

PODSTAWY BIOLOGII KOMÓRKI

Propagacja linii komórkowych *in vitro*

Wstęp

Jedną z najczęściej stosowanych we współczesnej biologii technik laboratoryjnych są hodowle komórkowe *in vitro*. Strategia ta oparta jest na inkubacji, względnie namnażaniu komórek roślinnych i zwierzęcych poza organizmem. Jedną z największych korzyści płynących ze stosowania techniki hodowli komórkowych jest możliwość ścisłego kontrolowania warunków doświadczalnych i stosunkowa łatwość modyfikacji właściwości mikrośrodowiska komórek poprzez aplikację substancji biologicznie czynnych (np. hormonów, czynników wzrostowych, białek macierzy zewnątrzkomórkowej itd.), celem wszechstronnych analiz ich aktywności biologicznej.

Stosowanie hodowli komórek *in vitro* umożliwia prowadzenie całych cykli doświadczeń przy użyciu takiego samego materiału biologicznego oraz stwarza warunki do porównywania wyników badań prowadzonych przez różne pracownie. Spore znaczenie mają również uwarunkowania ekonomiczne, gdyż eksperymenty wykorzystujące komórki hodowane *in vitro* są z reguły tańsze od analogicznych doświadczeń prowadzonych na zwierzętach doświadczalnych. Nie oznacza to jednak, że techniki *in vitro* w pełni zastępują techniki *in vivo*, gdyż należy pamiętać, że komórki w hodowlach przebywają w warunkach dla nich sztucznych, a więc ich reakcje na zadany bodziec również mogą być „sztuczne”, czyli ilościowo i jakościowo odbiegające od tych potencjalnie obserwowanych w warunkach *in vivo*. Ponadto w zależności od pochodzenia, populacje komórek w hodowlach mogą mieć charakter mniej lub bardziej heterogeny, co również może mieć przełożenie na wynik doświadczenia i jego interpretację. Oznacza to, że analizy *in vitro* i *in vivo* mają charakter wzajemnie dopełniający się (komplementarny).

Z drugiej strony przy użyciu technik *in vitro* można przeprowadzać bardzo wiele doświadczeń z wykorzystaniem strategii trudnych technicznie lub niemożliwych do wykonania *in vivo*, na przykład analizy migracji pojedynczych komórek, określenie zależności wzrostu i różnicowania komórek od typu białka macierzy międzykomórkowej, kwantyfikacja komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych lub oznaczenie fazy cyklu komórkowego, w której nastąpiło zatrzymanie proliferacji komórek pod wpływem danej substancji biologicznie aktywnej.

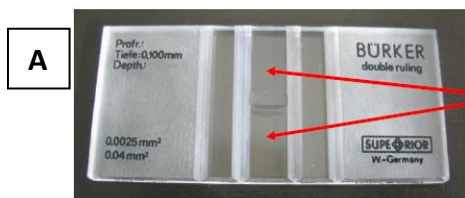
Celem proponowanego doświadczenia jest zapoznanie się z podstawowymi czynnościami związanymi z prowadzeniem hodowli komórkowych.

Hodowle komórkowe – metodyka

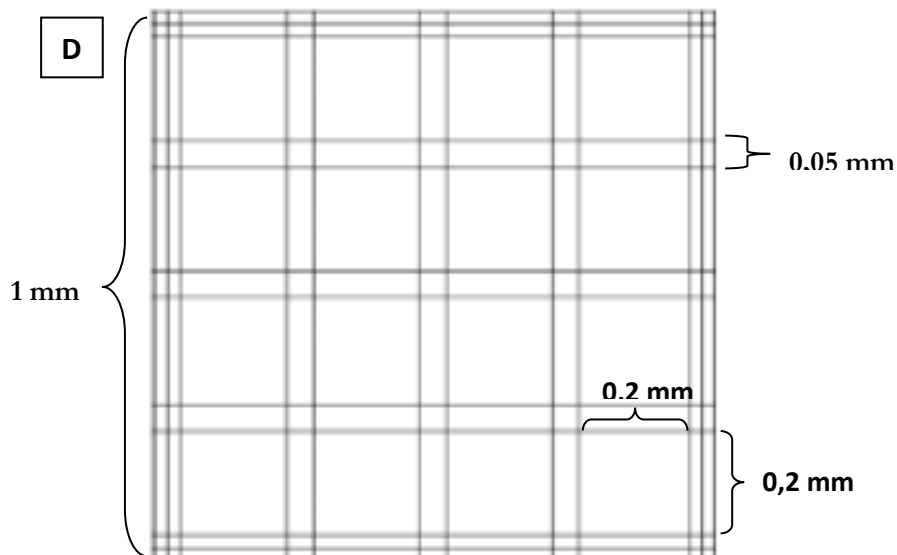
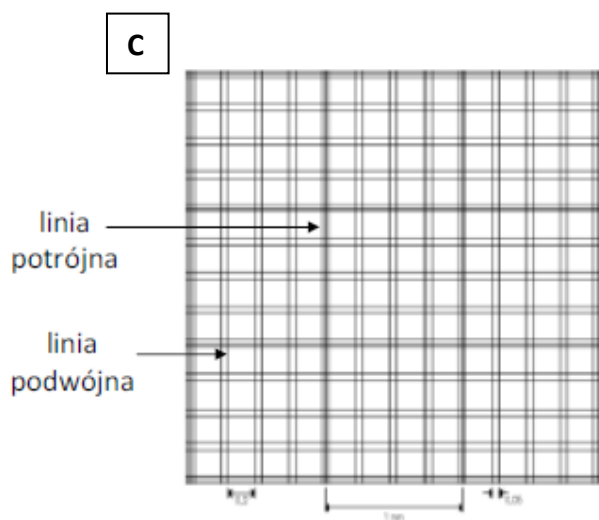
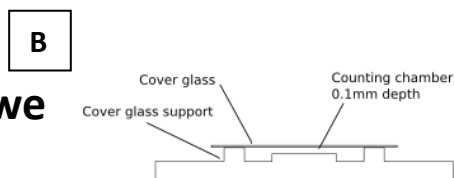
W hodowlach *in vitro* przetrzymywać można zarówno komórki aktywnie namnażające się jak i komórki terminalnie zróżnicowane, które zwykle zatraciły zdolność do proliferacji. O ile w drugim przypadku metodyka hodowli sprowadza się do izolacji specyficznej tkankowo i jednolitej fenotypowo populacji komórek i umiejętnej jej inkubacji *in vitro*, o tyle komórki aktywnie namnażające się, a więc dysponujące potencjałem mitotycznym, można propagować *in vitro*, zapewniając im warunki hodowli korzystne dla proliferacji. Dzięki temu jesteśmy w stanie namnażać materiał biologiczny potrzebny do doświadczeń, przy zachowaniu jego cech fizjologicznych. W przypadku hodowli komórek dzielących się, a więc aktywnych mitotycznie, podstawową czynnością umożliwiającą namnożenie materiału biologicznego potrzebnego do doświadczeń jest tzw. PASAŻ, czyli przeniesienie komórek z jednego naczynia hodowlanego do jednego lub kilku następnych. Łączy się to z redukcją liczby komórek przypadającej na pole powierzchni naczynia (np. komórki prawidłowe - hamowane kontaktowo), lub objętość pożywki (np. komórki nowotworowe hodowane w zawiesinie).

Komora Bürkera

Komora składa się z dwóch siatek zliczeniowych (A), a każda tworzona jest przez dziewięć wielkich kwadratów ograniczonych trzema liniami (bok kwadratu wynosi 1 mm)(C). Głębokość komory wynosi 0,1 mm (B). Pojedynczy wielki kwadrat zawiera w sobie szesnaście dużych kwadratów ograniczonych podwójną linią, przy czym bok kwadratu wynosi 0,2 mm (D). Wielki kwadrat zawiera w sobie także dziewięć małych kwadratów ograniczonych pojedynczą linią, których bok wynosi 0,05 mm.



Siatki zliczeniowe



Wykonanie ćwiczenia

1. Podzielić się na 4 zespoły.
2. Przeczytać przed ćwiczeniami niniejszą instrukcję.
3. Wysłuchać uważnie co prowadzący ma do powiedzenia na temat ogólnych zasad pracy z hodowlami.
4. Zapoznać się rozkładem przestrzennym komór laminarnych (w tym: z rozmieszczeniem i przeznaczeniem akcesoriów, t.j. pipet, końcówek, pojemników na zlewki, wacików, alkoholu do odkażania, naczyń hodowlanych, probówek, pożywek i innych roztworów niezbędnych do pasażu itp.)
5. Wykonać **pasaż komórek** hodowanych w otrzymanym naczyniu:
 - a. **ocenić liczebność komórek** w hodowli pod mikroskopem odwróconym, jak również obserwując „pod światło” dno naczynia hodowlanego
 - b. z naczynia **zlać płyn hodowlany** po czym natychmiast:
 - c. delikatnie **zalać komórki** ok. 2 ml **roztworu PBS**, przepłukać je, po czym roztwór usunąć i natychmiast:
 - d. **komórki zalać** ok. 1 ml **roztworu 0.25% trypsyny z EDTA** (trypsynę rozprowadzić dokładnie po całym dnie naczynia), komórki inkubować w obecności trypsyny od 20 sekund do 2 minut, kontrolując („pod światło” lub pod mikroskopem) stopień odrywania się komórek od podłoża (ewentualnie naczynie wstrząsnąć celem przyspieszenia procesu).

Uwaga: czas trypsynizacji zależy od aktywności trypsyny i typu oraz „kondycji” komórek !!!

- e. **natychmiast po oderwaniu się komórek** od podłoża (obserwowanym „pod światło” lub w mikroskopie odwróconym), komórki zawiesić w 2 ml **pożywki hodowlanej** (MEM + **5% surowicy cielęcej** + antybiotyki), aby rozcieńczyć i zainaktywować trypsynę
- f. uzyskaną zawiesinę komórek w pożywce **przenieść pipetą do probówki wirowniczej**, zamknąć i **zwirować** 5 min. przy 300 rcf (ok. 1000 obr./min).
- g. po odwirowaniu **nadsącz zlać, osad komórek (pelet) zalać** 0,5-2 ml **świeżej pożywki**, a komórki dokładnie lecz **delikatnie rozpipetować**
- h. **oznaczyć gęstość zawiesiny komórek** w komorze Bürkera (wedle schematu uzgodnionego wcześniej w obrębie zespołów)
- i. do naczynia hodowlanego odpipetować 5 ml pożywki hodowlanej, a następnie dodać zawiesinę komórek w objętościach zawierających liczbę komórek wskazaną przez asystenta;
- j. naczynia zakręcić, podpisać i pozostawić w inkubatorze, w 37°C.

Zakres materiału obowiązujący do ćwiczeń

- biologia i charakterystyka hodowli *in vitro*
- środowisko hodowlane *in vitro*
- linie komórkowe
- procedura pasażu
- oznaczanie gęstości komórek w zawiesinie z wykorzystaniem hemocytometru (komora Bürkera)

Proponowana literatura

1. „Hodowla komórek i tkanek” pod redakcją Stanisławy Stokłosowej; rozdział 1, 2, 5 i 6.
2. „Metody badań budowy i funkcji komórek”. SEMINARIA Z CYTOFIZJOLOGII pod redakcją J.Kawiaka i M.Zabła. 2002; rozdz 14, str 364-9;
3. „Oddziaływanie komórek z podłożem i sąsiednimi komórkami”. PODSTAWY CYTOFIZJOLOGII pod redakcją J Kawiaka i wsp.. 1998. str. 488-504
4. Materiały zawarte w instrukcjach do ćwiczeń.
5. „Cell culture basics” Handbook Gibco-Invitrogen (dla zainteresowanych)

Pomocne strony

- <https://www.thermofisher.com/pl/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>
- <https://www.youtube.com/watch?v=kbhQ29vRqs4>
- <https://www.youtube.com/watch?v=cyJ2zUbLMMo>
- <https://www.youtube.com/watch?v=WWS9sZbGj6A>
- <https://www.youtube.com/watch?v=wPeNK0pRlPA&t=74s>