

Martyna BRZEZIŃSKA¹, Iwona GRABOWSKA², Katarzyna DĄBKOWSKA¹, Maciej PILAREK¹

e-mail: pilarek@ichip.pw.edu.pl

¹ Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa² Zakład Cytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Układ typu ciecz/ciecz jako alternatywna metoda hodowli przestrzennej komórek adherentnych

Wstęp

Hodowle komórek zwierzęcych prowadzone w warunkach *in vitro* są podstawowym narzędziem eksperymentalnym w wielu dziedzinach nauk biomedycznych. Pełne zrozumienie i zbadanie interakcji zachodzących zarówno pomiędzy komórkami w hodowli, jak również między komórkami a badanymi materiałami (np. polimerowymi rusztowaniami) czy substancjami (np. ksenobiotykami) wymaga dokładnego odwzorowania skomplikowanych struktur przestrzennych występujących w tkankach i organach. W przypadku standardowych hodowli komórkowych problem stanowi ograniczenie wynikające ze wzrostu komórek w postaci monowarstwy, które uniemożliwia przestrzenne odwołanie kontaktów komórek. W wielu przypadkach aplikacja hodowli *in vitro* komórek zwierzęcych, pożądane są warunki zapewniające wzrost w formie przestrzennie zorganizowanych agregatów komórek, sferoidów czy też zintegrowanych warstw komórek [Lin i Chang, 2008; Stokłowska, 2004].

W ramach udoskonalania technik prowadzenia przestrzennych hodowli komórek zwierzęcych uznaje się, że duży potencjał aplikacyjny w tym zakresie wykazują ciekłe perfluorozwiązki PFC oraz układy typu ciecz-ciecz (*liquid/liquid culture system*) [Pilarek i in., 2011a; Rappaport, 2003]. Ciekłe związki perfluorowane charakteryzują się wysoką rozpuszczalnością gazów oddechowych (tlenu i ditlenku węgla), a także biochemiczną i termiczną inertnością. Przeprowadzone w ostatnich latach badania dotyczące wpływu perfluorowanych nośników gazów oddechowych na komórki zwierzęce dowodzą, że związki te są dodatkami bezpiecznymi i nietoksycznymi [Pilarek i in., 2011a; Rappaport, 2003; Shiba i in., 1998]. Zastosowanie perfluorozwiązków w hodowlach komórkowych pozytywnie wpływa na efektywność hodowli przez skrócenie fazy adaptacji, wydłużenie fazy wzrostu wykładniczego oraz osiągnięcie wyższych gęstości komórek. Dodatkowo związki perfluorowane nie mieszają się z fazą wodną tworząc oddzielną fazę. Umożliwia to prowadzenie hodowli komórek adherentnych na powstałej powierzchni międzyfazowej ciecz-ciecz (czyli PFC /pożywka). W porównaniu z warunkami panującymi *in vivo*, komórki hodowane w ciekłym układzie dwufazowym nie wykazują zmienionej morfologii wywołanej adhezją do stałego podłoża tak jak ma to miejsce w przypadku standardowych hodowli monowarstwowych, w których komórki ulegają znacznemu rozplaszczeniu [Pilarek i in., 2011a; Rappaport, 2003]. Hodowle komórkowe prowadzone w układach ciecz/ciecz wykorzystujących ciekłe perfluorozwiązki są uznawane za nowatorskie, a dane literaturowe dotyczące tego zagadnienia, zwłaszcza te odnoszące się do ilościowej charakterystyki wzrostu komórek w układach tego typu, są bardzo ograniczone.

Celem badań było określenie wpływu ciekłego perfluorozwiązku na hodowlę agregatów mysich komórek macierzystych ES (*Embryonic System cells*) prowadzoną w układzie dwóch faz ciekłych: PFC/pożywka a także ocena przydatności układu ciecz-ciecz do hodowli kul zarodkowych z mysich komórek macierzystych.

Materiały i metody

Perfluorozwiązek. W badaniach wykorzystano perfluorodekalinę (*ABCR GmbH*, Niemcy). Ten syntetyczny, inertny biochemicznie związek w układach wielofazowych tworzy odrębną fazę perfluorowaną. Perfluorodekalinę charakteryzuje się wysoką rozpuszczalnością gazów oddechowych (19,2 $\mu\text{M O}_2 \text{ mL}^{-1}$; 70,1 $\mu\text{M CO}_2 \text{ mL}^{-1}$), a opisywany

w literaturze brak toksycznego oddziaływania na organizmy żywe spowodował, że związek ten znajduje coraz szersze zastosowanie w dziedzinach biomedycznych [Pilarek i in., 2011a; Pilarek i in., 2011b]. Porcje perfluorodekalinę sterylizowano termicznie i po schłodzeniu natleniano w sterylnych warunkach.

Linie komórkowe. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano agregaty komórek ES (tzw. kule zarodkowe), które pochodziły z kolekcji *Zakładu Cytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego*. Niezróżnicowane komórki ES uzyskano z blastocyst myszy. Te pluripotentne komórki posiadają zdolność do różnicowania się we wszystkie typy komórek występujące w danym organizmie [Ciemerch, 2008]. W pierwszych etapach komórki ES hodowano na warstwie inaktywowanych mitomycyną C mysich zarodkowych fibroblastów MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*).

Pożywki do hodowli komórek. Skład pożywek do hodowli komórek wykorzystywanych w badaniach przedstawiony został w tab. 1. Pożywki i suplementy pochodziły z *Life TechnologiesTM*, *Gibco[®]* (USA). Podstawę podłoża do hodowli komórek odżywczych MEF stanowiła żywka *KnockOutTM DMEM (KO-DMEM)* natomiast do hodowli komórek ES użyto podłoża *DMEM+GlutaMAX[®]*. Czynniki przeciwbiałaczkowy LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) pochodził z firmy *Chemicon (Merck Millipore, Niemcy)*.

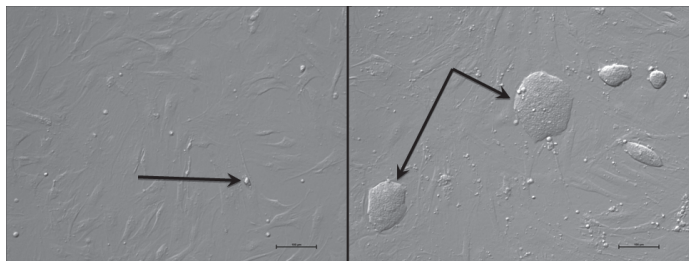
Tab. 1. Skład pożywek wykorzystywanych do hodowli komórek ES i MEF.

Składnik	ES	MEF
	[mL]	
DMEM (4,5 g glukozy L ⁻¹) + GlutaMAX [®]		500
KnockOut TM DMEM	250	
FCS (ang. foetal calf serum) (15%)	37,5	55
PenStrep (po 0,05 U mL ⁻¹ penicyliny/streptomycyny)	2,75	5,5
roztwór aminokwasów endogennych (10 mM)	2,75	
L-glutamina (200 mM)	2,75	
czynnik LIF ESGRO [®] (10 ⁷ U)	500 U mL ⁻¹ (14 μL)	
β -merkaptopoetanol (14,3 M)	0,002	

Warunki hodowli komórek. Pierwszy etap hodowli komórek ES stanowiło namnożenie niezróżnicowanych komórek macierzystych rosnących w postaci kolonii na odżywczej warstwie fibroblastów MEF. Dodatek czynnika LIF zapobiegał różnicowaniu się komórek ES i stymulował je do podziałów. Komórki po 7 dobach hodowli odklejano od naczyń hodowlanych przez kilkuminutowe trawienie trypsyną (0,05% trypsyny w roztworze EDTA). Działanie trypsyny blokowano przez dodanie tej samej objętości kompletnej pożywki do hodowli. Po wirowaniu komórki ES zawieszono (2,67·10⁴ komórek mL⁻¹) w pożywce bez dodatku czynnika LIF. Uzyskaną zawiesinę komórek ES przenoszono na szalki *Petriego* w formie wiszących kropli. W kroplach tworzyły się kule zarodkowe, w których komórki spontanicznie różnicują w komórki budujące listki zarodkowe. Przebieg procesu *in vitro* odzwierciedlał zmiany zachodzące w zarodku rozwijającym się w warunkach *in vivo*. Po 5 dobach hodowli, pojedyncze kule zarodkowe przenoszono na powierzchnię naczyń hodowlanych pokrytych żelatyną (hodowle kontrolne) oraz do naczyń 24-dółkowych zawierających żywka i natlenioną (10,08 $\mu\text{M O}_2 \text{ mL}^{-1}$) perfluorodekalinę (układ ciecz/ciecz).

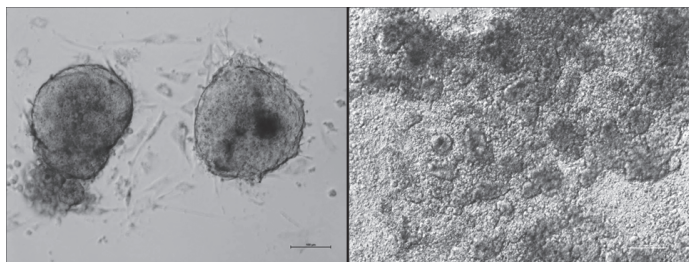
Wyniki badań i ich dyskusja

Na rys. 1 przedstawiono obraz mikroskopowy mysich zarodkowych komórek macierzystych w hodowli na warstwie MEF.



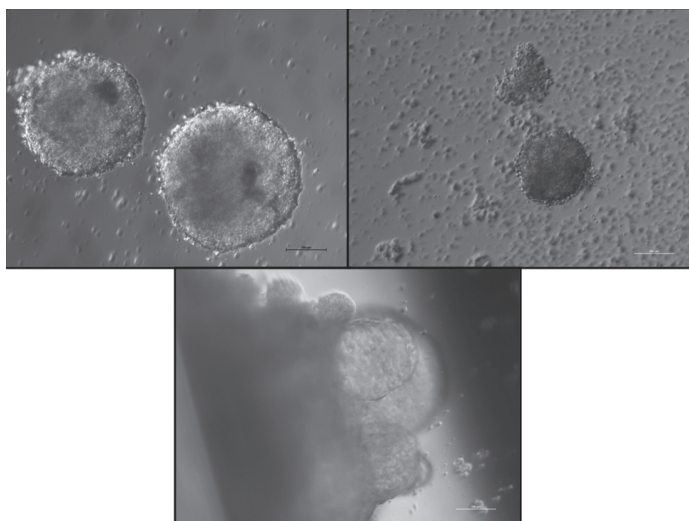
Rys. 1. Kolonie mysich komórek macierzystych na warstwie MEF (zaznaczone strzałkami), od lewej: po 24 h i po 96 h hodowli

Hodowle kul zarodkowych, w obu porównywanych układach hodowlanych (na powierzchni stałej oraz w układzie ciecz/ciecz), prowadzono przez 13 dób. Na rysunku 2 przedstawiono fotografie mikroskopowe kul zarodkowych otrzymanych w hodowli kontrolnej prowadzonej w warunkach standardowych, na stałej powierzchni polistyrenowej pokrytej warstwą żelatyny ułatwiającej komórkom adhezję. Komórki tworzące kule zarodkowe spontanicznie różnicowały w różne typy komórek, głównie w komórki endodermy.



Rys. 2. Morfologia kul zarodkowych hodowanych w standardowych warunkach na powierzchni stałej pokrytej warstwą żelatyny (hodowla kontrolna), od lewej: pierwsza i dziesiąta doba hodowli

Na rys. 3 przedstawione zostały wyniki hodowli kul zarodkowych prowadzonych w układzie ciecz/ciecz. Przez cały okres hodowli nie zaobserwowano różnicowania komórek macierzystych tworzących kule. Morfologia komórek w układzie ciecz/ciecz pozostawała niezmienną, przy czym jednocześnie nie wykazywały one żadnych cech typowych dla komórek apoptycznych czy też nekrotycznych.



Rys. 3. Morfologia kul zarodkowych hodowanych w układzie ciecz/ciecz, u góry od lewej: pierwsza i dziesiąta doba hodowli; poniżej: kula zarodkowa po adhezji do powierzchni stałej ściany bocznej naczynia hodowlanego

Siły fizyczne oddziałujące na zawieszona na powierzchni międzyfazowej perfluorodekalina/pożywka agregaty komórek macierzystych

sprawiały, że kule zarodkowe wykazywały tendencję do przemieszczania się w kierunku ścian bocznych naczynia wielodokowego, gdzie następowała ich adhezja do stałej powierzchni. W tych przypadkach natychmiast następował intensywny rozrost agregatu w osi pionowej (zarówno po stronie medium hodowlanego, jak i po stronie fazy perfluorowanej), który znacznie utrudniał obserwacje mikroskopowe i prowadzenie dokumentacji fotograficznej. Kule zarodkowe, które przez cały czas trwania eksperymentu znajdowały się na powierzchni międzyfazowej bez kontaktu ze ścianami naczynia pozostawały przez cały czas niezmienną, tzn. nie zaobserwowano podziałów komórek, przyrostu biomasy agregatu ani żadnych symptomów różnicowania komórek tworzących kule zarodkowe. Wydaje się, że hodowla kul zarodkowych w układzie ciecz/ciecz z wykorzystaniem perfluorodekaliny może znacznie przedłużyć żywotność tego specyficznego materiału biologicznego i utrzymać go prawdopodobnie w stanie niezróżnicowanym, co jest niemożliwe w przypadku hodowli tradycyjnej wykorzystującej wiszące krople. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji nie da się w jednoznaczny sposób stwierdzić czy komórki hodowane w układzie ciecz/ciecz nie różnicowały. Wymaga to bowiem przeprowadzenia bardziej szczegółowych badań (np. immunolokalizacji, RT-PCR), które pozwoliłyby określić jakie markery charakterystyczne dla komórek pluripotentnych i różnicujących ulegają ekspresji w kulach zarodkowych.

Podsumowanie i wnioski

Na podstawie wyników hodowli mysich komórek macierzystych w postaci kul zarodkowych przeprowadzonych w układzie ciecz/ciecz i po odniesieniu uzyskanych wyników do danych pochodzących z hodowli kontrolnych (na stałej powierzchni) sformułować można następujące wnioski:

- na powierzchni międzyfazowej uzyskanej w układzie perfluorodekalina/pożywka możliwe jest prowadzenie przestrzennej hodowli adherentnych mysich zarodkowych komórek macierzystych;
- hodowla kul zarodkowych w układzie dwóch niemieszających się faz z wykorzystaniem perfluorodekaliny pozwala znacznie wydłużyć żywotność agregatów komórek macierzystych i prawdopodobnie utrzymać je w stanie niezróżnicowanym;
- agregaty komórek macierzystych hodowane w postaci kul zarodkowych w układzie ciecz/ciecz charakteryzują się morfologią analogiczną do agregatów tego typu hodowanych w wiszącej kropli;
- kule zarodkowe hodowane w układzie ciecz/ciecz zbudowane są z żywych komórek, które po kontakcie ze stałą powierzchnią ulegały adhezji i proliferowały;
- w układzie hodowlanym ciecz/ciecz możliwe jest pasażowanie agregatów w sposób, który nie niszczy złożoności i wielowymiarowości ich struktury.

LITERATURA

- Ciemerych A.M., 2008. Zarodkowe komórki macierzyste – w poszukiwaniu pluripotencji *Postępy Biologii Komórki* 35, 183-205
- Lin R.Z., Chang H.Y., 2008. Recent advantages in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research *Biotechnol. J.* 3, 1172-1184. DOI: 10.1002/biot.200700228
- Pilarek M., Kaczmarczyk M., Olak S., Grabowska I., Szewczyk K.W., 2011a. Cultures of 3-D aggregated mammalian cells in a two-phase liquid/liquid system containing perfluorinated carrier of respiratory gases *Acta Biochim. Polonica*. 58, 4s, 5
- Pilarek M., Glazyrina J., Neubauer P., 2011b. Enhanced growth and recombinant protein production of *E.coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures *Microb. Cell Factories* 10, 50. DOI:10.1186/1475-2859-10-50
- Rappaport C., 2003. Progress in concept and practice of growing anchorage-dependent mammalian cells in three dimension *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 39, 5, 187-192. DOI: 10.1290/1543-706X(2003)039<0187:RICAPO>2.0.CO;2
- Shiba Y., Ohsima T., Sato M., 1998. Growth and morphology of anchorage-dependent animal cells in a liquid/liquid interface system *Biotechnol. Bioeng.* 57, 5, 583-589. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980305)57:5<583::AID-BIT10>3.0.CO;2-D
- Stokłowska S., 2004. *Hodowle komórek i tkanek*. PWN, Warszawa.