

Fizjologiczne Techniki Badań

Technika hodowli komórek leukemicznych

Zasady prowadzenia hodowli komórek leukemicznych, pasażowania, mrożenia, rozmrażania i przechowywania komórek leukemicznych

Warunki wstępne:

Zapoznanie się z treścią rozdziałów 6 i 11 zawartych w książce „Hodowla komórek i tkanek” pod redakcją Stanisławy Stokłosowej, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.

Wstęp:

Hodowle komórkowe są powszechnie wykorzystywanymi modelami w badaniach procesów fizjologicznych i patologicznych zachodzących na poziomie komórki. Jedną z największych korzyści płynących ze stosowania techniki hodowli komórkowych jest możliwość ścisłego kontrolowania warunków doświadczalnych i łatwość modyfikacji mikrośrodowiska komórek.

Hodowla komórek *in vitro* wymaga przede wszystkim zachowania sterylnych warunków (zastosowanie komory z laminarnym przepływem powietrza), środowiska o stałej optymalnej temperaturze i wilgotności, stałym stężeniu CO₂ (inkubatory przeznaczone do hodowli komórek), a także zapewnienia komórkom niezbędnych do życia oraz proliferacji składników odżywczych (pożywki hodowlane).

W hodowlach *in vitro* można przetrzymywać zarówno komórki aktywnie namnażające się, jak i komórki terminalnie zróżnicowane, które utraciły zdolność do proliferacji. Komórki leukemiczne należą do komórek aktywnie namnażających się, których wzrost zachodzi w zawiesinie (komórki zawiesinowe). W przypadku prowadzenia hodowli komórek leukemicznych, intensywnie dzielących się, podstawową czynnością jest tzw. pasaż. Pasażowanie komórek leukemicznych umożliwia prowadzenie hodowli i namnażanie materiału biologicznego potrzebnego do wykonywania doświadczeń. Komórki rosnące w zawiesinie pasażuje się, bezpośrednio pobierając je z wyjściowej hodowli i rozcieńczając w odpowiednim stosunku w świeżo sporządzonej pożywce. Określanie gęstości komórek utrzymywanych w hodowli *in vitro* jest niezbędne przed wykonaniem pasażowania i planowania poszczególnych doświadczeń oraz przed ich zamrażaniem. Gęstość zawiesiny komórek można ustalić poprzez policzenie komórek w mikroskopie świetlnym w komorze

hemocytometru (np. komora Bürkera) lub przy zastosowaniu licznika komórek (np. Coulter Counter).

Możliwość długotrwałego przechowywania komórek w obniżonej temperaturze, oprócz prowadzenia hodowli ciągłych, pozwala na systematyczne wykonywanie doświadczeń. Celem przechowywania zamrożonych linii komórkowych jest ich zabezpieczenie przed kontaminacją mikroorganizmami, czy zminimalizowanie ryzyka różnicowania fenotypowego komórek.

Stosowane procedury zamrażania i rozmrażania różnią się nieco w zależności od rodzaju materiału biologicznego, ale wszystkie zachowują pewne ogólne zasady. Najważniejszą z nich jest zasada powolnego zamrażania i szybkiego rozmrażania komórek. W celu zminimalizowania uszkodzeń komórek w trakcie ich powolnego zamrażania niezbędne jest stosowanie substancji ochronnych, tzw. krioprotektantów (dimetylosulfotlenek - DMSO, glicerol). Proces przechowywania materiału biologicznego w temperaturze między -79°C a -196°C nazywa się krioprezerwacją.

Kultury komórkowe *in vitro* / komórki linii leukemicznych są zamrażane i przechowywane w bankach komórek, zwykle w ciekłym azocie w temperaturze -196°C . Najbardziej znanymi i największymi bankami komórek na świecie są: Europejska Kolekcja Zwierzęcych Kultur Komórkowych – ECACC, (ang. European Collection of Animal Cell Cultures) i Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych – ATCC (ang. American Type Culture Collection).

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z podstawowymi zasadami i czynnościami związanymi z prowadzeniem hodowli komórek leukemicznych i przygotowywaniem zawiesiny komórek do planowanych doświadczeń, a także technikami zamrażania i rozmrażania komórek leukemicznych.

Opis procedur:

UWAGA! Wszystkie czynności wykonujemy w rękawiczkach!

- odpowiednie przygotowanie stanowiska pracy jest podstawowym warunkiem koniecznym do spełnienia - przed rozpoczęciem pracy z komórkami linii leukemicznych

- należy wysterylizować stanowisko pracy: włączyć lampy UV w komorach laminarnych na 15 minut;

1. Prowadzenie hodowli komórek leukemicznych

1 A). Przygotowywanie pełnego medium hodowlanego w warunkach sterylnych

- wykonać obliczenia objętości odczynników potrzebnych do przygotowania 10 ml pełnej pożywki: pożywka hodowlana dla komórek leukemicznych zawiera 90% medium RPMI 1640, 10% cielęcej surowicy płodowej, 2 mM L-glutaminy* oraz 0.2% AAS (roztwór antybiotyków: penicyliny, streptomycyny i amfoterycyny B).

* Masa molowa L-glutaminy: 146.1 g. Obliczyć ilość mg glutaminy potrzebnej do sporządzenia 4 mM roztworu L-glutaminy oraz przeliczyć jaką objętość roztworu L-glutaminy należy dodać do pożywki hodowlanej.

- w komorze laminarnej przygotować 10 ml sterylnej pełnej pożywki hodowlanej

1 B). Określenie gęstości komórek leukemicznych w zawiesinie

- określić liczbę komórek leukemicznych w komorze Bürkera pod mikroskopem;
- przygotować komorę Bürkera;
- napełnić komorę zawiesiną komórek, wlewając 10 µl zawiesiny komórek leukemicznych na jedną siatkę komory Bürkera; komórki pobieramy bezpośrednio z naczynka hodowlanego;
- liczyć komórki leżące wewnątrz kwadratów o boku 1/20 mm zgodnie z zasadą dwóch boków; wykonać dwa pomiary z dwóch siatek komory, przy powiększeniu 40x.
- obliczyć gęstość zawiesiny komórek, wyrażoną w ilości komórek w przeliczeniu na 1 ml pełnego medium hodowlanego, z następującego wzoru:

$$c = n / v$$

gdzie: c – gęstość zawiesiny komórek,
n – średnia liczba komórek,
v - objętość komory.

1 C). Pasażowanie komórek

- obliczyć, w jakich proporcjach rozcieńczyć zawiesinę komórek, aby otrzymać gęstość 150 000 komórek / ml (do pasażu) lub 500 000 komórek/ ml pełnego medium hodowlanego (do zakładania doświadczenia);

- wykonać procedurę pasażu komórek: - odciągnąć określoną objętość zawiesiny komórek za pomocą sterylnej pipety, a następnie nalać pożądaną ilość świeżej pełnej pożywki do naczynia hodowlanego;
- umieścić naczynka hodowlane z zawiesiną komórek leukemicznych w inkubatorze (37°C, 5% CO₂).

Przed otwarciem naczynia z przygotowanym medium hodowlanym, należy to naczynie przetrzeć 70% etanolem;

2. Procedura zamrażania komórek leukemicznych:

- konieczne jest określenie gęstości komórek w zawiesinie przy pomocy komory Bürkera;
- przygotować medium do mrożenia; np. 100 µL DMSO + 900 µL zawiesiny komórkowej
- przenieść zawiesinę komórek do krioprobówki;
- pozostawić probówki z zawiesiną komórkową w lodówce w temperaturze +4°C na 45 minut
- probówki ze schłodzoną zawiesiną komórek umieścić w styropianowym pudełku i zamrażać w temperaturze -20°C przez 2 godz.
- następnie probówki z zawiesiną komórek przenieść do zamrażarki z temperaturą -80°C na 24 godz., a następnie zamrożone komórki linii leukemicznej umieścić w ciekłym azocie (-196°C).

3. Procedura rozmrażania zawiesiny komórek leukemicznych:

- krioprobówki zawierające zamrożone komórki umieścić w łaźni wodnej ogrzanej do temperatury 37°C i delikatnie mieszać aż do całkowitego rozmrożenia; unikać całkowitego zanurzenia krioprobówek w wodzie w celu uniknięcia ewentualnej kontaminacji;
- rozmrożoną zawiesinę komórek przenieść jak najszybciej do probówki wirówkowej i dodać zimnej pożywki hodowlanej;
- odwirować zawiesinę komórek - 1000 obr./min. w temp. 4°C przez 5 min;
- następnie zlać nadsącz, a uzyskaną peletkę komórek leukemicznych delikatnie zawiesić w 2 ml pełnej pożywki hodowlanej;
- zawiesinę komórek przenieść do naczynia hodowlanego i uzupełnić 3 ml pełnej pożywki hodowlanej;

- naczynka hodowlane z zawiesiną komórek leukemicznych umieścić w inkubatorze (37°C, 5% CO₂).

Wymagania:

- student zna zasady prowadzenia hodowli komórek zawiesinowych;
- student potrafi wyjaśnić do czego służy proces krioprezerwacji oraz wymienić i scharakteryzować stosowane krioprotektanty;
- student zna zasadę i potrafi omówić procedury zamrażania i rozmrażania linii komórkowych.

Literatura:

1. Hans G. Drexler "Isolation and Culture of Leukemia Cell Lines". Methods in Molecular Medicine 88: 141-155, 2004.
2. R. Ian Freshney "Basic Principles of Cell Culture" in: Gordana Vunjak-Novakovic and R. Ian Freshne "Culture of Cells for Tissue Engineering". John Wiley & Sons, Inc., 2006.