

Andrzej Zaborowski, Magdalena Klink, Błażej Różga

CYTOMETRYCZNA METODA OZNACZANIA ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK LIMFOIDALNYCH W WARUNKACH STRESU TEMPERATUROWEGO

Żywotność świeżo izolowanych lub ogrzewanych limfocytów była oceniana klasyczną metodą mikroskopową z wykorzystaniem błękitu trypanu oraz za pomocą cytometru przepływowego po potraktowaniu komórek barwnikami fluorescencyjnymi. Cytometria przepływowa pozwala szybko i precyzyjnie określić żywotność komórek w zawiesinach.

WSTĘP

Pośród różnych metod określania liczby żywych komórek w zawiesinach, najczęściej spotykaną jest metoda wykorzystująca błękit trypanu. Jest ona prosta w wykonaniu, jednakże niezbyt dokładna, a stosowana w niej ocena liczby komórek za pomocą mikroskopu świetlnego, raczej subiektywna. Bardziej precyzyjna jest metoda spektrofotometryczna opisana przez Saijo [12], wymaga ona jednak użycia dużej liczby komórek.

Innymi metodami służącymi do odróżniania komórek żywych od martwych, są procedury wykorzystujące barwniki fluorescencyjne. Do najczęściej stosowanych barwników należą: bromek etydyny, jodek propydyny i oranż akrydyny. Użycie wymienionych barwników wymaga zastosowania mikroskopu fluorescencyjnego w celu określenia liczby fluoryzujących komórek. Barwienie barwnikami fluorescencyjnymi, mimo że dokładniejsze, to nie eliminuje jednak subiektywnej oceny liczby fluoryzujących komórek.

Do oceny liczby komórek fluoryzujących zamiast mikroskopu fluorescencyjnego wykorzystuje się cytometry przepływowe. Są to urządzenia, w których komórki niesione przez nośnik przechodzą pojedynczo przez układ sensorowy, w obrębie którego odbywa się pomiar widma i intensywności fluorescencji. Ze

względem na szybkość pomiaru (do 10 000 komórek/min) i dużą liczbę zliczeń, metoda ta pozwala na obiektywne określenie liczby komórek fluoryzujących. Ponadto jest bardziej czuła i pozwala na identyfikację małej liczby komórek martwych wśród dużej populacji komórek żywych.

W niniejszym artykule postanowiono porównać dwie metody określania żywotności komórek: metodę wykorzystującą błękit trypanu oraz metodę, w której do rozróżnienia komórek żywych i martwych użyto barwników fluorescencyjnych, a pomiaru fluorescencji dokonano za pomocą cytometru przepływowego.

MATERIAŁY I METODY

Komórki. Do badań używano limfocyty izolowane z węzłów chłonnych pachwinowych myszy. Wyizolowane węzły chłonne myszy po oczyszczeniu z tkanki tłuszczowej homogenizowano w podłożu Iscove's z 10% zinktywowanej (30 min 56°C) surowicy płodów cieląt (Fetal Calf Serum – FCS), używając homogenizatorów szklanych. Uzyskane komórki płukano takim samym podłożem i odwirowywano w ciągu 10 min przy 1200 obrotach/min. Komórki zawieszano w PBS, przygotowując zawiesiny komórek o gęstości 10^6 komórek w mililitrze.

Limfocyty, analizowane w próbkach kontrolnych, były bardzo jednorodne, wolne od zanieczyszczeń i rumoszu komórkowego. W badaniach używano limfocyty nie ogrzewane i komórki ogrzewane w łaźni wodnej o temperaturze 42°C.

Określanie żywotności komórek za pomocą błękitu trypanu. Wodny roztwór błękitu trypanu (1%) rozcieńczano 8-krotnie 0,85% NaCl i dodawano w stosunku 1:1 do zawiesin komórek. Po 2–3 min od momentu dodania błękitu trypanu, w mikroskopie świetlnym (400x) zliczano komórki martwe (wybarwiające się na niebiesko) oraz komórki żywe (wolne od barwnika) przypadające na 100 zliczonych komórek. Następnie wyliczano procentową zawartość komórek żywych w badanych zawiesinach komórkowych.

Barwienie barwnikami fluorescencyjnymi. W celu identyfikacji komórek żywych, wybarwiających się oranżem akrydyny na kolor zielony, stosowano trzy metody postępowania.

1. Barwienie oranżem akrydyny (OA) o stężeniu 0,2 mg/100 ml – próba P1.

Do 0,4 ml zawiesiny komórek dodawano 0,1 ml OA o stężeniu 1 mg/ml. Końcowe stężenie OA w próbce wynosiło 0,2 mg/100 ml. Oranż akrydyny wybarwia komórki żywe na kolor zielony.

2. Barwienie OA o stężeniu 0,1 mg/100 ml oraz bromkiem etydydy (BE) w stężeniu 0,1 mg/100 ml – próba P2.

Do 0,4 ml zawiesiny komórek dodawano 0,05 ml OA o stężeniu 1 mg/100 ml oraz 0,05 ml BE o stężeniu 1 mg/100 ml. Końcowe stężenie barwników wynosiło 0,1 mg/100 ml. Użycie bromku etydydy pozwoliło identyfikować komórki martwe. Barwnik wnikały do komórek martwych tłumi fluorescencję zieloną, pochodzącą od oranżu akrydydy.

3. Barwienie OA w stężeniu 0,2 mg/100 ml oraz BE o stężeniu 0,1 mg/100 ml – próba P3.

Do 0,35 ml zawiesiny komórek dodawano 0,1 ml OA o stężeniu 1 mg/100 ml oraz 0,05 ml BE o stężeniu 1 mg/100 ml. Końcowe stężenie barwników w próbce wynosiło odpowiednio: 0,2 mg/100 ml oraz 0,1 mg/100 ml.

Cytometria przepływowa. Próby o objętości 0,5 ml i gęstości ok. 10^6 komórek/ml były analizowane za pomocą cytometru przepływowego ARGUS firmy Skatron. Dane analizowano za pomocą komputera IBM wyposażonego w podstawowe oprogramowanie firmowe dla cytometru ARGUS.

Pomiar obejmował:

- a) rozpraszanie światła w zakresie małych kątów czołowych (*forward scatter*);
- b) rozpraszanie światła pod kątem 90° (*side scatter*);
- c) natężenie fluorescencji poszczególnych komórek przy użyciu bloku filtrowego FITC, $\lambda_{ex} = 470-490$ nm i $\lambda_{em} = 520-560$ nm.

Analiza danych przebiegała w układzie dwóch histogramów:

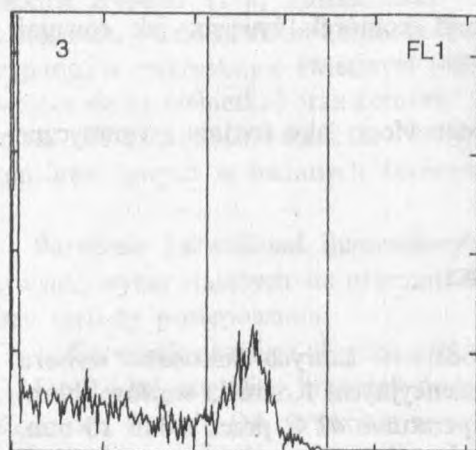
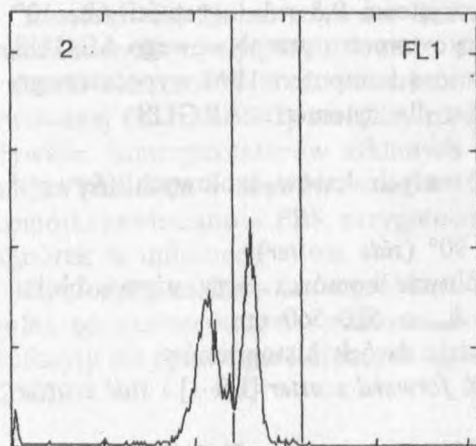
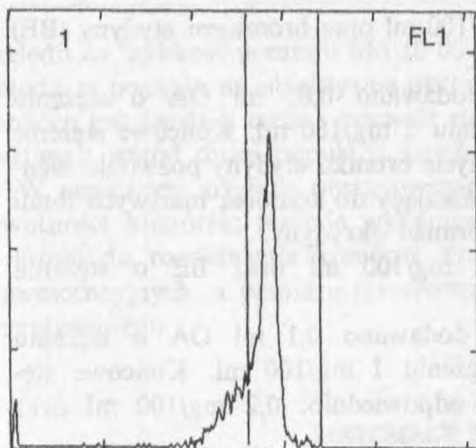
- histogram 1 przedstawiał zależność *forward scatter* [LS-1] i *side scatter* [LS-2];
- histogram 2 przedstawiał zależność *forward scatter* [LS-1] i natężenia fluorescencji [FL-1].

Z histogramów odczytywano procent komórek żywych, jak również poddawano analizie profile histogramów.

Obliczenia statystyczne. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne pomiarów $\pm$ odchylenie standardowe.

WYNIKI

Tabela 1 przedstawia wyniki, na podstawie których dokonano wyboru optymalnego stężenia barwników fluorescencyjnych. Komórki węzłów chłonnych ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 42°C przez 5 lub 10 min.



Liczbę komórek żywych w próbach kontrolnych (czas 0) i w próbach ogrzewanych oceniano dwiema metodami: za pomocą cytometru przepływowego po uprzednim zastosowaniu trzech różnych stężeń OA i BE oraz za pomocą mikroskopu świetlnego po wcześniejszym potraktowaniu komórek błękitem trypanu. Wyniki zamieszczone w tab. 1 jak również na odpowiadającym im histogramach (rys. 1) wskazują, że zastosowanie OA o stężeniu 0,1 mg/100 ml i BE o stężeniu 0,1 mg/100 ml zapewnia optymalny sposób barwienia komórek. W dalszych doświadczeniach stosowano ww. stężenie barwników.

W następnym etapie pracy w serii doświadczeń określano żywotność zawiesin komórkowych, stosując jednocześnie fluorescencyjną metodę cytometryczną i metodę mikroskopową z użyciem błękitu trypanu. Komórki węzłów chłonnych ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 42°C przez 5 min.

Procent komórek żywych w nie ogrzewanych (kontrolnych) lub ogrzewanych zawiesinach komórkowych oceniano bezpośrednio po potraktowaniu komórek barwnikami.

Rys. 1. Histogramy przedstawiają trzy metody barwienia komórek barwnikami fluorescencyjnymi: (1) – barwienie OA o stężeniu 0,2 mg/100 ml-P1; (2) – barwienie OA o stężeniu 0,1 mg/100 ml i BE o stężeniu 0,1 mg/100 ml-P2; (3) – barwienie OA o stężeniu 0,2 mg/100 ml i BE o stężeniu 0,1 mg/100 ml-P3

Tabela 1

Wybór optymalnego stężenia barwników fluorescencyjnych

Lp	Komórki żywe (%)			
	błękit trypanu	barwniki fluorescencyjne		
		próba P1	próba P2	próba P3
1	70	76	61	62
2	45	70	48	45
3	44	72 ^a	46 ^a	30 ^a

^a – Histogramy pomiarów załączono w pracy.

Objaśnienia: P1 – OA o stężeniu 0,2 mg/100 ml; P2 – OA o stężeniu 0,1 mg/100 ml oraz BE o stężeniu 0,1 mg/100 ml; P3 – OA o stężeniu 0,2 mg/100 ml oraz BE o stężeniu 0,1 mg/100 ml.

Żywotność każdej zawiesiny komórkowej oceniano 3-krotnie. Dane zamieszczono w tab. 2.

Wyniki zebrane w tab. 2 potwierdzają dobrą powtarzalność pomiarów dokonywanych przy użyciu obu stosowanych w pracy metod. Różnica w procentach komórek żywych w badanych zawiesinach komórkowych, wyznaczanych metodą cytometryczną, zawiera się w granicy 5–10%, a wyznaczanych metodą mikroskopową z użyciem błękitu trypanu wynosi 8%. Ogrzewanie komórek w temperaturze 42°C powodowało wyraźny wzrost procentu komórek martwych. Procenty komórek żywych w badanych zawiesinach, wyznaczanych porównywanymi metodami, są zbliżone.

Tabela 2

Procentowa zawartość komórek żywych
w zawiesinach komórkowych ogrzewanych w temperaturze 42°C

Czas ogrzewania [min]	Komórki żywe (%)							
	błękit trypanu				barwniki fluorescencyjne			
	numer próby			$\bar{x} \pm SD$	numer próby			$\bar{x} \pm SD$
	1	2	3		1	2	3	
0	80	73	72	75 $\pm$ 4,3	76,0	70,2	71,3	72,5 $\pm$ 3,0
5	60	51	58	56 $\pm$ 4,7	63,0	55,3	65,5	61,2 $\pm$ 5,3
10	49	45	40	45 $\pm$ 4,5	49,6	48,0	45,6	47,7 $\pm$ 2,0

Tabela 3

Procentowa zawartość komórek żywych
w zawiesinach komórkowych ogrzewanych w temperaturze 42°C

Czas ogrzewania [min]	Komórki żywe (%)									
	błękit trypanu					barwniki fluorescencyjne				
	numer próby			n	$\bar{x} \pm SD$	numer próby			n	$\bar{x} \pm SD$
	1	2	3			1	2	3		
0(1)	69	50	58	3	59 $\pm$ 9,5	49,5	58,5	57,0	3	55,1 $\pm$ 4,9
0(2)	64	70	69	3	68 $\pm$ 3,2	63,8	62,3	63,8	3	63,3 $\pm$ 0,9
0(3)	69	59	66	3	65 $\pm$ 5,1	60,2	64,0	61,0	3	61,7 $\pm$ 2,0
0(4)	63	59	58	3	60 $\pm$ 2,6	59,9	56,7	63,8	3	60,2 $\pm$ 5,0
5(1)	51	60	58	3	56 $\pm$ 4,7	58,0	60,5	60,2	3	59,5 $\pm$ 1,3
5(2)	43	60	59	3	54 $\pm$ 9,5	48,0	43,4	43,0	3	44,8 $\pm$ 2,7
5(3)	49	49	60	3	53 $\pm$ 6,3	57,2	52,4	53,6	3	54,4 $\pm$ 2,4
5(4)	60	56	63	3	60 $\pm$ 3,5	64,4	64,7	64,9	3	64,6 $\pm$ 0,3
10(1)	50	47	46	3	48 $\pm$ 2,0	41,0	35,0	37,4	3	37,8 $\pm$ 3,0
10(2)	46	42	48	3	45 $\pm$ 3,0	41,6	40,2	42,9	3	41,5 $\pm$ 1,3
10(3)	46	38	50	3	43 $\pm$ 6,4	32,2	36,2	36,4	3	34,9 $\pm$ 2,3
10(4)	40	39	37	3	39 $\pm$ 1,2	42,3	40,8	42,6	3	49,9 $\pm$ 0,9

U w a g a: Liczby w nawiasach oznaczają numer próby.

Podobny wniosek pozwalają wyciągnąć wyniki przedstawione w tab. 3. W tym przypadku procentową zawartość komórek żywych w zawiesinach nie ogrzewanych (kontrolnych) lub ogrzewanych w temperaturze 42°C określano po 1 godz. przetrzymywania komórek w PBS, w temperaturze pokojowej. Spowodowało to spadek procentu komórek żywych w badanych zawiesinach komórkowych, stwierdzony obiema metodami.

DYSKUSJA

Przy określaniu zawartości żywych komórek w zawiesinach wykorzystuje się różnicę w przenikaniu różnorodnych barwników przez błony komórek martwych lub żywych. Niektóre barwniki nie mogą przechodzić przez błonę komórek żywych. Zalicza się do nich: błękit trypanu, eozylna Y, nigrozyna oraz

barwniki fluorescencyjne, takie jak: jodek propydydy czy bromek etydydy [3, 6]. Natomiast inne barwniki, np: dwuocian fluoresceiny, penetrują tylko nienaruszoną błonę komórkową [3, 1]. W związku z tym w przypadku barwienia bromkiem etydydy lub jodkiem propydydy ocenia się fluorescencję martwych komórek, natomiast w przypadku barwienia oranżem akrydydy określa się fluorescencję komórek żywych [2, 3, 6].

Wewnątrz komórki barwniki mogą wiązać się z różnymi organellami komórkowymi lub związkami chemicznymi. Barwniki fluorescencyjne, takie jak: jodek propydydy, bromek etydydy, oranż akrydydy, najczęściej wiążą się z kwasami nukleinowymi [1, 2, 3, 5, 7, 8, 14]. Inne barwniki, np. nigrozyna 540, rodamina, mają zdolność wiązania się z błoną komórkową, natomiast *Nikle Red* wykazuje powinowactwo do lipidów [10]. Niefluorescencyjne barwniki, takie jak: błękit trypanu, eozylna Y, nigrozyna, mogą wnikać tylko do martwych komórek [6].

Tradycyjnie liczbę żywych lub martwych komórek ocenia się mikroskopowo w mikroskopie świetlnym lub fluorescencyjnym. W przypadku użycia barwników fluorescencyjnych, zamiast czasochłonnej metody mikroskopowej można zastosować cytometr przepływowy. Użycie cytometru przepływowego pozwala na policzenie dużej liczby komórek, co zwiększa wiarygodność otrzymywanych wyników i pozwala również uniknąć subiektywności metody mikroskopowej [11, 4]. Metoda cytometrii przepływowej jest szczególnie użyteczna w ocenie żywotności zawiesin komórkowych zawierających niewielki procent komórek martwych [4, 9, 13, 15].

Zastosowanie oranżu akrydydy, jako jedyne barwnika różnicującego komórki żywe i martwe, nie zawsze pozwala na uzyskanie dokładnego wyniku. Analizując wyniki zamieszczone w tab. 1 można stwierdzić, że procent komórek żywych w zawiesinach barwionych samym oranżem akrydydy jest wyższy niż procent komórek żywych oznaczany za pomocą błękitu trypanu. Zastosowanie dodatkowego barwnika bromku etydydy (barwiącego komórki martwe) pozwoliło precyzyjnie ocenić zawartość żywych komórek w badanych zawiesinach komórkowych. W tym przypadku nie obserwowano istotnych różnic między wartościami procentu komórek żywych oznaczanych metodą cytometryczną lub mikroskopową w różnorodnych zawiesinach komórkowych. Świadczy to o pełnej przydatności metody cytometrycznej do szybkiej oceny żywotności komórek w zawiesinach komórek świeżo izolowanych lub poddawanych różnym stresom.

Metoda cytometryczna wydaje się być nie tylko mniej czasochłonna niż metoda mikroskopowa, ale również bardziej dokładna. Świadczy o tym lepsza powtarzalność wyników uzyskiwanych tą metodą w doświadczeniach, w których oceniano żywotność komórek w wielu próbach przygotowywanych z tej

samej zawiesiny komórkowej. Stwierdzenie to pozostaje w zgodzie z opiniami autorów stosujących odmienne metody odróżniania komórek żywych od martwych [8, 15].

LITERATURA

- [1] Andreeff M. (1990), *Flow Cytometry and Sorting*, Chap.: *Flow cytometry of leukemia*, Wiley-Liss, 697–724.
- [2] Carter N. P. (1990), *Flow Cytometry A Practical Approach*. Chap.: *Measurement of Cellular Subsets Using Antibodies*, ed. M. G. Ormerod, 45–67.
- [3] Hunt S. V. (1987), *Lymphocytes A Practical Approach*, Chap.: *Preparation of Lymphocytes and Accessory Cells*, ed. C. C. B. Klaus, 1–32.
- [4] Jensen R. H., Leary J. F. (1990), *Flow Cytometry and Sorting*, Chap.: *Mutagenesis as Measured by Flow Cytometry and Cell Sorting*, Wiley-Liss, 553–562.
- [5] Janssen O., Wesselborg S., Heckl-Ostreicher B., Pechhold K., Bender A., Scholdenmaier S., Moldenhauer G., Kabelitz D. (1991), *J. Immunol.*, **146**, 35–39.
- [6] Mishell B. B., Shugi S. M., Henry C., Chan E. L., North J., Gallily R., Slomich M., Miller K., Marbrook J., Parks D., Good A. H. (1980), *Selected Method in Cellular Immunology*, Chap.: *Preparation of Mouse Cell Suspensions*, ed. B. B. Mishell, S. M. Shiigi, 1–27.
- [7] Myc A., Kimmel., Darzynkiewicz Z., *Estimation Dexamethasone (DEX), Action on Cell Cycle Kinetics and G-exit in Lymphocytes* (w druku).
- [8] Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M. C., Grignani F., Riccardi C. (1991), *J. Immunol. Meth.*, **193**, 271–279.
- [9] Nir R., Yisraeli Y., Lamed R., Sahar E. (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3861–3866.
- [10] Ormerod M. G. (1990), *Flow Cytometry A Practical Approach*, Chap.: *An Introduction to Fluorescence Technology*, ed. M. G. Ormerod, 29–44.
- [11] Ormerod M. G. (1990), *Flow Cytometry A Practical Approach*, Chap.: *Further Applications to Cell Biology*, ed. M. G. Ormerod, 265–272.
- [12] Saijo N. (1973), *Immunology*, **24**, 83–690.
- [13] Steen H. B. (1983), *Histochem. J.* **15**, 147–160.
- [14] Steen H. B., Boye E., Skarstad K., Bloom B. (1982), *Cytometry*, **2**, 249–257.
- [15] Szekely J. G., Lobreau A. U., Einspenner M., Raaphorst G. P. (1989), *Int. J. Radiat. Biol.*, **47**, 681–688.

Wpłynęło do Redakcji Foliai
15.07.1992 r.

Katedra Biofizyki Molekularnej
Katedra Termobiologii
Uniwersytet Łódzki

Centrum Mikrobiologii
i Wirusologii PAN

Andrzej Zaborowski, Magdalena Klink, Błażej Różga

THE CYTOMETRIC METHOD FOR MEASUREMENT OF THE VIABILITY OF LYMPHOID CELLS UNDER HEAT SHOCK

The viability of freshly isolated or heat-treated lymphocytes was estimated by the classical microscopic method based on trypan blue inclusion and it was measured by flow cytometry of the cells stained with acridine orange and ethidium bromide or with acridine orange alone. It has been showed that flow cytometry of fluorescence stained cells allowed to determine the viability of the cell suspensions containing even a small percentage of dead cells rapidly and accurately.