lahev umístěte na mikroskop a nastavte zorné poli na určitou skupinu buněk, lahvi potom již nehýbejte. Zapněte kameru s obrazovým záznamem. Opatrně odeberte kultivační médium a přidejte do lahve 5 ml PBS. Odeberte PBS a do lahve přidejte 3 ml 50 % ethanolu.

Sledujte chování buněk. Stanovte počátek buněčné apoptózy, která se projeví tvořením suspenzního roztoku buněk v ethanolu, neboť buňky nebudou již schopné adherovat k povrchu lahve. Nakonec buňky ztratí celistvost buněčné membrány a rozpadnou se na fragmenty.

KONTROLNÍ OTÁZKY:

- Definujte jednoznačně osmózu a její jednotky.
- Definujte jednoznačně osmotický tlak a jeho jednotky biologické hodnoty.
- Vysvětlete příčinu osmotického tlaku.
- Vysvětlete biologickou důležitost osmotického tlaku.
- Dokažte, že tzv. van't Hoffův zákon není ničím jiným než aproximací zjednodušené pro zředěné roztoky.
- Jakou vlnovou délku zvolit pro fotometrická měření roztoků hemoglobinu? Navrhněte jak tuto vlnovou délku nalézt experimentálně.