

20.1. Wykonanie ćwiczenia

20.1.1. Materiały

Wybarwiony i wysuszony żel (12.6%) po rozdziale SDS–PAGE z białkiem o nieznannej masie (?) oraz białkami wzorcowymi LMW lub HMW (Pharmacia) (rys. 1).

20.1.2. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

- Zmierzyć dystans przebyty przez każde z białek wzorcowych.
- Obliczyć R_f dla białek wzorcowych.
- Wykreślić krzywą zależności $\log M$ od R_f odkładając na osi X wartości R_f , a na osi Y $\log$ masy.

20.1.3. Określenie masy

- Zmierzyć dystans przebyty przez białko analizowane.
- Obliczyć R_f dla tego białka.
- Z krzywej odczytać wartość $\log M$, następnie podać wartość masy.

L i t e r a t u r a

- Osterman L.A.: *Methods of protein and nucleic acid research*, Springer Verlag 1, 1984.
Elektroforeza [w:] *Analiza instrumentalna*, PZWL, 1983, s. 404–406.
Polyacrylamide Gel Electrophoresis–laboratory technique, Pharmacia, 1981.

21.

TEST MIKROJĄDROWY

Pracownia Hematologii i Toksykologii Zakładu Fizjologii Zwierząt UJ

Wstęp

Mikrojądra są to twory z reguły o okrągłych lub owalnych kształtach, zawierające chromatynę, otoczone błoną jądrową nie posiadającą połączeń z jądrem komórkowym. Powstają z centrycznych lub acentrycznych fragmentów chromosomów bądź z całych chromosomów, które pozostały poza obrębem jąder komórek siostrzanych w czasie podziału komórkowego. Mikrojądra tworzą się jedynie w układach komórek proliferujących, podlegających podziałom komórkowym. Występują pojedynczo, rzadziej spotyka się kilka mikrojąder w jednej komórce. Mikrojądra są biologicznym wskaźnikiem genotoksyczności, gdyż powstają one pod wpływem działania różnorodnych czynników chemicznych i fizycznych, jak również spontanicznie. Komórki z mikrojądrem lub mikrojądrami są przejawem „opóźnionej apoptozy”.

Testy mikrojądrowe są wykonywane w różnych komórkach u roślin, zwierząt i ludzi. Mikrojądra są analizowane u wielu roślin, między innymi u bobu (*Vicia faba*), czosnku pospolitego (*Allium sativum*), cebuli (*Allium cepa*), kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), pszenicy (*Triticum*), trzykrotki (*Tradescantia*). Obecność mikrojąder u roślin najczęściej określa się w komórkach wierzchołka wzrostu korzenia, a w przypadku *Tradescantia* w macierzystych komórkach pyłku kwiatowego. Test mikrojądrowy jest przeprowadzany u zwierząt na komórkach układu rozrodczego – w spermatydach, na komórkach embrionalnych będących w okresie przedimplantacyjnym, w tkankach płodowych – w wątrobie płodów, u dorosłych osobników – w układzie hemopoetycznym na erytrocytach i limfocytach, a także w hepatocytach wątroby, w komórkach nabłonkowych jamy ustnej, w komórkach guzów nowotworowych, natomiast u ludzi – na limfocytach, fibroblastach, komórkach tkanki nowotworowej.

Test mikrojądrowy jest uważany za prostą i szybką w wykonaniu, a równocześnie czułą metodę określania uszkodzeń materiału genetycznego przez czynniki toksyczne czy leki. Ilościowa analiza mikrojąder ma ogromne znaczenie w badaniach prowadzonych w różnych dziedzinach, a mianowicie w toksykologii, hematologii, radiobiologii, w diagnostyce chorób genetycznych, w terapii – radioterapii, chemioterapii, w onkologii czy w ekologii podczas monitorowania zanieczyszczenia środowiska naturalnego.

Małe, okrągłego kształtu twory, barwiące się podobnie jak jądro komórkowe, były obserwowane w cytoplazmie erytrocytów już w drugiej połowie XIX wieku. Struktury te zostały opisane przez Howella i Jolly’ego i przez wiele lat były określane przez hematologów jako ciała Howella i Jolly’ego. Test mikrojądrowy w układzie erytrocytarnym został wprowadzo-

ny do badań w latach siedemdziesiątych przez Schmida i Heddle'a. W ciągu ostatnich lat erytrocytarny test mikrojądrowy jest powszechnie stosowany w badaniach doświadczalnych przeprowadzanych *in vivo* na gryzoniach, głównie na myszach, w wielu laboratoriach na świecie. W przypadku erytropoezy, mikrojadra powstają w erytroblastach. Nowo tworzące się erytrocyty, powstające wskutek ekspulsji jądra komórkowego erytroblastu, wciąż zawierające rybosomalny RNA w cytoplazmie, są nazywane erytrocytami polichromatycznymi (PCE). W odróżnieniu od erytrocytów młodocianych, dojrzałe erytrocyty pozbawione rybosomów barwią się odmiennie i są określane jako erytrocyty normochromatyczne (NCE). Mikrojadra są łatwo rozpoznawane w erytrocytach ssaków pozbawionych jądra komórkowego. Obecność i częstość występowania mikrojader powstałych pod wpływem działania różnych czynników toksycznych określa się z reguły w erytrocytach polichromatycznych. Liczba erytrocytów polichromatycznych z mikrojadrą lub mikrojadrami (MNPCE) jest analizowana najczęściej w szpiku kostnym i krwi obwodowej, a także w śledzionie. Obliczany stosunek PCE do NCE jest uznawany za wskaźnik cytotoxyczności badanego czynnika, działającego na układ erytrocytarny.

Test mikrojądrowy wykonywany na limfocytach krwi obwodowej jest metodą *in vivo* i *in vitro* szeroko stosowaną w badaniach doświadczalnych na zwierzętach laboratoryjnych, a zwłaszcza na limfocytach ludzkich. W mikrojądrowej technice bloku cytokinetycznego proces powstawania mikrojader wymaga proliferacji komórkowej. Limfocyty krwi obwodowej są stymulowane do podziałów komórkowych przez mitogeny, najczęściej przez fitohemaglutyninę (PHA). Mikrojadra są obserwowane w dwujądrowych limfocytach, w których proces cytokinezy jest blokowany przez cytochalazynę B.

Mikrojadra można obserwować, stosując różnorodne barwniki DNA. Częstość występowania komórek z mikrojadrą lub mikrojadrami w analizowanych układach komórkowych, a między innymi w układzie hemopoetycznym, jest określana mikroskopowo lub przy zastosowaniu cytometrii przepływowej.

W celu przeprowadzenia analizy w mikroskopie świetlnym, rozmazy szpiku kostnego, krwi obwodowej, zawiesiny limfocytów i repliki śledziony, po utrwaleniu w metanolu, są barwione metodą Wright/Giemsa lub May-Grünwald/Giemsa. Stosując te metody, a nie mając doświadczenia w rozpoznawaniu mikrojader, można mylić je z tworami kształtem przypominającymi mikrojadra bądź z cząstkami RNA, które wybarwiają się identycznie barwnikiem Giemsa. W rozmazach szpiku kostnego szczurów ziarnistości komórek tucznych barwią się podobnie jak mikrojadra, dlatego te preparaty należy barwić hematoksyliną i eozyną bądź barwnikami fluorescencyjnymi.

Zastosowanie barwników fluorescencyjnych wyklucza niewłaściwe rozpoznawanie mikrojader. Preparaty utrwalone w metanolu barwi się fluorochromami bezpośrednio przed wykonaniem analizy w mikroskopie fluorescencyjnym. Stosując metodę barwienia oranżem akrydyny (AO), wykorzystuje się metachromatyczne właściwości tego fluorochromu, który inaczej barwi podwójny, a odmiennie pojedynczy łańcuch kwasów nukleinowych. AO związany z podwójnym łańcuchem DNA emituje zieloną fluorescencję, natomiast połączony z pojedynczym łańcuchem emituje światło o barwie pomarańczowoczerwonej. W teście mikrojądrowym są także używane takie barwniki, jak bromek etydy (EB) oraz Hoechst 33258 (HO258) z pyroniną Y. EB emituje odmienną, zarówno jasną, jak i niewyraźną, przyćmioną fluorescencję w połączeniu, odpowiednio, z DNA i RNA. HO258 związany z DNA emituje światło o barwie niebieskiej, a pyronina Y wiążąca się z RNA emituje czerwoną fluorescencję.

W cytometrze przepływowym, obecność mikrojadrastych erytrocytów ssaków jest analizowana przy zastosowaniu metody barwienia oranżem tiazolu (TO) i Hoechst 33342 (HO342).

TO barwiący RNA pozwala na rozróżnienie PCE od NCE, a fluorochrom DNA, HO342 na wykrycie mikrojader obecnych w erytrocytach polichromatycznych i normochromatycznych. W przypadku analizy mikrojader w dwujądrastych limfocytach, również stosuje się fluorochromy odmiennie barwiące DNA i RNA.

21.1. Wykonanie ćwiczenia

Analiza MNPCE i PCE w układzie erytrocytarnym myszy.

21.1.1. Przygotowanie preparatów krwi obwodowej, szpiku kostnego i śledziony

Rozmazy krwi obwodowej wykonuje się, pobierając krew z koniuszka ogona myszy. Rozmazy szpiku kostnego przygotowuje się z zawiesiny komórek szpiku otrzymanej w następujący sposób: po wycięciu kości udowych i odcięciu ich końców: proksymalnego i dystalnego, komórki szpiku wypłukuje się na szkiełko zegarkowe umieszczone na lodzie, stosując 500 µl płynu Hanksa lub płodowej surowicy cielęcej; następnie komórki oddziela się od siebie, przepuszczając ich zawiesinę przez igły o malejącej średnicy (LUER, 21G–24G); zawiesinę pojedynczych, rozproszonych komórek wiruje się przy 1000 rpm, w temperaturze 4°C, przez 5 minut; po odlaniu nadsącza, sporządza się zawiesinę komórek szpiku w 50 – 100 µl płynu Hanksa lub płodowej surowicy cielęcej, po czym wykonuje się rozmazy. Ze śledziony sporządza się repliki. Po wysuszeniu, przygotowane preparaty utrwalą się w metanolu w postaci czystej, wolnym od acetonu, przez 10 minut.

21.1.2. Barwienie preparatów metodą Wright/Giemsa lub May-Grünwald/Giemsa

- Zalać preparaty sporządzone na szkiełkach podstawowych, uprzednio przesączonymi barwnikami: Wrighta na 4 minuty lub Maya i Grünwalda, na 7 minut.
- Dodać wody redestylowanej w takiej ilości, aby uzyskać na szkiełku około 50% roztwór odpowiedniego barwnika, Wrighta lub Maya i Grünwalda, na 5 minut.
- Zlać barwnik ze szkiełka i nalać świeżo sporządzony i przesączony barwnik Giemsa (15 kropeł macierzystego barwnika Giemsa na 10 ml wody redestylowanej), na 15 minut.
- Barwnik spłukać bieżącą wodą wodociągową, preparaty suszyć w temperaturze pokojowej.

21.1.3. Barwienie preparatów oranżem akrydyny

- Zalać preparaty uprzednio przygotowanym barwnikiem oranżu akrydyny (zmieszać 2 części 0.1% wodnego roztworu oranżu akrydyny i 30 części buforu fosforanowego Sörensen, pH = 6.8), na 3 minuty.
- Zlać barwnik i trzykrotnie zalać preparat buforem Sörensen, na 5 minut, każdorazowo zlewając ze szkiełka uprzednio nalany bufor.
- Po zlanii buforu Sörensen, preparaty suszyć w temperaturze pokojowej.

21.1.4. Oglądanie wybarwionych rozmazów szpiku kostnego, krwi obwodowej i replik śledziony w mikroskopie świetlnym i epiluminescencyjnym

Wykonane preparaty należy oglądać pod imersją, stosując obiektyw powiększający 100x. W preparatach wybarwionych metodami Wright/Giemsa lub May-Grünwald/Giemsa, w mikroskopie świetlnym, mikrojądra są widoczne w purpurowym kolorze, PCE wykazują niebieskawe zabarwienie, a NCE są koloru jasnoceglastego. W preparatach wybarwionych AO, w mikroskopie epiluminescencyjnym, mikrojądra wykazują zieloną fluorescencję, PCE pomarańczowoczerwona, natomiast NCE nie wykazują fluorescencji.

21.1.5. Określenie ilości MNPCE i PCE/(PCE + NCE)

W preparatach sporządzonych ze szpiku kostnego, krwi obwodowej i śledziony myszy kontrolnych i potraktowanych czynnikiem toksycznym, przeprowadzić ilościową analizę MNPCE i PCE. Obserwując 1000 erytrocytów polichromatycznych, określić ilość erytrocytów polichromatycznych zawierających mikrojądro lub mikrojądra, wyrażając tę wartość w promilach. Porównać ilości MNPCE uzyskane z analizy preparatów w mikroskopie świetlnym i epiluminescencyjnym. Przeprowadzając analizę w mikroskopie świetlnym, przegłębnie 1000 napotkanych erytrocytów i obliczyć procentowy stosunek PCE/(PCE + NCE).

L i t e r a t u r a

- Fenech M.: *The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations*, Environ. Health Perspect. 101 (1993), Suppl. 3, s. 101–107.
- Mazur L. i Darżynkiewicz Z.: *Apoptoza w układzie hemopoetycznym* [w:] *Fizjologia krwi* (red. Z. Dąbrowski), PWN, Warszawa 1998, rozdz. XVII, s. 286–315.
- Mavournin K.H., Blakey D.H., Cimino M.C., Salamone M.F. and Heddle J.A.: *The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*, Mutation Res. 239 (1990), s. 29–80.
- Müller W.U. and Streffer C.: *Micronucleus assays* [w:] *Advances in Mutagenesis Research* (G. Obe Ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1994, s. 1–134.
- Stoper H. and Müller S.O.: *Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. Toxicology in vitro*, 11 (1997), s. 661–667.

22.

WYBRANE TECHNIKI ANALIZY APOPTOZY I NEKROZY

Pracownia Hematologii i Toksykologii Zakładu Fizjologii Zwierząt UJ

Wstęp

Na podstawie różnic istniejących na poziomie morfologicznym, biochemicznym i molekularnym wyróżnia się dwa odmienne, wzajemnie wykluczające się rodzaje śmierci komórkowej: apoptozę i nekrozę. Apoptoza, jako śmierć fizjologiczna, jak również zachodząca pod wpływem różnorodnych czynników, o względnym nasileniu, w większości zewnątrzkomórkowych, jest szczególnym rodzajem aktywnej, programowanej, samobójczej śmierci komórki. Nekroza, określana inaczej jako śmierć martwicza lub martwica, jest śmiercią przypadkową, powodowaną warunkami patologicznymi. Analiza śmierci komórkowej pozostaje w centrum za-interesowania badaczy z różnych dziedzin nauki, takich jak: biologia molekularna, embriologia, neurologia, endokrynologia, immunologia, hematologia czy onkologia. Opracowano szereg technik mikroskopowych i cytometrycznych, pozwalających na analizę śmierci apoptotycznej i nekrotycznej. Metody te są oparte na zmianach morfologii komórki, zmianach w strukturze chromatyny oraz w strukturze błony plazmatycznej i jej funkcji transportowej, jak również na endonukleolitycznej degradacji DNA czy funkcjonowaniu organelli komórkowych.

Objawem śmierci apoptotycznej jest zmiana wielkości i kształtu komórki. Komórka zmniejsza swoją objętość, następuje kondensacja i brzeżne ułożenie chromatyny w jądrze, zachodzi kondensacja cytoplazmy i miejscowe uwypuklenie się powierzchni komórki. W wyniku dalszej kondensacji oraz fragmentacji jądra i cytoplazmy tworzą się ciała apoptotyczne. W procesie nekrozy dochodzi do zwiększania się rozmiarów komórki, obrzęku organelli komórkowych, głównie mitochondriów i siateczki endoplazmatycznej. Organelle komórkowe ulegają degeneracji, tworzą się wakuole, polisomy odłączają się od siateczki śródplazmatycznej. W dalszym etapie procesu martwicy obserwuje się rozerwanie błony komórkowej, rozpad organelli, destrukcję chromatyny, zanik jądra i całkowitą strukturalną dezintegrację komórki. Analizę zmian morfologicznych w komórkach umierających śmiercią apoptotyczną i nekrotyczną można przeprowadzać w mikroskopie świetlnym, fluorescencyjnym, elektronowym czy konfokalnym, przy zastosowaniu różnych metod barwienia, jak również w cytometrze przepływowym, gdyż zdolność rozpraszania światła przez komórki wędrujące przez ognisko strumienia lasera zmienia się podczas śmierci komórkowej. Zmiany rozproszenia światła nie są jednakże swoiste dla jednego rodzaju śmierci komórkowej, dlatego oprócz określania intensywności rozproszonego światła na wprost mierzonego w przedłużeniu promienia lasera (FLS, *forward light*