

BIOLOGIA KOMÓRKI

**NIEZALEŻNY OD KONTAKTU Z PODŁOŻEM WZROST KOMÓREK
NOWOTWOROWYCH**

Wstęp

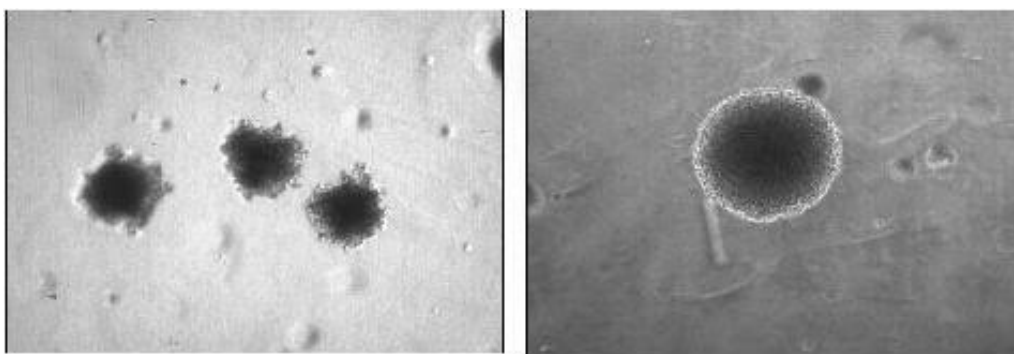
Większość prawidłowych komórek zwierzęcych hodowanych *in vitro* podejmuje syntezę DNA i proliferację (a zatem wzrost) tylko po przyłączeniu się do podłoża. Zjawisko to określane jest jako **zależność wzrostu od przyłączenia** (*ang. anchorage dependence of growth*). Komórki wykazujące tę właściwość hodowane w warunkach uniemożliwiających przyłączenie do podłoża nie syntetyzują DNA i nie dzielą się, pozostając w fazie G₁ cyklu komórkowego. Jednak liczne badania wykazały, że spadek stopnia rozpląszczenia (zaokrąglenie) komórek nowotworowych hodowanych na podłożach o różnej adhezyjności nie prowadzi do całkowitego zatrzymania ich wzrostu. Zdolność komórek nowotworowych do wzrostu w zawiesinie, a także do wzrostu wielowarstwowego, odróżnia je od komórek prawidłowych. Ponadto, komórki nowotworowe są zwykle znacznie słabiej rozpląszczone niż komórki prawidłowe, a także charakteryzuje je zmieniona architektura cytoszkieletu aktynowego. Z kolei brak wpływu stopnia rozpląszczenia na zdolność do wzrostu wskazuje na obniżoną wrażliwość komórek nowotworowych na zmiany ich kształtu w warunkach *in vitro*.

Fakt ten oznacza, że wiele linii komórek nowotworowych można hodować w zawiesinie lub/i w tzw. pożywkach półpłynnych. Pożywki tego typu, obok standardowych składników stosowanych dla kultur komórkowych, zawierają czynnik żelujący w postaci agaru, agarozy lub metylocelulozy, który ogranicza ruchy komórek, sprzyjając ich izolacji. Pozwala to na tzw. klonowanie, czyli uzyskanie populacji komórek powstałych z podziałów jednej komórki wyjściowej. Już w roku 1964 MacPherson i Montagnier wykazali, że transformowane komórki BHK21 mogą być hodowane preferencyjnie w agarze, podczas gdy ich nie transformowane odpowiedniki namnażają się bardzo wolno. Z kolei Freedman i Shin (1974) zaobserwowali korelację między potencjałem metastatycznym spontanicznych guzów a zdolnością komórek z nich pobranych do tworzenia klonów w zawiesinie. Hamburger i Salmon (1977) wykazali, że liczne ludzkie guzy zawierają mały procent komórek (<1.0) które ulegają klonowaniu w agarze. Dlatego obecnie uważa się, że wzrost w półpłynnych pożywkach stanowi prostą w obserwacji fenotypową właściwość komórek transformowanych nowotworowo.

Mimo, że natura czynników kontrolujących zdolność komórek nowotworowych do formowania kolonii w pożywkach półpłynnych pozostaje wciąż niewyjaśniona, opisane zjawisko wykorzystuje się w testach obecności komórek nowotworowych w krótkoterminowych hodowlach ludzkich komórek oraz badaniach stopnia ich inwazyjności. Zaletą metod z wykorzystaniem wzrostu komórek w półpłynnych podłożach jest łatwość uzyskania pojedynczych klonów, które następnie mogą być izolowane i poddane dalszej hodowli. Służy to badaniu heterogenności populacji komórek nowotworowych i znajduje zastosowanie w badaniach wrażliwości nowotworów na nowo opracowywane terapie lecznicze.

Szerokie możliwości praktycznego zastosowania hodowli komórek na podłożach półpłynnych zaowocowały opracowaniem różnorodnych odmian tej techniki. Najprostsza z nich opiera się na zastosowaniu dwóch warstw agaru. W pierwszej kolejności na dno naczynia wylewa się warstwę podstawową powstałą przez zmieszanie agaru (uprzednio rozpuszczonego i schłodzonego do temperatury ok. 45°C) z medium hodowlanym. Proporcje dobrane są w taki sposób, aby stężenie agaru wynosiło około 0.5%. Warstwa podstawowa z jednej strony stanowi źródło składników odżywczych wspomagających wzrost komórek, z drugiej – uniemożliwia

komórkom adhezję do dna naczynia hodowlanego. Na warstwę podstawową wylewa się właściwą warstwę agaru zawierającą komórki. Liczba komórek, które się wysiewa zależy od użytej linii i waha się ona w granicach $10^1 - 10^5$ komórek/ml. Przygotowaną zawiesinę komórek miesza się z medium hodowlanym i agarem o stężeniu 0.3%. Następnie hodowle umieszcza się w cieplarni i inkubuje od kilku do kilkunastu dni. Gdy kolonie komórek stają się widoczne pod mikroskopem (składają się z kilkuset komórek, Rys.1.), przenosi się je za pomocą cienkiej pipety do nowego naczynia hodowlanego zawierającego świeżą pożywkę. Komórki delikatnie się rozpipetowuje i dalej namnaża.



Rys 1. Kolonie transformowanych nowotworowo komórek NIH3T3 hodowanych w agarze.

Cel:

Celem ćwiczenia jest założenie półpłynnej hodowli komórek szczurzego mięsaka XC lub mysiego czerniaka B16, a następnie obserwacja powstałych kolonii.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotować 15 ml 0.5% agaru w płynie hodowlanym. Do ciepłego (ok. 40 °C) płynu hodowlanego MEM z 10% FBS dodać (jałowo!!) odpowiednią objętość gorącego (prosto z łaźni wodnej) 2.5% agaru. Po wymieszaniu nałożyć po 1 ml roztworu na 3 szalki Petriego. Pozostałą część roztworu umieścić w łaźni wodnej. Szalki pozostawić do czasu zestalenia się agaru.
2. Wykonać pasaż komórek XC/B16:
 - a. zlać z naczynia płyn hodowlany, po czym natychmiast delikatnie zalać komórki ok. 2 ml roztworu PBS (37 °C), przepłukać, roztwór usunąć;
 - b. szybko zalać komórki ok. 0,5 ml roztworu 0.25% trypsyny i inkubować przez ok. 1-2 minuty (w temp. 37 °C), kontrolując pod mikroskopem stopień ich odrywania się od podłoża;
 - c. natychmiast po oderwaniu się komórek od podłoża zawiesić je w 2 ml pożywki hodowlanej celem inaktywacji trypsyny;
 - d. uzyskaną zawiesinę przenieść pipetą do próbówki, zakręcić i wirować 5 min. przy 1000 obr./min.
 - e. po zlaniu nadsącza komórki zawiesić w 2 ml płynu hodowlanego i policzyć w komorze Bürkera (UWAGA: komórki nie mogą być w agregatach!).

3. Do 3 probówek odpipetować objętość płynu zawierającą odpowiednio: 10, 50 i 100 tysięcy komórek, uzupełnić pożywką do 2 ml, a następnie dodać 3 ml uprzednio przygotowanego 0.5% agaru. Wymieszać i po 2 ml roztworu przenieść na szalki z zestalonym 0.5% agarem.
4. Szalki z komórkami ostrożnie przenieść do inkubatora. Hodowlę prowadzić przez 7 dni w temperaturze 37 °C i w atmosferze 5% CO₂.
5. Policzyc kolonie o średnicy większej niż 100 µm oraz ocenić wydajność klonowania (tj. stosunek liczby kolonii do liczby wysianych komórek).

Zakres materiału obowiązujący do ćwiczeń:

1. Molekularne podstawy transformacji nowotworowej i tworzenia przerzutów.
2. Hodowle komórek *in vitro*.
3. Oddziaływanie komórek z podłożem i sąsiednimi komórkami, wzrost komórek na podłożach stałych i półpłynnych.

Zalecana literatura:

B. Alberts. Podstawy biologii komórki. PWN 2005. rozdz. 21.
J. Kawiak i in. Podstawy cytofizjologii. PWN 1995, rozdz. 29.
B. Alberts. Molecular Biology of the cell. Garland Science 2002, rozdz. 23.