

MACIEJ PILAREK
EDYTA CHABER
KRZYSZTOF W. SZEWCZYK

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Perfluorowane układy do hodowli komórek zwierzęcych

Wprowadzenie

Izolowane komórki zwierzęce hodowane w warunkach *in vitro* znajdują szereg zastosowań w biotechnologii oraz w różnych gałęziach nauk biomedycznych. Komórki linii ciągłych są wykorzystywane do produkcji przeciwwirusowych szczepionek oraz przeciwciał monoklonalnych [1]. Ponadto stale poszerza się zakres diagnostycznych aplikacji medycznych komórek zwierzęcych hodowanych w warunkach *in vitro* [1, 2]. W przemyśle kosmetycznym do badań toksykologicznych wykorzystuje się tzw. modele *in vitro*, przybliżające strukturę tkanek lub organów na które działają związki biologicznie czynne stanowiące dodatki do baz kosmetycznych [3].

Tradycyjną techniką hodowli komórek adherentnych jest hodowla na stałych powierzchniach takich jak ścianki polistyrenowych naczyń hodowlanych oraz mikro- lub mikroporowate nośniki. W takich układach wzrost komórek następuje do momentu osiągnięcia tzw. stanu konfluencji czyli pełnego pokrycia powierzchni naczynia pojedynczą warstwą komórek. Nieliczne doniesienia literaturowe wskazują na możliwość hodowli adherentnych komórek zwierzęcych także na powierzchni międzyfazowej utworzonej pomiędzy dwiema niemieszającymi się fazami ciekłymi [4, 5]. Wykorzystywane do tego celu były rafinowane oleje silikonowe oraz perfluoroalkany które tworzą dwufazowe układy z wodnym roztworem pożywki hodowlanej. Z uwagi na wysoką rozpuszczalność gazów oddechowych (tlenu i ditlenku węgla) zastosowanie inertnych perfluorozwiązków wydaje się interesującym rozwiązaniem modyfikującym sposób hodowli komórek adherentnych. Faza perfluorowana może bowiem zostać dodatkowo wykorzystana jako ciekły nośnik tlenu intensyfikujący wymianę masy w układzie hodowlanym [5–7].

Celem pracy było zbadanie przydatności perfluorodekaliny do prowadzenia hodowli adherentnych komórek zwierzęcej linii MG-63 na powierzchni międzyfazowej ciecz/ciecz.

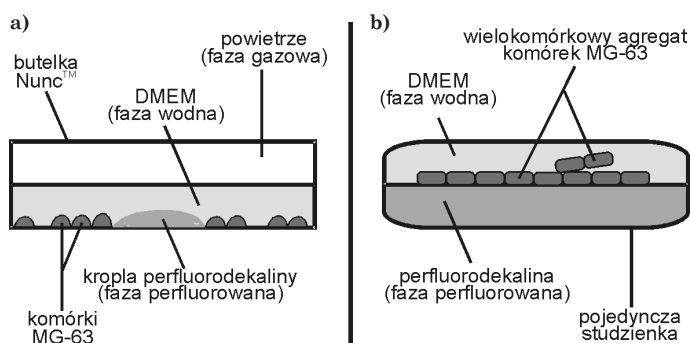
Materiały i metodyka badań

PFC. Do wytworzenia powierzchni międzyfazowej ciecz-ciecz użyto perfluorodekaliny ($C_{10}F_{18}$; ABCR GmbH & Co. KG, Niemcy). Związek ten wykazuje się wysoką rozpuszczalnością tlenu (do $490 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{dm}^3 \text{ PFC}$) oraz ditlenku węgla (do $1500 \text{ cm}^3 \text{ CO}_2 / \text{dm}^3 \text{ PFC}$). Całkowite wysycenie szkieletu węglowego cząsteczki zapewnia perfluorodekalinie inertność chemiczną a także brak mieszalności z układami wodnymi oraz lipidami. Celem zapewnienia aseptycznych warunków wzrostu komórek roślinnych, perfluoroalkan był sterylizowany termicznie (121°C , 15 min.) przed użyciem w hodowli. Po sterylizacji, schłodzona do 37°C perfluorodekalina była nasy-

cana powietrzem atmosferycznym (15 min.) a jałowość zapewniało zastosowanie filtru o średnicy porów $0,45 \mu\text{m}$.

Komórki MG-63 i warunki ich hodowli. Hodowano adherentne komórki zwierzęce ciągłej linii MG-63. Stanowią je komórki ludzkiego mięsaka kościopochodnego (*Osteosarcoma*). Materiał biologiczny wykorzystywany w badaniach pochodził z banku komórek Zakładu Biofizyki i Fizjologii Człowieka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Komórki MG-63 były hodowane w głębnie w pożywce DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) wzbogaconej o płodową surowicę cielęcą (10%), L-glutaminę (1%) oraz preparat antybakteryjny/antygrzybiczny (1%). Surowica była dodawana po uprzedniej dwustopniowej inaktywacji termicznej ($52^\circ\text{C}/15 \text{ min.}$, $56^\circ\text{C}/30 \text{ min.}$). Wszystkie używane składniki medium hodowlanego zakupiono w firmie *Invitrogen* (USA). Hodowle komórek prowadzono w termostatowanym inkubatorze (37°C ; 5% CO_2). Pasażowanie komórek wykonywano przed osiągnięciem przez nie stanu konfluencji. Po etapie trypsynizacji (0,25% trypsyna), komórki przemywano buforem fosforanowym (1% PBS) i ustalano żadaną gęstość inokulum.

Perfluorowane układy do hodowli komórek. Hodowle komórek linii MG-63 prowadzone były w dwóch układach badawczych (Rys. 1). W pierwszym z nich komórki rosły na 25 cm^2 powierzchni stałej butelek do hodowli komórkowych firmy *Nunc* (Dania) na której znajdowały się krople jałowej, napowietrzanej perfluorodekaliny o sumarycznej objętości 2 cm^3 . Objętość zaszczepionego komórkami medium hodowlanego wynosiła 10 cm^3 . Układ perfluorowany drugiego typu stanowiły 24-dołkowe ($24 \times 3,5 \text{ cm}^3$) płytki hodowlane firmy *Nunc* (Dania). Do poszczególnych studzienek dodawano nasyconą powietrzem atmosferycznym perfluorodekalinę (1 lub 2 cm^3 w zależności od serii doświadczeń) oraz inokulowane komórkami MG-63 medium hodowlane ($1,2 \text{ cm}^3$). Brak mieszalności fazy perfluorowanej i wodnej powodował wytworze-



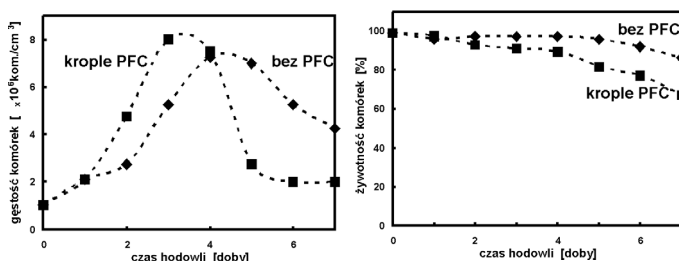
Rys. 1. Schemat perfluorowanych układów do hodowli komórek MG-63; a) stała powierzchnia z kroplami perfluorodekaliny; b) powierzchnia międzyfazowa perfluorodekalina/pożywka

nie się powierzchni międzyfazowej pomiędzy perfluoroalkanem i pożywką. W obu badanych perfluorowanych układach hodowlanych, próbnymi kontrolnymi były hodowle bez dodatku napowietrzony perfluorodekaliny.

Metody analityczne. Analiza żywotności hodowanych komórek polegała na selektywnym wybarwieniu wodnym roztworem (1%) błękitu trypanu komórek zamierających lub martwych. Po zmieszaniu równych objętości płynu hodowlanego i roztworu barwnika, wykorzystując hemocytometr *Malasseza* (*Brand*, Niemcy) sporządzano preparat mikroskopowy, który następnie analizowano (powiększenie 20×) przy użyciu mikroskopu odwróconego pola typu *Eclipse TS-100/F* firmy *Nikon* (Japonia). Żywotność komórek (*CV*) liczono jako ułamek komórek żywych (niewybarwionych) w ogólnej liczbie wszystkich komórek (wybarwionych i niewybarwionych). Hemocytometr *Malasseza* oraz mikroskop odwróconego pola służyły także do wyznaczenia gęstości komórek w hodowli wyznaczanej jako ilość komórek w 1 cm³ medium hodowlanego.

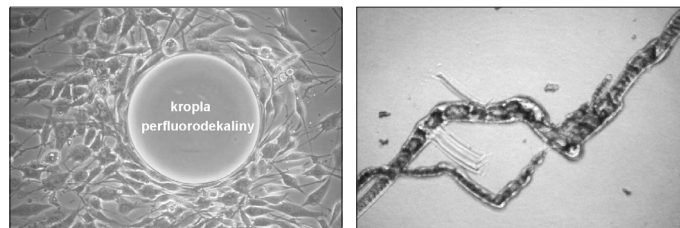
Wyniki badań i dyskusja

Na rys. 2a porównano gęstości komórek MG-63 hodowanych na powierzchni stałej w obecności kropeł napowietrzony perfluorodekaliny oraz w hodowli kontrolnej bez dodatku fazy perfluorowanej. Po pasażach komórki rosące w pożywce zawierającej napowietrzony perfluorozwiązek zaadaptowały się szybciej niż komórki MG-63 w kontrolnym układzie hodowlanym i już po pierwszej dobie osiągnęły fazę wzrostu wykładniczego. W porównywanych układach hodowlanych zaobserwowano różne wartości maksymalnej gęstości komórek w hodowli. Komórki MG-63 rosące w obecności kropeł napowietrzony fazy perfluorowanej wcześniej osiągały maksymalną gęstość i jej wartość była wyraźnie wyższa w porównaniu z hodowlą kontrolną. Prawdopodobnie jest to efektem wyższego stężenia tlenu rozpuszczonego w fazie wodnej w hodowlach zawierających krople ciekłego nośnika tlenu. Uzyskanie większej liczby komórek w jednostce objętości medium hodowlanego w czasie krótszym niż w hodowlach kontrolnych skutkowało szybszym zużywaniem składników pożywki w hodowlach o większej gęstości. Efektem był znacznie intensywniejszy spadek gęstości komórek w układzie z fazą perfluorowaną oraz niższa gęstość komórek podczas ostatniego dnia hodowli. Na rys. 2b przedstawiono zmiany żywotności komórek MG-63 oznaczanej w porównywanych hodowlach.



Rys. 2. Porównanie gęstości (a) oraz żywotności (b) komórek linii MG-63 hodowlanych na powierzchni stałej w obecności kropeł napowietrzony perfluorodekaliny i w układzie kontrolnym

Do czwartej doby nie zauważono istotnych zmian w żywotności. Natomiast spadek żywotności komórek obserwowany dla dłuższych czasów prowadzenia hodowli w układzie z fazą perfluorowaną związany jest ze spadkiem gęstości komórek



Rys. 3. Komórki linii MG-63 hodowane w badanych układach perfluorowanych (powiększenie 160×): a) hodowla na powierzchni stałej w obecności kropeł napowietrzony PFC, b) hodowla na powierzchni perfluorodekalina/pożywka

i wcześniejszym osiągnięciem przez nie stacjonarnej fazy wzrostu a następnie wejściem komórek MG-63 w fazę zamierania.

Na rys. 3 przedstawiono mikroskopowe fotografie komórek linii MG-63 hodowanych w dwóch badanych układach. Wyhodowane komórki znacznie różniły się kształtem i morfologią. Komórki linii MG-63 hodowane w standardowych warunkach na powierzchni stałej przyjmują regularne, wrzecionowate kształty fibroblastów i są równomiernie rozmieszczone na powierzchni naczynia hodowlanego [7]. Komórki rosące na powierzchni stałej w obecności kropeł napowietrzony perfluorodekaliny przyjmowały bardziej nieregularne, gwiaździste kształty i nierównomiernie ulegały adhezji na powierzchni naczynia hodowlanego. Największe zagęszczenie komórek zaobserwowano wokół kropeł perfluorozwiązku i w tych miejscach komórki MG-63 dzieliły się najintensywniej. Zasadniczą różnicę w morfologii komórek zaobserwowano w przypadku ich hodowli na powierzchni międzyfazowej PFC/pożywka. Przez pierwsze dwie doby rozproszone komórki o kulistym kształcie rosły zawieszony na granicy faz nie rozplaszczając się i nie ulegając adhezji do powierzchni międzyfazowej. W trzecim dniu hodowli zaobserwowano tendencję do tworzenia przez komórki MG-63 długich, liniowych, wielokomórkowych agregatów. Zmiana kształtu hodowanych komórek na bardziej płaski i rozciągnięty biegunowo wskazywała na adhezję komórek zachodzącą nie tylko względem siebie, lecz także na ich adhezję do powierzchni międzyfazowej perfluorodekalina/pożywka.

Wnioski

Uzyskano wyższe wartości gęstości komórek MG-63 w hodowlach na powierzchni stałej prowadzonych w obecności kropeł napowietrzony perfluorodekaliny. Okazało się, że adherentne komórki linii MG-63 są także zdolne do wzrostu na powierzchni międzyfazowej utworzonej przez fazy perfluorowaną i wodną. Uzyskiwane w takich układach długie, wielokomórkowe agregaty komórek MG-63 znacznie różnią się morfologicznie od komórek hodowanych w standardowych warunkach na stałej powierzchni.

LITERATURA

1. *M. Butler*: Appl. Microbiol. Biotechnol., **68**, 283 (2005).
2. *H. Thomson*: TIBTECH, **25**, 224 (2007).
3. *Y. Poumay, A. Coquette*: Arch. Dermatol. Res., **298**, 361 (2007).
4. *Y. Shiba, T. Ohshima, M. Sato*: Biotech. Bioeng., **57**, 583 (1998).
5. *C. Rappaport*: In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal, **39**, 187 (2003).
6. *M. Pilarek, K.W. Szewczyk*: Biotechnologia, **69**, 125 (2005).
7. *M. Pilarek, K.W. Szewczyk, E. Chaber*: Acta Biochim. Polon., **4s**, 54 (2008).