

ĆWICZENIE 3: Cytotoksyczność biomateriału

Wprowadzenie

1. Hodowle komórkowe – podstawowe pojęcia

Pojęcie hodowli komórkowych określa proces hodowli komórek wyizolowanych z organizmów roślinnych i zwierzęcych w odpowiednio dobranym środowisku, umożliwiającym ich przeżycie oraz namnażanie się. Najczęściej komórki izolowane są z tkanek organizmu metodami enzymatycznymi lub mechanicznymi. Niektóre typy komórek (np. progenitorowe) mogą być izolowane bezpośrednio z krwi z zastosowaniem techniki wirowania w gradiencie gęstości.

Wyróżnia się dwa główne typy kultur komórkowych:

- **hodowla pierwotne** – hodowla komórek pobranych bezpośrednio z organizmu dawcy, namnażanych w warunkach *in vitro* aż do momentu osiągnięcia stanu **pełnej konfluencji** (stan, w którym namnożone komórki zajmują całą powierzchnię wzrostu dostępną w danym naczyniu hodowlanym); po osiągnięciu ok. 80% konfluencji komórki są **pasażowane** (przenoszone do nowego naczynia hodowlanego zawierającego świeże medium hodowlane)
- **linie komórkowe** – po kilku pasażach hodowla pierwotna staje się linią komórkową, wyróżnia się linie:
 - **normalne** – komórki zdolne do określonej liczby podziałów, można je utrzymać przy życiu przez kilka miesięcy, a czasem lat, lecz po określonej liczbie pasażów komórki starzeją się i obumierają; liczba podziałów zależy od rodzaju narządu, z którego wywodzi się linia komórkowa, typu hodowanych komórek oraz wieku organizmu z którego pobierano tkankę do zakładania linii komórkowej
 - **nieśmiertelne (ciągłe)** linie komórkowe – komórki charakteryzujące się nieokreślonym czasem życia, najczęściej poliploidalne i pochodzenia nowotworowego, co zapewnia im możliwość nieokreślonej liczby podziałów; ciągłą linię komórkową można także uzyskać z komórek prawidłowych w wyniku ich transformacji, czyli zmiany materiału genetycznego, proces transformacji może zachodzić spontanicznie lub być celowo indukowany (chemicznie lub przy użyciu wirusów)

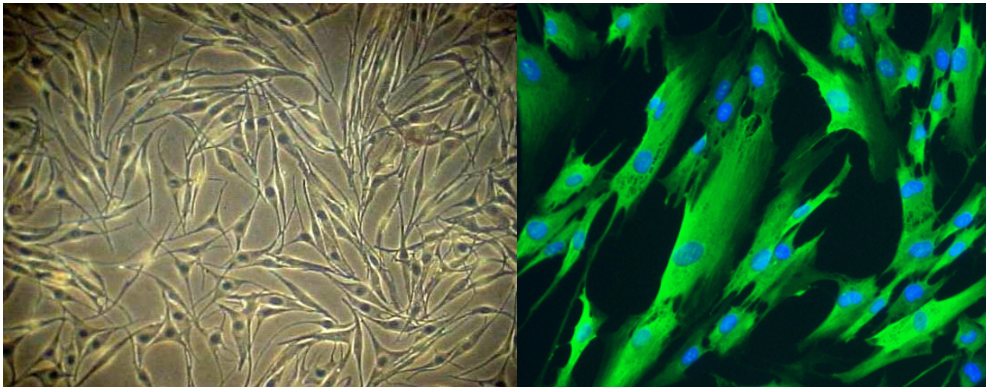
W zależności od typu hodowanych komórek wyróżnia się:

- **komórki adherentne** – komórki wykazujące zdolność do adhezji do podłoża, rosną w formie **monowarstwy** pokrywającej powierzchnię wzrostu w naczyniu hodowlanym,
- **komórki nieadherentne** – nieprzylegające do podłoża, rosnące w zawieszynie

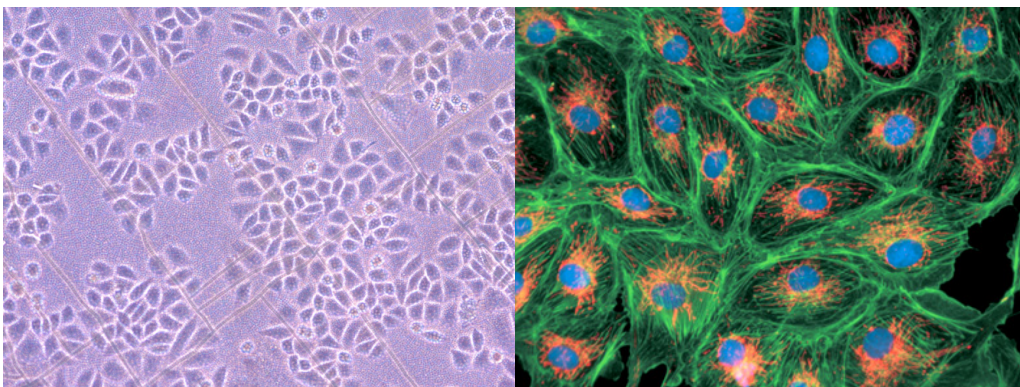
2. Morfologia komórek

Komórki hodowane w warunkach *in vitro* wykazują trzy podstawowe typy morfotyczne:

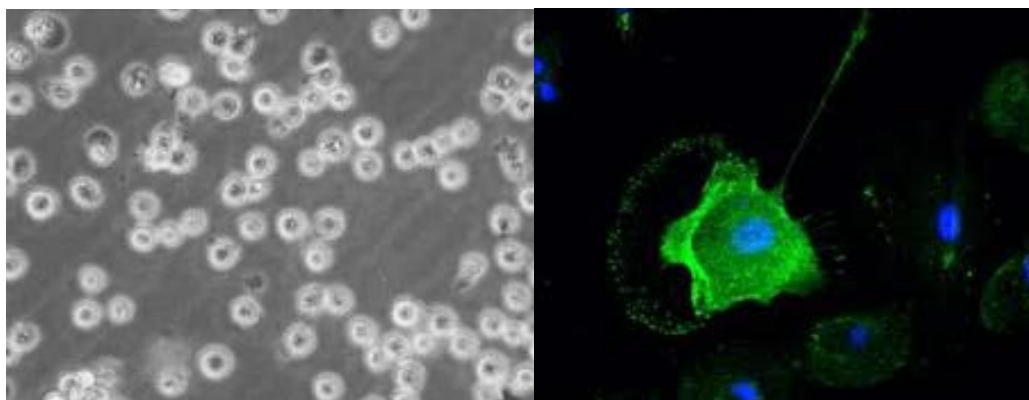
- typ **fibroblastopodobny** – komórki adherentne, o wydłużonym kształcie



- typ **nabłonkowy** – komórki adherentne, o strukturze kostki brukowej



- typ **limfoblastopodobny** – komórki nieadherentne, sferyczne



1. Testy cytotoksyczności *in vitro*

Obowiązujące prawo wymaga, aby wszystkie nowe związki o charakterze potencjalnych leków, podlegały szeroko zakrojonym badaniom w celu oceny aktywności cytotoksycznej, przed skierowaniem ich do badań klinicznych. Badania cytotoksyczności cząsteczek potencjalnych leków są więc niezbędne do określenia ich prawidłowego działania oraz bezpieczeństwa leku. Badania te pozwalają na ustalenie zakresu dawek i uzyskanie danych na temat mechanizmu działania leku. Hodowle komórkowe stanowią doskonałą alternatywę dla badań na zwierzętach. Zastosowanie badań na liniach komórkowych pozwala na szybkie i łatwe zbadanie procesów komórkowych przy użyciu małych ilości badanej substancji, dużą zaletą jest powtarzalność. Bardzo ważny jest wybór odpowiedniej linii komórkowej, dlatego dla właściwej oceny należy użyć jak najwięcej linii komórkowych o zróżnicowanej wrażliwości.

Zakres badań wyrobów medycznych ściśle określają odpowiednie akty prawne. Norma obowiązująca w Polsce przewiduje 3 testy dla oceny działania toksycznego wyrobów medycznych, w zależności od rodzaju materiału, z którego jest wykonany i przeznaczenia a także określa m.in. warunki przygotowania i hodowli do poszczególnych testów, rekomendowane linie komórkowe, warunki przygotowania próby badanej i kontroli, kryteria uzyskanych efektów. Opisane procedury pozwalają na jakościową i ilościową ocenę toksyczności wyrobu medycznego.

Miarą cytotoksyczności, IC_{50} , jest stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek w próbce

kontrolnej. Do oceny cytotoksyczności badanego związku stosuje się także wartości:

-IC₁₀ – stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 10%

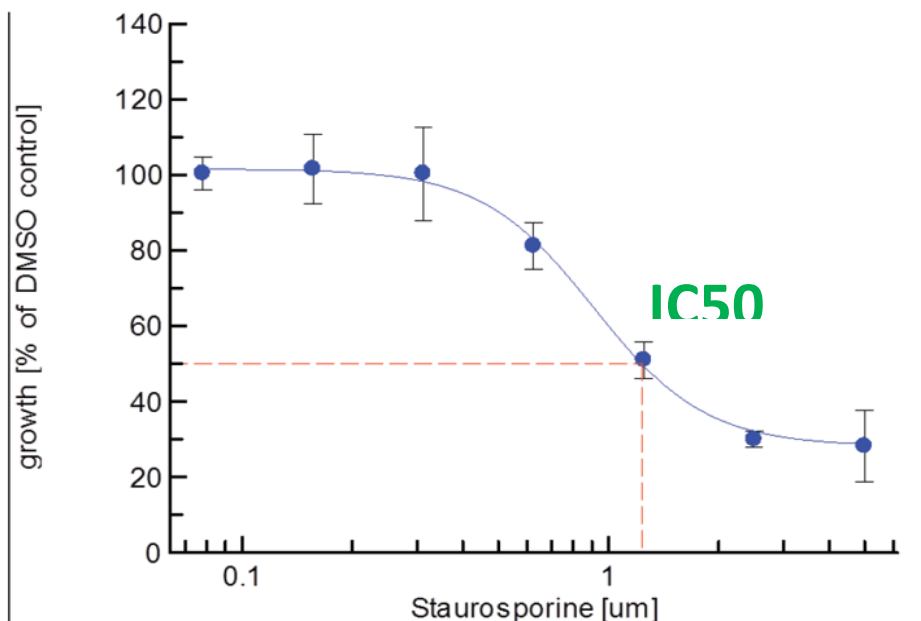
w stosunku do komórek kontrolnych, tzw. pierwsza dawka toksyczna;

-IC₉₀ – stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 90%

w stosunku do komórek kontrolnych, tzw. dawka letalna.

Standardowy przebieg krzywej odpowiedzi na dawkę, z której można wyznaczyć parametr IC₅₀:

Krzywa odpowiedzi na dawkę (ang. *dose-response curve*)



Standardowo proces oceny cytotoksyczności danego związku polega na kontakcie związku przez określony czas i w określonych warunkach z wybranym typem komórek. Następnie czynnik analizowany jest usuwany i przeprowadzane są testy cytotoksyczności (bezpośrednio po usunięciu czynnika badanego lub po uprzedniej kilkudniowej hodowli komórek)

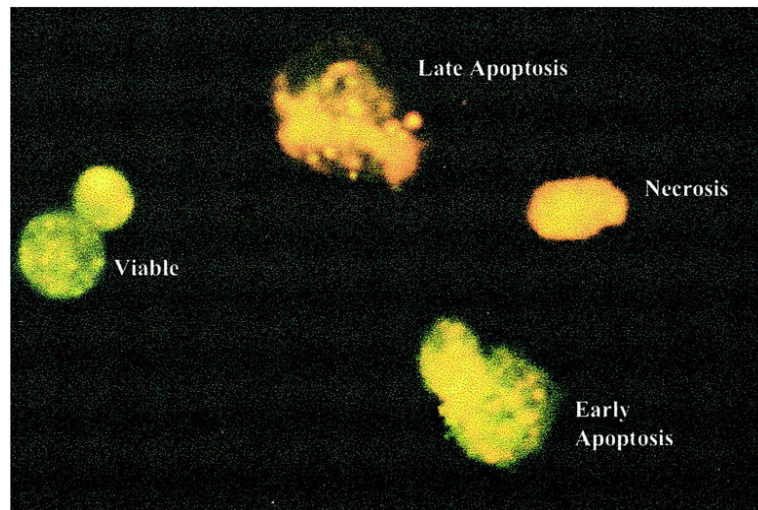
Najczęściej analizowanymi parametrami podczas wykonywania testów cytotoksyczności są:

- ✓ Żywotność komórek
- ✓ Aktywność metaboliczną
- ✓ Szybkość proliferacji

A. Ocena żywotności komórek

Najprostszym i najczęściej stosowaną metodą oceny żywotności komórek jest barwienie barwnikami różnicującymi komórki martwe i żywe. Do testów tych należą:

- i) Barwienie błękitem trypanu
- ii) Barwienie estrem kalceiny/jodkiem propidyny
- iii) Barwienie czerwienią neutralną
- iv) Barwienie oranżem akrydyny/bromkiem etydyny (rys.1)



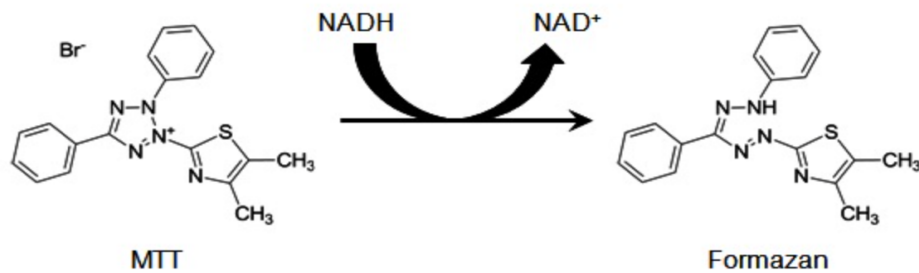
Rysunek 1: Komórki wybarwione parą barwników oranż akrydyny/bromek etydyny

B. Ocena aktywności metabolicznej komórek

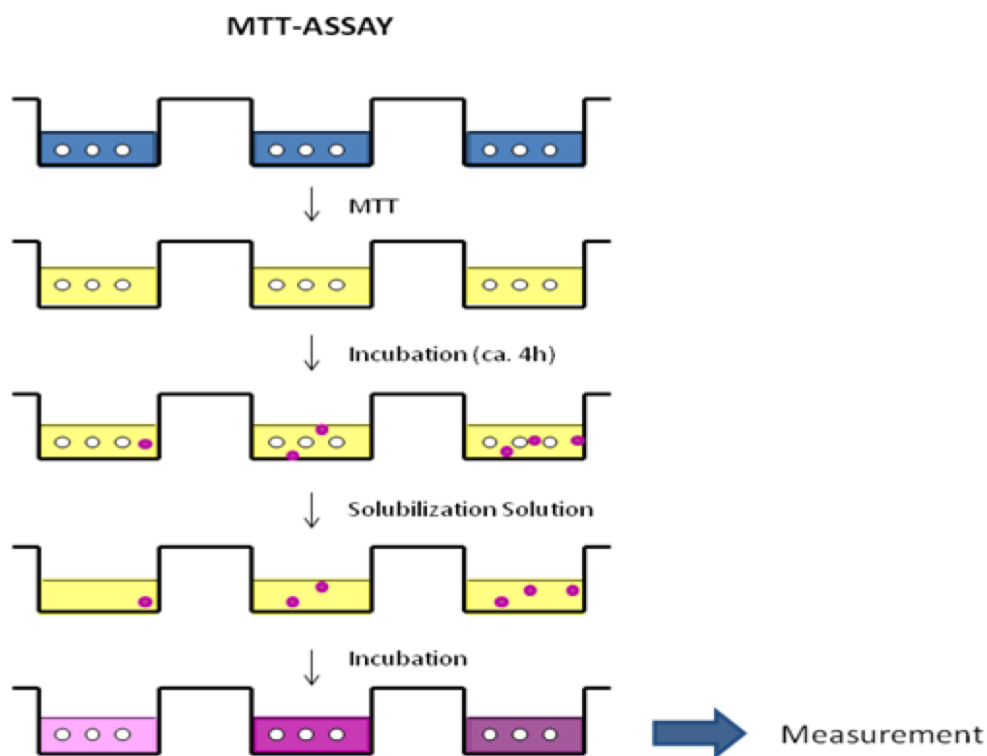
Do najpopularniejszych testów cytotoksyczności oceniających aktywność metaboliczną komórek zaliczamy testy wykorzystujące konwersję soli tetrazolowych oraz testy wykorzystujące redukcję resazuryny.

- i) Testy oparte o wykorzystanie soli tetrazolowych
- ✓ testy mierzące **aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej** (testy MTT/MTS/XTT), oparte są na zdolności enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania, rozpuszczalnej w wodzie soli

tetrazolowej (MTT, MTS lub XTT) do kolorowego produktu – formazanu (rys.2); w przypadku testu MTT produkt jest nierozpuszczalny w wodzie i wymaga rozpuszczenia w rozpuszczalnikach organicznych, testy MTS i XTT są natomiast wygodniejszą wersją testu, w której produkt reakcji jest w pełni rozpuszczalny w wodzie



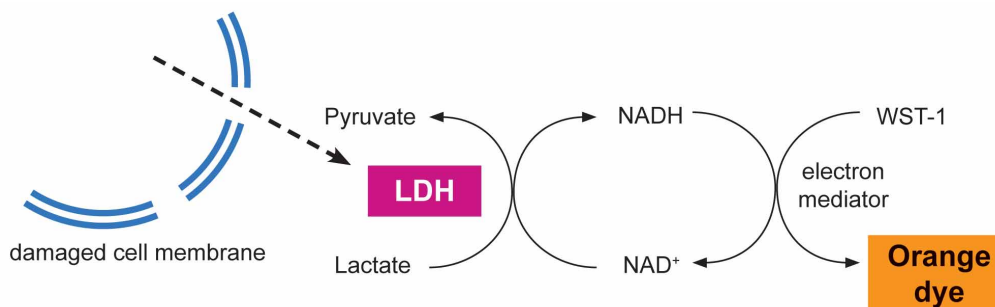
Rysunek 2: Konwersja soli MTT do formazanu pod wpływem NADH.



Rysunek 3: Standardowy przebieg testu MTT.

- ✓ testy mierzące **aktywności dehydrogenazy mleczanowej** (test LDH) podobnie do testów MTT oraz MTS jest testem kolorymetrycznym, oparty na pomiarze ilości dehydrogenazy mleczanowej (ang. *lactate dehydrogenase*, LDH), wewnątrzkomórkowego enzymu cytoplazmatycznego, uwalnianego z komórki

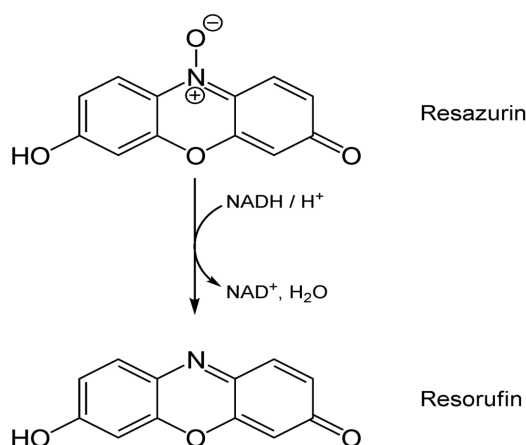
do medium hodowlanego na skutek jej lizy. Badanie polega na określeniu ilości LDH uwolnionej z martwych komórek poprzez pomiar reakcji enzymatycznej konwersji soli tetrazolowej do barwnego formazanu w nadsączach z nad komórek inkubowanych z badanym czynnikiem (rys.4).



Rysunek 4: Zasada działania testu LDH.

ii) Testy oparte o wykorzystanie resazuryny

Kolejną grupę testów mierzących aktywność metaboliczną komórek są testy oparte o wykorzystanie konwersji resazuryny do resorufiny (rys.5). Resazuryna, ma niebieską barwę oraz posiada zdolność przenikania do komórek. Żywe komórki mają zdolność przekształcania resazuryny w rezorufinę, która jest ma czerwoną barwę i wykazuje zdolności fluorescencyjne. Nazwy handlowe testów opartych na resazurynie to m.in. AlamarBlue® oraz PrestoBlue®.



Rysunek 5: Konwersja resazuryny do resorufiny.

C. Ocena szybkości proliferacji komórek

Innym sposobem analizy żywotności jest analiza szybkości proliferacji komórek w oparciu o **szybkość syntezy DNA**. Przykładem takiego testu może być test BrdU - (ang. *bromodeoxyuridine*, BrdU). Bromodeoksyurydyna jest

syntetycznym analogiem nukleozydu tymidyny inkorporowanym do DNA w dzielącej się komórce. Detekcja BrdU za pomocą specyficznego przeciwciała sprzężonego z enzymem oraz reakcja enzymatyczna powyższego enzymu z barwnym substratem pozwala na kolorymetryczną analizę zdolności proliferacyjnych komórek.

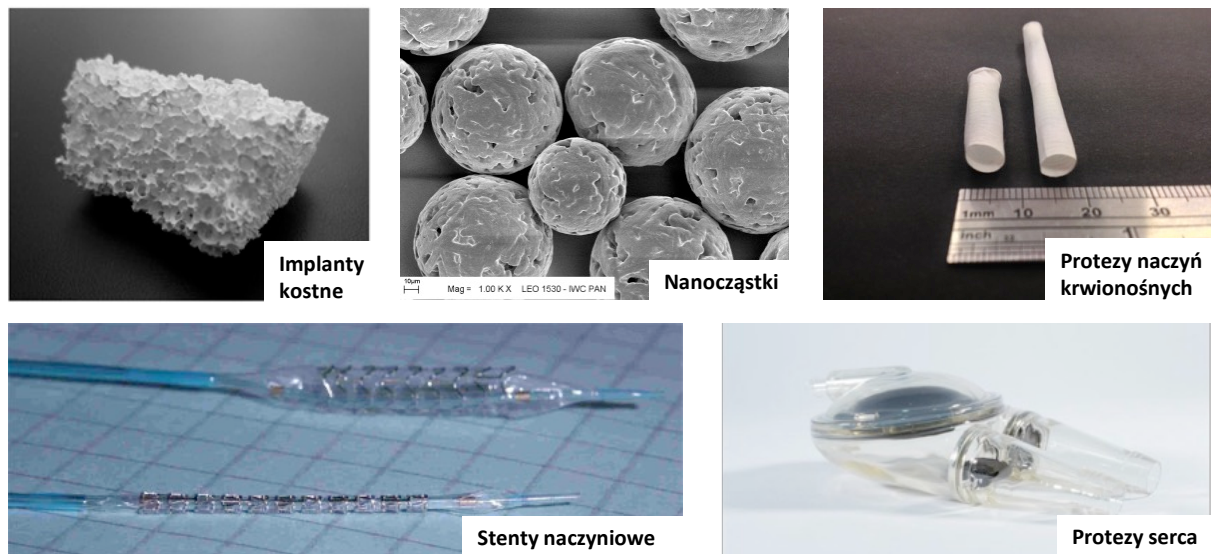
2. Ocena cytotoksyczności biomateriału

Mianem biomateriału określa się materiał pochodzenia sztucznego lub naturalnego, przeznaczony do stosowania w systemach biologicznych w celu leczenia, diagnozowania, wspomagania lub zastąpienia (częściowego lub całkowitego) chorej tkanki lub narządu (na podstawie M. Nałęcz „Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna”).

Biomateriały obejmują szeroką grupę materiałów, w zależności od materiału użytego do ich wytworzenia wyróżnia się:

- ✓ Biomateriały metaliczne – głównie wykonane z tytanu oraz jego stopów, stosowane w ortopedii (endoprotezy, kłamry do zespalające złamane kości) oraz kardiochirurgii (stenty naczyniowe, elementy sztucznych zastawek serca), materiały metaliczne charakteryzują się bardzo korzystnymi właściwościami mechanicznymi (wysoka odporność na korozję zmęczeniową, pękanie, wytrzymałość na rozciąganie i zginanie)
- ✓ Biomateriały ceramiczne – oparte głównie o fosforany wapnia, szeroko stosowane do wypełniania ubytków kostnych i zębowych, charakteryzują się wysoką biozgodnością i zdolnością do biodegradacji, co umożliwia stopniową odbudowę ubytku przez rozwijającą się tkankę
- ✓ Biomateriały polimerowe – najliczniejsza i najbardziej zróżnicowana grupa materiałów, stosowane, jako protezy (protezy serca, protezy naczyń krwionośnych), systemy terapeutyczne (nośniki leków, opatrunki), elementy wspomagające w chirurgii (niti i kleje chirurgiczne), obecnie biomateriały polimerowe, co raz częściej wykorzystywane są w inżynierii tkankowej, jako rusztowania wspomagające rozwój komórek i tkanek

Laboratorium Inżynierii Biomedycznej Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej zajmuje się otrzymywaniem szeregu materiałów wykorzystywanych w medycynie oraz analizą ich właściwości, również w modelach *in vitro*, z wykorzystaniem hodowli komórkowej. Poniżej zaprezentowano zdjęcia wybranych materiałów wytwarzanych w Laboratorium (rys.7).



Rysunek 6: Przykładowe biomateriały otrzymywane lub modyfikowane w Laboratorium Inżynierii Biomedycznej WICHiP PW.

Biozgodność materiału medycznego jest oceniana *in vitro* poprzez kontakt materiału z komórkami. Szczegółowe zasady przeprowadzania testów określa norma ISO. Testy mogą być przeprowadzone:

- ✓ metodą bezpośrednią – bezpośredni kontakt analizowanego materiału z warstwą komórek,
- ✓ metodą pośrednią – z użyciem ekstraktów materiału uzyskanych poprzez inkubację materiału z medium hodowlanym, najczęściej w temperaturze 37°C przez okres 24 godzin

Po określonym czasie kontaktu (na ogół 24 godziny) analizowana jest żywotność komórek z zastosowaniem testów cytotoksyczności określających wpływ czynnika toksycznego na żywotność komórek. Testy te wykorzystują aktywność enzymatyczną enzymów znajdujących się w żywych komórkach, które katalizują przemiany metaboliczne określonych związków dodawanych do medium, powodując zmianę w absorbancji roztworu.

ĆWICZENIE 3

3.1. Test cytotoksyczności

3.2. Barwienie materiału do analizy konfokalnej

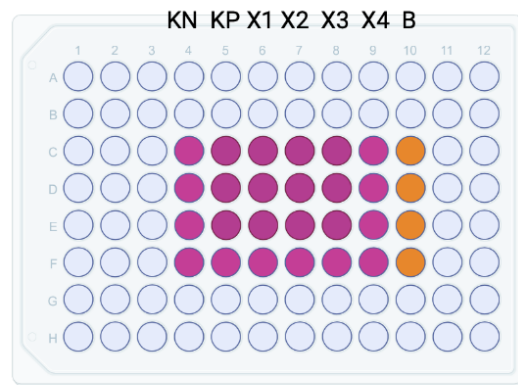
3.1. Test cytotoksyczności

Odczynniki:

- roztwór PrestoBlue (10x stężony)
- roztwór czynnika toksycznego
- roztwór czynnika badanego (Tween 20 w stęż. 1 ug/ml w medium hodowlanym)

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotować roztwory badanych substancji w 4 stężeniach: 1, 0.5, 0.1, 0.01 ug/ml w medium hodowlanym, każdy roztwór w objętości 1ml/osobę
2. Usunąć pożywkę z dołków płytki 96-dołkowej
3. Przepłukać komórki PBS
4. Do kolejnych kolumn dodać (100 ul/dołek): medium (KN), medium z dodatkiem czynnika toksycznego (KP) oraz roztwory czynnika badanego w kolejności wzrastających/malejących stężeń
5. Płytkę umieścić w inkubatorze na okres min. 1h (w miarę możliwości dłużej)
6. Usunąć roztwory, przepłukać komórki PBS
7. Do każdego dołka dodać po 90 ul medium hodowlanego oraz 10ul PrestoBlue, w ten sam sposób przygotować **dodatkową kolumnę** zawierającą medium+PrestoBlue bez komórek (blank) – łącznie 7 kolumn (patrz rysunek)
8. Płytkę inkubować w 37°C przez 1h (min. 15 minut)
9. Odczytać fluorescencję dla Ex/Em = 560/590 nm



Analiza wyniku

1. Obliczyć średnią dla blank oraz kontroli KN
2. Obliczyć żywotność dla każdego z n pomiarów zgodnie z formułą:
$$\text{żywotność } X_n [\%] = ((X_n - \text{AVR B}) / (\text{AVR KN} - \text{AVR B})) * 100\%$$

AVR B - średnia fluorescencja dla blank
AVR KN - średnia fluorescencja dla KN
X_n - wartość fluorescencji dla "n" pomiaru próbki X
3. Policzyc i przedstawić graficznie średnią żywotność KN, KP, X1, X2, X3, X4 wraz z odchyleniem standardowym SD
5. Wyznaczyć graficznie zależność żywotność-dawka oraz oszacować wartość IC50 (oś x w skali log, regresja liniowa)

3.2. Barwienie materiału do analizy konfokalnej

Materiały:

- Płytką 48-dołkowa z komórkami rosnącymi na powierzchni materiałów
- Roztwór paraformaldehydu
- Roztwór DAPI (opcjonalnie: Alexa)
- Roztwór Triton
- PBS
- klej utrwalający (opcjonalnie)

Wykonanie:

1. Materiały polimerowe wraz z rosnącymi na ich powierzchni komórkami wyjąć z inkubatora
2. Usunąć medium hodowlane, materiały delikatnie (!) przepłukać PBS (2x)
UWAGA: przy płukaniu postępować delikatnie, uważać, żeby materiały nie przekreśliły się na drugą stronę (komórki rosną na górnej powierzchni materiału)
3. Materiały zalać roztworem PFA (**UWAGA:** pracę z PFA wykonywać pod dygestorium – związek toksyczny!)
4. Płytkę owinąć parafilmem i inkubować w temperaturze pokojowej 15 minut
5. Płukanie PBS 3x5 min, RT, wytrząsarka
6. Permeabilizacja w 0,2% Triton X-100, 8 min, RT
7. Płukanie PBS 3x5min, wytrząsarka
8. Materiały zalać 100 ul roztworu DAPI, 6 minut, RT, **w ciemności**
9. Płukanie PBS 3x5min, RT, wytrząsarka, **w ciemności**
10. Opcjonalnie (jeśli barwienie aktywności): inkubacja z roztworem AlexaFluor Phalloidin, 20 minut, RT
11. Płukanie PBS 3x5min, RT, wytrząsarka, **w ciemności**
12. Na szkiełko nakrywkowe (cienkie) nałożyć kroplę kleju utrwalającego z DAPI (opcjonalnie), na kropki umieścić materiały stroną z komórkami do kropli, przykryć drugim szkiełkiem nakrywkowym, zabezpieczyć lakierem do paznokci. Zawinąć w folię, trzymać w ciemności.