

Zakład Endokrynologii, ćwiczenie 15 „Metoda hodowli organotypowej - technika perfuzji”

prorowadzenie: dr hab. Jerzy Galas ,

Zakład Endokrynologii, Instytut Zoologii, pokój 1.85

mail: jerzy.galas@uj.edu.pl

1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia realizowanego w ramach kursu Fizjologiczne Techniki badań WBNZ-126, jest zapoznanie studentów z jedną z technik prowadzenia hodowli organotypowych – techniką perfuzji. Jest to nowoczesna metoda inkubacji, polegająca na ciągłym obmywaniu pożywką tkanki lub fragmentu narządu umieszczonego w specjalnej komorze perfuzyjnej. Metodą tą hodzi się małe narządy w całości lub wycinki większych oraz fragmenty tkanek. Jej zaletą jest, w odróżnieniu od hodowli komórkowych, zachowanie *in vitro* integralności strukturalnej narządu z interakcjami komórkowymi i zróżnicowaniem histologicznym, biochemicznym i czynnościowym. Dzięki temu jest modelem najbardziej zbliżonym do stanu tkanki lub narządu *in vivo*.

2. Izolacja i hodowla pęcherzyków jajnikowych (1 stanowisko)

W pierwszej kolejności do perfuzji stosuje się bufor fosforanowy z jonami Ca^{+2} i Mg^{+2} . Kolejno, stosuje się medium hodowlane np. Eagle’a lub M199.

Sprzęt	Materialy i odczynniki
• aparat perfuzyjny • łaźnia wodna; • komora z laminarnym przepływem powietrza; • inkubator z dopływem CO_2; • pipety; • narzędzia chirurgiczne.	1. Bufory do perfuzji: Bufor fosforanowy z jonami Ca^{+2} i Mg^{+2}, pH 7.0 3. Płyn hodowlany: - Medium Eagle’a (Sigma) - ew. czynniki doświadczałe np. hCG, FSH (Sigma)

2. Wykonanie ćwiczenia

Przed przystąpieniem do wykonywania ćwiczeń z komórkami:

1. Załóż fartuch laboratoryjny;
2. Przygotuj miejsce do pracy - oczyść powierzchnię 70% alkoholem lub Aerodesinem;
3. Umyj ręce mydłem i płynem odkażającym;
4. W czasie pracy w komorze laminarnej zakładaj rękawiczki lateksowe;

Przygotowanie do hodowli narządowej - perfuzja:

1. Zwierzę należy poddać narkozie (AErran, Baxter), dokonać otwarcia jamy brzusznej, wypreparować jajniki;
2. Wypreparować na jałowych szalkach Petriego pojedyncze pęcherzyki jajnikowe;
3. Ustalić tempo przepływu medium hodowlanego przez komorę perfuzyjną;
4. Umieścić wypreparowane pęcherzyki jajnikowe w komorze perfuzyjnej;
5. Dopełnić komorę medium hodowlanym;
6. Zbierać medium hodowlane do naczyniek hodowlanych, celem dalszych oznaczeń RIA.

3. Wymagania:

Student powinien znać najważniejsze zasady techniki hodowli komórek i tkanek, znać jej zastosowanie zarówno w badaniach naukowych, jak i praktyce klinicznej. Student powinien umieć zdefiniować podstawowe typy kultur narządowych i opisać uwarunkowania podstawowych procesów morfogenetycznych i fizjologicznych zachodzących w tych kulturach. Student powinien umieć wykonać zadania laboratoryjne w zakresie zakładania i prowadzenia hodowli organotypowych.