

Anna KOZIOROWSKA, Lena MAJCHROWICZ

Uniwersytet Rzeszowski, Polska

Nauczanie na kierunku biotechnologia umiejętności pracy w laboratorium na przykładzie badań przeżywalności komórek w hodowli *in vitro*

Wstęp

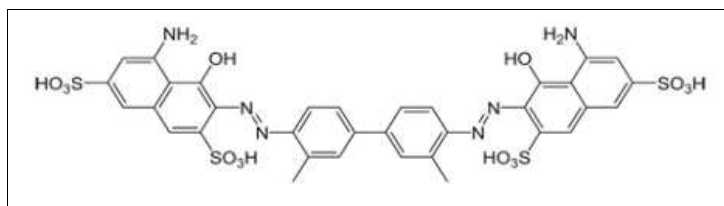
Biotechnologia jest interdyscyplinarną dziedziną łączącą w sobie wiedzę z zakresu biologii, fizyki, chemii, techniki i bioinformatyki. To integracja nauk przyrodniczych i inżynierskich wykorzystywana w procesach biologicznych przebiegających przy udziale drobnoustrojów, kultur tkankowych oraz biokatalizatorów. Studenci podczas studiów zdobywają wiedzę teoretyczną i nabywają praktycznych umiejętności przystosowujących ich do pracy w przemyśle biotechnologicznym i przemysłach pokrewnych [Havdala, Ashkenazi 2007]. Praca badawcza wymaga także zdolności logicznego i twórczego myślenia oraz otwartości umysłu. Niezbędne dla biotechnologa staje się więc poszerzanie swojej wiedzy z zakresu dziedzin pokrewnych, takich jak: materiałoznawstwo, elektronika, technika komputerowa oraz zarządzanie [Scott i in. 2006]. Dzięki zdobytym w trakcie studiów kwalifikacjom studenci mogą znaleźć zatrudnienie m.in. w laboratoriach badawczych, kontrolnych i diagnostycznych.

Analiza witalności komórek

Z praktycznym zastosowaniem biotechnologii spotykamy się na co dzień. Jej przykładami mogą być: produkcja piwa, fermentacja mlekowa, alkoholowa, metody immunodiagnostyczne, które zrewolucjonizowały diagnostykę endokrynologiczną, czy diagnostyka procesów nowotworowych. Cechą wspólną tych wszystkich zjawisk jest obecność organizmów żywych, komórek lub ich struktur, żeby wytwarzać lub modyfikować produkty lub procesy w określonym zastosowaniu.

Komórki jako podstawowe jednostki strukturalne organizmu odgrywają ogromną rolę w funkcjonowaniu istot żywych. Pojedyncza komórka zwierzęca zbudowana jest z jądra komórkowego, błony komórkowej, cytoplazmy, mitochondriów, jąderka, siateczki śródplazmatycznej gładkiej i szorstkiej, rybosomów, aparatu Golgiego i lizosomu. Jej aktywność metaboliczna jest zależna od stanu fizjologicznego, na który wpływają zarówno czynniki zewnętrzne, jak i wewnętrzne [Alberts 2009].

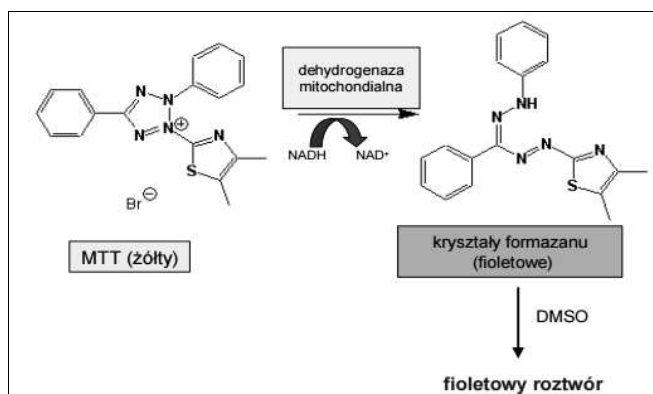
Jednym z badań wykorzystywanych do oceny żywotności komórek jest barwienie przyżyciowe błękitem trypanu (rys. 1).



Rys. 1. Wzór strukturalny błękitu trypanu

Ze względu na ujemny ładunek nieuszkodzonej błony komórkowej związek ten nie posiada zdolności wnikania do żywych komórek. Natomiast kiedy integralność błony zostanie trwale uszkodzona i następuje zanik potencjału pomiędzy zewnętrzną a wewnętrzną jej stroną, błękit trypanu przenika do wnętrza komórki, barwiąc cytoplazmę lub/i jądro na kolor niebieski. Komórki żywe z nie naruszoną błoną komórkową nie ulegają penetracji przez ten związek, pozostając przezroczystymi [Louis, Siegel 2011]. Przeżywalność komórek oceniana jest w hemocytometrze przy zastosowaniu mikroskopii świetlnej. Witalność jest ilorazem liczby komórek żywych do całkowitej ich liczby.

Inną metodą służącą pomiarowi aktywności metabolicznej komórek jest test MTT. Istotą tego badania jest kolorymetryczny pomiar aktywności mitochondrialnej komórek. W wyniku zastosowania tej techniki pomarańczowe, nierozpuszczalne w wodzie kryształki soli tetrazolowej (MTT) są rozpuszczane w solwencie MTT (rozpuszczalniku organicznym) i redukowane do barwnego formazanu (rys. 2). Absorbancja mierzona jest spektrofotometrycznie przy długości fali 590 nm, uwzględniając długość fali referencyjnej (620 nm). Przeżywalność komórek określona się, porównując próbę badaną do próby kontrolnej [Cieślik 2012].

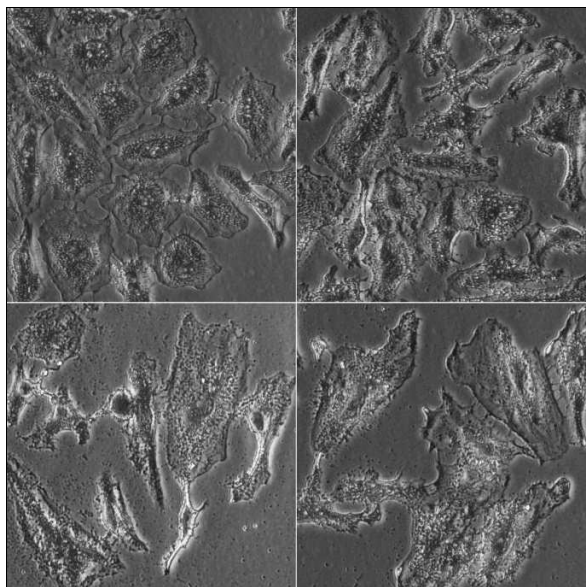


Rys. 2. Schemat działania testu MTT [Cieślik 2012]

Komórka przez całe życie ulega licznym podziałom. Procesy te muszą być ściśle regulowane. Brak kontroli nad nimi może prowadzić do nieograniczonych

podziałów bez różnicowania, czego następstwem jest kancerogeneza [Alberts 2009]. Komórka posiada mechanizmy zapobiegające proliferacji, a w rezultacie doprowadzające do śmierci. W zależności od czynników, jakie działają na tę podstawową strukturę budulcową organizmu, wyróżniamy dwa rodzaje śmierci: apoptozę i nekrozę [Rogalska 2008].

Nekroza jest spontaniczną i bierną odpowiedzią komórki na działanie zewnątrzkomórkowych czynników. Efektem tego procesu jest zahamowanie oddychania wewnątrzkomórkowego i produkcji związków wysokoenergetycznych. Na skutek nekrozy następuje poszerzenie przestrzeni siateczek śródplazmatycznych prowadzące do obrzęku mitochondriów, perforacji błon plazmatycznych, pęcznienia komórki, czego konsekwencją jest śmierć. Zawartość komórki wylewa się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, powodując stan zapalny (potocznie zwany martwicą). Apoptoza natomiast jest kontrolowanym przez geny wewnątrzkomórkowym procesem prowadzącym do zaprogramowanej śmierci komórki. Następstwem tego zjawiska jest usuwanie starych, niepożądanych i uszkodzonych komórek. Atrofia spowodowana jest wycofaniem z wnętrza komórki wszystkich czynników koniecznych do przeżycia. Jej skutkiem jest kondensacja cytoplazmy i pomarszczenie powierzchni komórki oraz zmiany w jądrze prowadzące do jego fragmentacji. Cytoplazma z organellami komórkowymi zostaje otoczona fragmentami błony cytoplazmatycznej. W wyniku tego procesu powstają ciała apoptotyczne, które są fagocytowane przez sąsiednie komórki, dzięki czemu apoptoza nie powoduje stanu zapalnego [Rogalska 2008; Wong 2011].



Rys. 3. Zmiany apoptotyczne w komórkach linii HeLa barwionych Giemsy. Powiększenie 20x. (fot. P. Sołek)

Istnieje wiele metod detekcji apoptozy. Wśród nich należy wyróżnić opierające się na oznaczaniu aktywności kaspazy 3, elektroforezie w żelu agarozowym, barwieniu jodkiem propidyny i DAPI, teście z aneksyną V oraz metodzie TUNEL [Rogalska 2008]. Zaprogramowaną śmierć komórki ocenić również można przy użyciu techniki utrwalania i barwienia komórek odczynnikiem Giemsa z wykorzystaniem obserwacji mikroskopowej, gdyż zmiany zachodzące w komórce na skutek apoptozy są łatwo dostrzegalne (rys. 3).

Podsumowanie

Studenci kierunku biotechnologia na Uniwersytecie Rzeszowskim uczeni są praktycznych umiejętności pracy w laboratoriach mikrobiologicznych, fizykochemicznych, analitycznych czy cytogenetycznych. Zdobywają te kwalifikacje podczas zajęć laboratoryjnych. Dzięki wnikliwemu poznaniu przedmiotu techniki laboratoryjne w biologii eksperymentalnej oraz przy zastosowaniu doświadczenia praktycznego z zakresu podstaw kultur tkankowych i komórkowych oraz wiedzy przekazywanej na zajęciach biologii komórki i mikrobiologii ogólnej możliwa staje się morfologiczna ocena witalności komórek. Przedmioty akademickie umożliwiają studentowi przełożenie zdobytych podczas zajęć dydaktycznych informacji na ich zastosowanie w trakcie pracy w laboratorium. Ułatwiają przyswajanie wiedzy dotyczącej posługiwania się sprzętem laboratoryjnym, poznanie i wnikliwą analizę budowy, funkcji i procesów zachodzących w komórkach, obejmujących ocenę ich stanu fizjologicznego, oraz zapoznanie się z technikami pracy w warunkach *in vitro*, które są uproszczonym modelem procesów zachodzących *in vivo*. Studenci przygotowywani są do sprawnego wykorzystywania współczesnej technologii i nowatorskich metod biologii eksperymentalnej. Uzyskana wiedza praktyczna pozwala im stać się bardziej atrakcyjnymi na obecnym rynku pracy.

Literatura

- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2009): *Podstawy biologii komórki*, Warszawa.
- Cieślik M. (2012): *Znaczenie czynnika indukującego apoptozę AIF w toksyczności peptydów amyloidu β i w genotoksyczności N-metyl-N'-nitro-Nnitrozoguanidyny MNNG*, praca doktorska, Warszawa.
- Havdala R., Ashkenazi G. (2007): *Coordination of Theory and Evidence: Effect of Epistemological Theories on Students' Laboratory Practice*, „Journal of Research in Science Teaching” vol. 44(8).
- Louis K.S., Siegel A.C. (2011): *Mammalian Cell Viability*, AO Research Institute 740.
- Rogalska S.M. (2008): *Biologia komórki w zarysie*, Szczecin.
- Stokłosowa S. (2004): *Hodowla komórek i tkanek*, Warszawa.
- Scott D.G., Washer B.A., Wright M.D. (2006): *A Delphi Study to Identify Recommended Biotechnology Competencies for First-Year/Initially Certified Technology Education Teachers*, „Journal of Technology Education” vol. 17(2).
- Wong R. (2011): *Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment*, „Journal of Experimental & Clinical Cancer Research” vol. 30.

Streszczenie

Nauka na kierunku biotechnologia na Uniwersytecie Rzeszowskim daje możliwość praktycznego wykorzystania wiedzy teoretycznej zdobytej podczas studiów do pracy laboratoryjnej. Wnikliwe poznanie technik laboratoryjnych ułatwia dostosowanie się do obecnych wymogów rynku pracy. W artykule przedstawiono zagadnienia badań witalności komórek hodowanych w warunkach *in vitro* jako przykład zastosowania praktycznego wiedzy teoretycznej zdobytej w czasie wykładów.

Słowa kluczowe: nauczanie praktycznych umiejętności, żywotność, kolorymetryczny test MTT, błękit trypanu, biotechnologia.

Education of the Practical Skills of Working in Laboratory Majoring in Biotechnology Based on the Study on Viability of Cell Cultures *in vitro*

Abstract

Education majoring in biotechnology at the University of Rzeszów gives the practical use of theoretical knowledge acquired during the study for laboratory work. Thorough knowledge of laboratory techniques makes graduates easier to adapt to current labor market requirements. The paper presents the research of viability of cells culture *in vitro* as an example of practical application of theoretical knowledge acquired during lectures.

Keywords: practical skills education, viability, MTT colometric assay, trypan blue, biotechnology.