

Ćwiczenie 4-10

Analiza cytotoksyczności biomateriałów

1. Wyposażenie laboratorium hodowli komórkowych

1.1. Sprzęt

Poniżej przedstawiono podstawowy sprzęt obecny w laboratorium hodowli komórkowych:

- **komora laminarna** – przestrzeń przeznaczona do pracy w warunkach sterylnych, wykonywane są tu wszystkie operacje na rosnących komórkach, dzięki zamontowanym wewnątrz komory filtrom powietrze dostarczane do wnętrza komory jest sterylne, należy pamiętać o spryskiwaniu roztworem etanolu wszelkich pojemników umieszczanych w komorze oraz o odpowiednim zasadach pracy (więcej w sekcji „Praca w warunkach jałowych”)



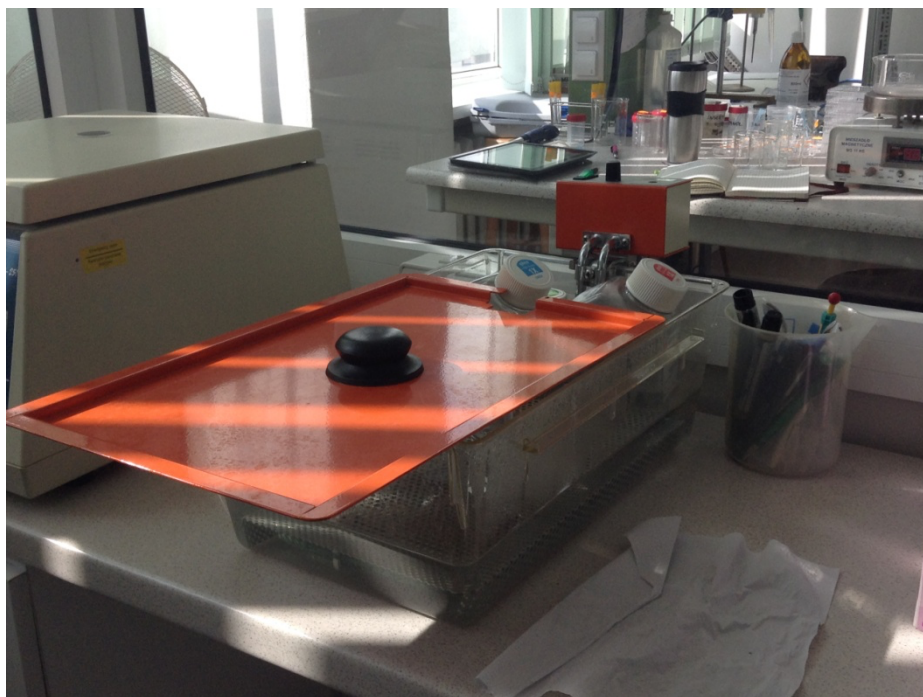
- **inkubator** – jego funkcją jest zapewnienia odpowiednich warunków wzrostu dla umieszczonych w nim komórek (wilgotność, pH, temperatura)



- **mikroskop odwróconego pola** – umożliwia obserwacje mikroskopowe komórek rosnących wewnątrz naczyń hodowlanych



- **łaźnia wodna** – umożliwia podgrzewanie roztworów używanych w trakcie hodowli (bufory, media) do temperatury 37°C



- **wirówka** – wirowanie komórek prowadzi do ich oddzielenia od medium hodowlanego, co jest wykorzystywane np. podczas pasażu
- **zamrażarka** – przechowywanie komórek w temperaturze -70°C
- **pojemniki z ciekłym azotem (dewary)** – długotrwałe przechowywanie komórek w temperaturze ok. -180°C
- **autoklaw** – służy do sterylizacji sprzętu, roztworów, odpadów

1.2. Plastik laboratoryjny

W trakcie prowadzenia hodowli komórkowych, oprócz przedstawionego powyżej sprzętu laboratoryjnego, konieczne jest stosowanie naczyń hodowlanych. Są to sterylne naczynia, najczęściej polistyrenowe, o odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni, umożliwiającej adhezję i wzrost komórek.

Najpopularniejszymi naczyniami hodowlanymi są:

- Butelki i szalki hodowlane – charakteryzują się dużą powierzchnią wzrostu, stosowane do namnażania komórek

NANOTECHNOLOGIA MEDYCZNA - LABORATORIUM

Inżynieria produktów nanostrukturalnych

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 4-10



- Płytki wielodołkowe – dostępne w różnych wariantach, najczęściej 6-, 12-, 24-, 48-, 96-dołkowe, na ogół służą do przeprowadzania konkretnych eksperymentów, rzadziej do namnażania komórek, umożliwiają przeprowadzenie wielu eksperymentów jednocześnie, przy wykorzystaniu małej powierzchni (w każdym dołku inny eksperyment)



W odróżnieniu od pracy w tradycyjnym laboratorium, w trakcie pracy w warunkach sterylnych płyny nie są przelewane bezpośrednio z pojemników, ale są przenoszone w sposób jałowy, przy użyciu:

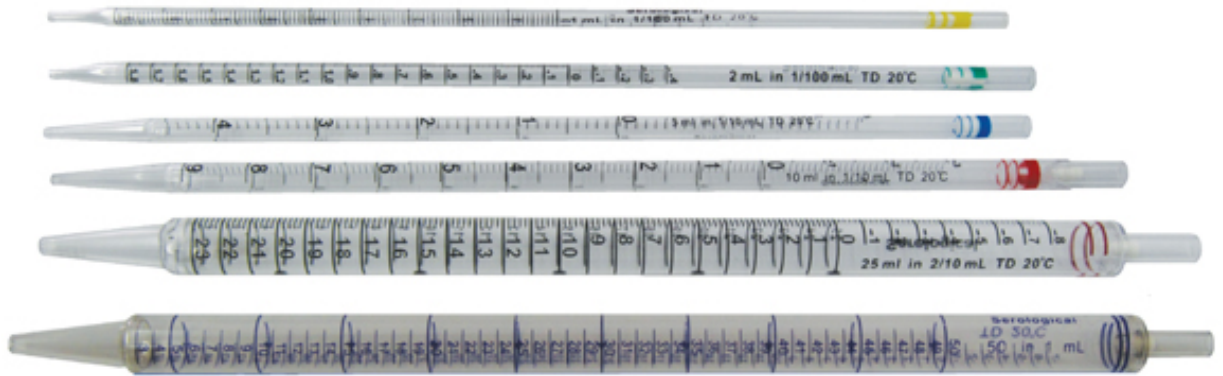
- sterylnych pipet serologicznych

NANOTECHNOLOGIA MEDYCZNA - LABORATORIUM

Inżynieria produktów nanostrukturalnych

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 4-10



- Pipetora



- Pipet automatycznych jedno- i wielokanałowych



2. Media hodowlane

W trakcie trwania hodowli i wykonywania wszelkich czynności hodowane komórki przetrzymywane są w płynach zapewniających odpowiednie środowisko. Dwa podstawowe roztwory stosowane w trakcie hodowli komórkowych to:

- **bufory** – najczęściej bufor fosforanowy (PBS), zapewnia podstawowe środowisko, służy do przepłukiwania komórek i ich krótkotrwałego przechowywania, zawiera jony wapnia, magnezu, potasu, sodu
- **media hodowlane**

Funkcje medium hodowlanego:

- zapewnia wszelkie substancje odżywcze i regulatorowe konieczne do prawidłowego rozwoju komórek w trakcie trwania hodowli
- utrzymuje stałe pH
- zapewnia odpowiednie ciśnienie osmotyczne

Podstawowy skład medium hodowlanego:

- **aminokwasy** – źródło węgla i azotu, na ogół są obecne w medium, wyjątek stanowi glutamina – ze względu na niską stabilność w środowisku wodnym najczęściej jest dodawane do medium tuż przed rozpoczęciem eksperymentów

- **glukoza** – źródło energii
- **witaminy, hormony**
- **sole mineralne** – buforowanie środowiska
- **surowica** – najczęściej bydlęca (FBS – ang. *fetal bovine serum*), źródło czynników wzrostu, hormonów, czynników adhezyjnych, czynników regulujących przepuszczalność błony komórkowej
- **antybiotyki** – ograniczają ryzyko zakażeń biologicznych
- **czerwień fenolowa** – wskaźnik pH

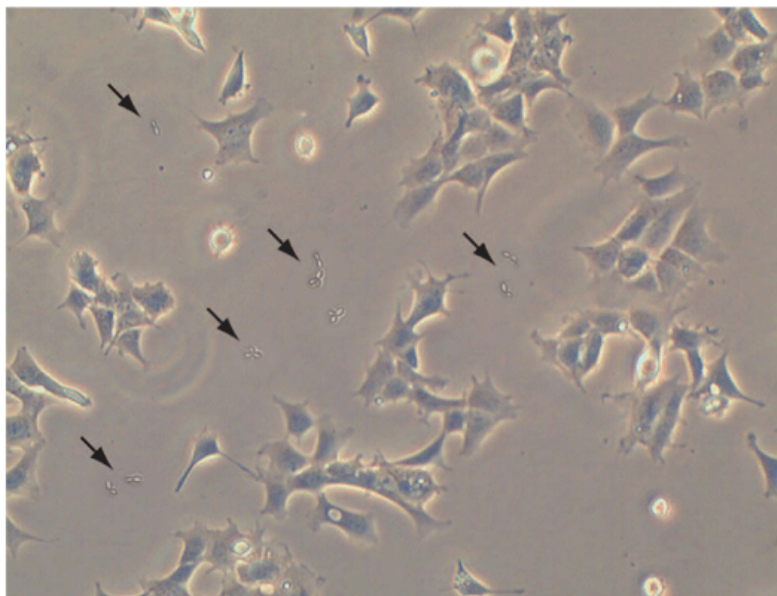
Odpowiednie pH jest bardzo ważnym parametrem podlegającym kontroli. Jak wspomniano wcześniej, większość komórek ssaczy wykazuje optimum wzrostu przy pH neutralnym (7,4). Utrzymanie pH na tym poziomie możliwe jest dzięki odpowiedniemu balansowi pomiędzy stężeniem CO₂ rozpuszczonym w medium hodowlanym a stężeniem jonów wodorowęglanowych. Dlatego konieczne jest dokładne zapoznanie się ze składem stosowanego medium – niektóre media zawierają zwiększone stężenie jonów HCO₃⁻, wówczas należy prowadzić hodowlę przy wyższym stężeniu CO₂ w inkubatorze.

Kontrola pH w trakcie trwania hodowli możliwa jest dzięki obecności w medium hodowlanym wskaźnika pH. Najczęściej jest to czerwień fenolowa – barwnik ten zmienia swój kolor w zależności od pH roztworu, przyjmując barwę żółtą w pH kwaśnym, czerwoną w pH neutralnym i fioletową w pH zasadowym.

3. Zakażenia biologiczne

Największym problemem w trakcie prowadzenia hodowli komórkowych jest ryzyko zakażeń biologicznych. Zakażenia są związane z rozwojem drobnoustrojów (najczęściej bakterii) w medium hodowlanym. Aby zminimalizować ryzyko rozwoju bakterii media suplementuje się **antybiotykami**, konieczne jest również zachowanie wszelkich **zasad pracy obowiązujących w laboratorium czystym**.

Każdorazowo po wyjęciu hodowli z inkubatora i przed przystąpieniem do jakichkolwiek czynności należy **sprawdzić** czy nie doszło do zakażenia poprzez obserwacje makro- (sprawdzenie przejrzystości medium, w przypadku gdy dochodzi do zakażenia medium pokrywa się widocznym gołym okiem biofilmem, dochodzi też do zmętnienia pożywki) i mikroskopowe (bakterie są widoczne pod mikroskopem, należy jednak pamiętać że są znacznie mniejszych rozmiarów niż komórki zwierzęce, rys.1).



Rys. 1: Hodowla, w której doszło do zakażenia bakteryjnego; strzałami zaznaczono bakterie.

Każdorazowo w przypadku stwierdzenia wystąpienia zakażenia należy zaprzestać dalszej hodowli i usunąć zakażoną hodowlę.

4. Praca w warunkach jałowych

Podczas pracy w warunkach sterylnych należy zawsze być świadomym potencjalnych źródeł zakażeń - kurz, włosy, ręce, ubranie. Dlatego należy mieć zawsze umyte ręce, związanie włosy oraz założony fartuch. Wszelkie skaleczenia, zadrapania, zranienia na dłoniach i przedramionach należy zabezpieczyć plastrem. Przedstawione poniżej zasady obowiązują w każdym laboratorium hodowli komórkowych i mają na celu zminimalizowanie ryzyka zakażeń biologicznych prowadzonych hodowli.

Przykładowa organizacja pracy w komorze laminarnej obejmuje (patrz zdjęcie poniżej):

- dużą przestrzeń w centralnej części komory laminarnej przeznaczoną do pracy z komórkami,
- części ze sterylnymi odczynnikami i sprzętem po prawej stronie; znajduje się tam automatyczny pipetor z brzegu, sterylne pipety, butelki z reagentami i medium hodowlanym w głębi po prawej stronie,
- stojak na próbówki może zostać umieszczony na środku w głębi (nie dla komór z poziomy przepływem powietrza),

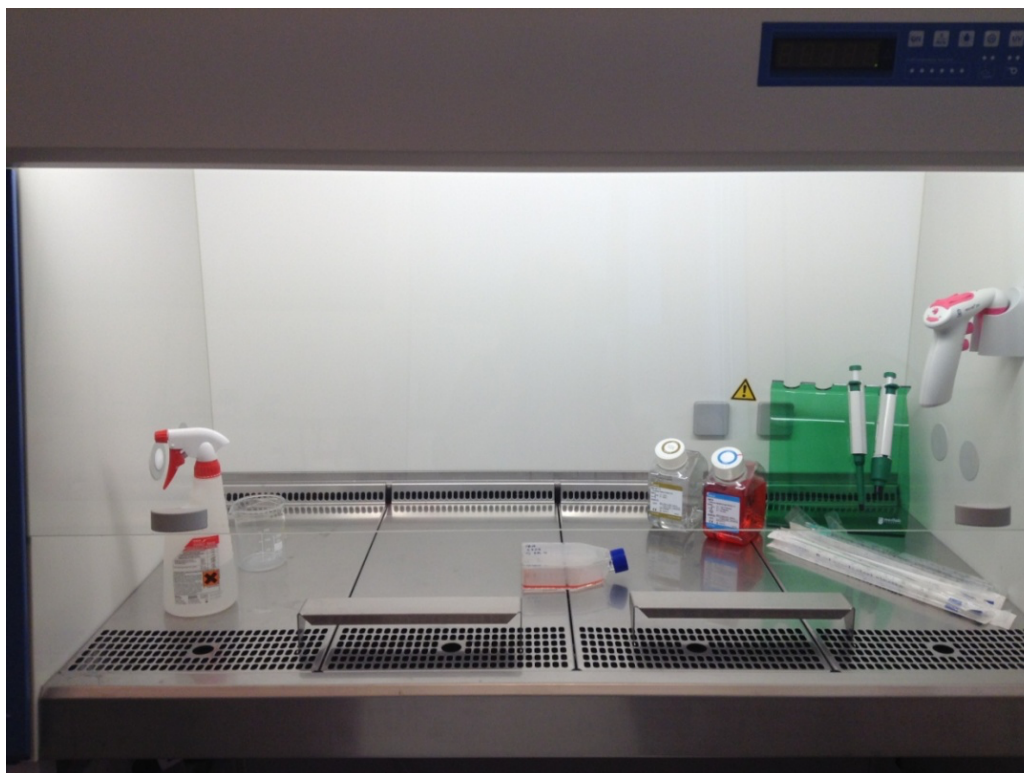
NANOTECHNOLOGIA MEDYCZNA - LABORATORIUM

Inżynieria produktów nanostrukturalnych

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 4-10

- część ze zużytymi roztworami, opakowaniami, pipetami po lewej (zlewka na zużyte płyny w głębi po lewej, zużyte pipety, opakowania z przodu (zanim zostaną usunięte z komory laminarnej)
- pojemnik z 70% roztworem alkoholu po lewej stronie na brzegu



Podczas sterylnej pracy należy:

- nosić odzież ochronną,
- odkazić ręce/rękawiczki 70% roztworem alkoholu, po czym pozwolić mu odparować, czynność tę powtórzyć każdorazowo po wyjęciu rąk z komory laminarnej,
- wszystkie przedmioty umieszczane w komorze laminarnej wcześniej spryskać 70% EtOH
- pojemniki hodowlane umieszczać w komorze laminarnej jako ostatnie,
- wszystkie butelki, pojemniki hodowlane odpowiednio podpisać i oznaczyć,
- otwierać sterylne pipety, roztwory bezpośrednio przed użyciem,
- wszystkie czynności wykonywać w centralnej części komory laminarnej,
- wykonywać płynne i spokojne ruchy,
- wszystkie czynności wykonywać na wyprostnych ramionach,
- ograniczyć czas pracy do koniecznego minimum,
- często usuwać wszystkie zużyte opakowania,

NANOTECHNOLOGIA MEDYCZNA - LABORATORIUM

Inżynieria produktów nanostrukturalnych

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 4-10

- każdy rozlany płyn od razu wytrzeć i spryskać to miejsce 70% roztworem alkoholu,
- unikać prowadzenia rozmów,
- sprawdzić czy wszystkie butelki są odpowiednio zamknięte przed wyjęciem ich z komory laminarnej
- pracować z jedną linią komórkową

Podczas sterylnej pracy nie wolno:

- dotykać powierzchni znajdujących się poza komorą
- kichać, kasłać w pobliżu komory laminarnej,
- przenosić pojemników i butelek za szyjki lub nakrętki,
- pracować nad odkrytymi butelkami i płytkami,
- pozostawiać odkryte butelki ze sterylną zawartością,
- przelewać płynów bez użycia sterylnej pipety,
- dotknąć końcem pipety lub tipsów niesterylnych powierzchni (szyjki butelki, zewnętrzne powierzchnie butelek)
- pobierać roztwory z różnych butelek tą samą pipetą,
- napełniać butelek, płytek hodowlanych i probówek wirówkowych po brzegi,
- tworzyć pęcherzy powietrza w medium hodowlanym i pipetach.

Przed przystąpieniem do pracy w komorze laminarnej należy:

- sprawdzić czy wszystkie urządzenia działają poprawnie i czy ich parametry są właściwie,
- sprawdzić czy wszystkie drzwi i okna są zamknięte,
- przygotować wszystkie niezbędne odczynniki i pojemniki, które będą potrzebne podczas pracy

Przed wykonaniem jakichkolwiek czynności na hodowli komórkowej

należy dokonać obserwacji makro- i mikroskopowych:

- pH medium hodowlanego (kolor medium)
- ilość komórek pływających w medium hodowlanym, stopień konfluencji
- kształt komórek,
- przejrzystość medium hodowlanego

Zapoznanie ze sprzętem używanym w pomieszczeniu czystym

Suplementacja medium hodowlanego

Założenie hodowli

Obserwacje mikroskopowe

Przygotowanie próbek materiałów do testów cytotoksyczności

Przygotowanie medium hodowlanego - dodatek suplementów

Sprzęt:

- pipetor automatyczny
- sterylne pipety serologiczne
- sterylna moczówka 100 ml (x3)

Odczynniki:

- DMEM (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) – medium hodowlane
- FBS (ang. *fetal bovine serum*) - płodowa surowica bydlęca
- roztwór glutaminy
- mieszanina antybiotyków penicylina – streptomycyna (Pen-Strep)
- PBS z jonami magnezu i wapnia
- PBS bez jonów magnezu i wapnia

Wykonanie ćwiczenia:

1. Ogrzać wykorzystywane roztwory do temperatury 37°C
2. Przenieść roztwory do komory laminarnej (wcześniej spryskać roztworem alkoholu)
3. Do sterylnej moczówki o objętości 120 ml dodać odpowiednią objętość roztworu FBS (aby uzyskać stężenie 10% v/v)
4. Dodać odpowiednią objętość roztworu glutaminy (aby uzyskać stężenie 1%v/v)
5. Dodać odpowiednią objętość roztworu penicylina-streptomycyna (aby uzyskać stężenie 1%v/v)
6. Uzupełnić medium hodowlanym DMEM do objętości 100ml
7. Wymieszać roztwór
8. Przygotować 100ml PBS (z jonami oraz bez) w sterylnej moczówce
9. Wszystkie pojemniki z roztworami podpisać (data, nazwisko, rodzaj roztworu)
10. Po skończonej pracy roztwory dokładnie zamknąć i umieścić w lodówce.

Rozmrażanie komórek i wysiew do naczynia hodowlanego

Sprzęt:

- pipetor automatyczny
- sterylne pipety serologiczne (tzw. "pasterówki")
- sterylne naczynie hodowlane – butelka 75cm²
- sterylny falkon o objętości 15 ml
- kriotuba z zamrożonymi komórkami

Odczynniki:

- suplementowane medium hodowlane

Wykonanie ćwiczenia:

1. Ogrzać medium hodowlane do temperatury 37°C
2. Przygotować butelkę hodowlaną – napełnić medium w objętości 5ml i umieścić w inkubatorze
3. Rozmrozić komórki przy użyciu łaźni wodnej lub inkubatora (w przypadku użycia łaźni wodnej należy uważać, aby woda nie dostała się do wnętrza kriotuby) - rozmrażanie powinno trwać jak najkrócej (do 2 minut)
4. Przenieść kriotubę z komórkami do komory laminarnej i spryskać roztworem alkoholu
5. Przenieść komórki z kriotuby do falkonu
6. Do falkonu z komórkami dodać 5 ml medium hodowlanego (dodawać kroplami)
7. Zwirować komórki (dla fibroblastów: czas wirowania 10 minut, szybkość obrotów 192 RCF)
8. Odpipetować supernatant ze zwirowanych komórek
9. Zawiesić komórki w 2 ml świeżego medium hodowlanego
10. Roztwór komórek przenieść do naczynia hodowlanego, dopełnić medium do objętości 15ml
11. Obejrzyć komórki pod mikroskopem
12. Umieścić naczynie w inkubatorze

Przygotowanie i zapakowanie insertów do sterylizacji, wycięcie materiałów

Sprzęt:

- końcówki do pipet (żółte)
- skalpel
- wycinaki

Wycinka insertów oraz materiałów o zadanej średnicy.

Sterylizacja insertów i pęset.

Przygotowanie i sterylizacja materiału

Pasaż komórek

Przygotowanie płytek testowych

Przygotowanie i sterylizacja próbek polimeru:

Sprzęt i materiały:

- próbki mat włóknistych w kształcie koła o zadanej średnicy
- sterylna płytka 48-dołkowa
- sterylne pęsety i inserty (obcięte końcówki do pipet)
- falkon 15ml

Roztwory i odczynniki

- roztwór penicyliny i streptomycyny
- roztwór amfoterycyny
- roztwór PBS
- roztwór etanolu
- suplementowane medium hodowlane DMEM

Wykonanie:

1. Wycięte próbki materiałów umieścić w dołkach płytki 48-dołkowej
2. Materiały zalać roztworem etanolu (200 μ m/dołek, 20 minut), umieścić na wytrząsarce
3. Obliczyć objętość reagentów potrzebną do zalania wszystkich materiałów (200 μ l/dołek) roztworem AMS (AMS – ang. *antimicrobial solution*) zawierającym 0,25 μ g/ml amfoterycyny, 100U/ml pen, 100 μ g/ml strep /PBS, przygotować roztwór
4. Usunąć roztwór etanolu, materiały przepłukać roztworem PBS, (200 μ l/dołek), 5x, 5 minut, wytrząsarka (UWAGA – unikać wysychania materiałów – możliwie jak najszybciej zalewać kolejnym roztworem)
5. Po ostatnim płukaniu usunąć roztwór PBS, materiały zalać roztworem AMS, umieścić w lodówce na 2h
6. Po czasie inkubacji materiały przepłukać sterylnym PBS, 3x 5 min., wytrząsarka
7. Materiały zalać 300 μ l PBS, płytkę owinąć parafilmem i umieścić w lodówce

Pasaż komórek adherentnych

Sprzęt:

- butelka 75cm² z rosnącymi komórkami

Roztwory:

- suplementowane medium hodowlane
- PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺
- roztwór trypsyny (0,25%)

Wykonanie ćwiczenia:

11. Ogrzać wykorzystywane roztwory do temperatury 37°C
12. Ocenić stan hodowanych komórek (obserwacja mikroskopowa)
13. W komorze laminarnej usunąć medium hodowlane
14. Przepłukać komórki 2x PBSem bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺
15. Do naczynia hodowlanego dodać 1 ml roztworu trypsyny.
16. Komórki poddać procesowi trypsynizacji inkubując naczynie hodowlane w cieplarni, w temperaturze 37°C. Inkubację należy prowadzić do czasu odklejenia się komórek od dna naczynia hodowlanego, monitorując przebieg procesu trypsynizacji pod mikroskopem.
17. Dodać świeże medium hodowlane (2ml), komórki zawiesić i przenieść do falkonów
18. Komórki zwirować, usunąć supernatant, dodać świeże medium (2ml), komórki zawiesić
- 19. Przenieść 1 ml zawiesiny komórek do nowego sterylnego naczynia hodowlanego (butelka 75cm²), dopełnić medium do objętości 15ml**
20. Obejrzeć komórki pod mikroskopem.
21. Umieścić naczynie hodowlane w inkubatorze.
22. Pozostała zawiesina posłuży do wysiewu komórek do płytek testowych

Określanie żywotności komórek

Sprzęt:

- hemocytometr
- pipeta automatyczna o pojemności 10-100 μl (wraz z jednorazowymi tipsami)
- licznik

Odczynniki:

- roztwór błękitu trypanu (0,4%)
- zawiesina komórek
- medium hodowlane

Wykonanie ćwiczenia:

1. Pipetą automatyczną pobrać po 20 μl zawiesiny komórek i 20 μl roztworu trypanu i umieścić w probówce eppendorfa. Roztwory mieszać przez kilkukrotne przepipetowanie całości
2. Zawiesinę wybarwianych komórek inkubować (w temperaturze pokojowej) przez 3 minuty. Oczyszczyć komorę hemocytometru za pomocą roztworu etanolu i papierowego ręcznika
3. Po upływie dokładnie 3 minut inkubacji, pipetą automatyczną pobrać 10 μl wybarwionej zawiesiny komórek a następnie wykorzystując zjawisko podciągania kapilarnego umieścić odpowiednią objętość zawiesiny na każdej z siatek hemocytometru (nie przeładować komory przez wymuszone mechanicznie pipetowanie zawiesiny)
4. Ustawić ostrość mikroskopu (obiektyw 20x) na siatkę hemocytometru, policzyć oddzielnie komórki żywe (niezabarwione) i martwe (zabarwione) w 5 kwadratach 1mm² (4 narożne oraz 1 centralny, patrz rys.1).

UWAGA: należy policzyć komórki znajdującej się na górnej i lewej linii granicznej kwadratu, nie należy liczyć komórek leżących na linii dolnej i prawej

5. Powtórzyć procedurę zliczania dla drugiej komory hemocytometru
6. Policzyć gęstość żywych komórek w hodowli (wzór 1) oraz żywotność komórek w hodowli (wzór 2):

$$C = x \cdot \frac{Z}{a} \cdot 10^4 \text{ [żywych komórek / ml]} \quad (1)$$

$$Z = \frac{z}{z + m} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie: C – gęstość żywych komórek, Z – żywotność komórek w hodowli, x – rozcieńczenie, z – liczba komórek żywych, m – liczba komórek martwych, a – liczba pól, dla których dokonano liczenia komórek.

7. Obliczyć objętość roztworu, którą należy dodać do zawiesiny aby uzyskać gęstość komórek = 1×10^3 kom/ml

zgodnie ze wzorem:

$$C \cdot V_x = C_k \cdot V_k$$

Gdzie:

C – gęstość komórek policzona za pomocą hemocytometru

NANOTECHNOLOGIA MEDYCZNA - LABORATORIUM

Inżynieria produktów nanostrukturalnych

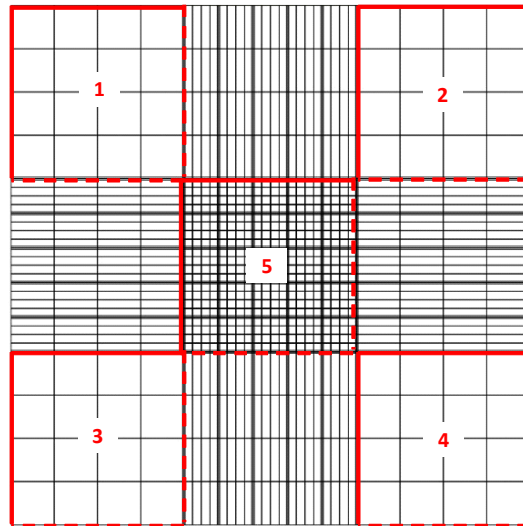
Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 4-10

V_k – objętość końcowa zawiesiny komórek (potrzebna do wysiania komórek na wszystkie dołki płytki)

C_k – gęstość końcowa (założona gęstość wysiewu)

8. Rozcieńczyć zawiesinę komórek do odpowiedniej objętości



Rys. 1: Układ siatek hemocytometru – należy policzyć komórki wewnątrz pól zaznaczonych na czerwono oraz komórki leżące na liniach ciągłych (pomijamy komórki na liniach przerywanych).

Wysiew komórek do płytek testowych

Materiały:

- płytka 96-dołkowa
- zawiesina komórek o zadanej gęstości
- medium hodowlane

Wykonanie ćwiczenia:

1. Pipetą automatyczną pobrać po 200 μ l zawiesiny komórek i przenieść do dołka.
2. Czynność powtarzać dla wszystkich dołków testowych
3. Obejrzeć komórki pod mikroskopem – oznaczyć markerem dołki, w których liczba komórek wyraźnie mniejsza/większa (jeśli takie wystąpią)

Uwaga!

Każdorazowo przed wysiewem komórek do dołka zamieszać zawiesinę w falkonie

Włókniny - cytotoksyczność

Wysiew komórek na materiał

Cytotoksyczność ekstraktów cz.1

Cytotoksyczność ekstraktów cz.1

Materiały:

- Płytki 96-dołkowa z wysianymi komórkami
- Sterylne materiały polimerowe
- Medium hodowlane
- Triton X

Wykonanie:

1. Materiały po ostatnim płukaniu PBS zalać medium (1ml), przycisnąć insertami – ważne, żeby materiały były całe zanurzone.
2. Materiały umieścić w inkubatorze na okres 1h
3. W tym czasie przygotować kontrolę pozytywną do testów ekstraktów: 1% roztwór Triton X w medium hodowlanym (objętość końcowa roztworu: 1ml)
4. Wyjąć z inkubatora płytki testowe z wysianymi na poprzednich zajęciach komórkami i obejrzeć je pod mikroskopem
5. Oznaczyć ewentualne nieprawidłowości w morfologii komórek
6. Usunąć medium z dołków, komórki 2x przepłukać roztworem PBS.
7. Po zadanym czasie ekstrakcji ekstrakty odciągnąć z dołków i przenieść do falkonu 15ml
8. Dołki zalać odpowiednim roztworem ekstraktu/medium/roztworu z dodatkiem czynnika cytotoksycznego
9. Płytkę umieścić w inkubatorze na okres 72h

Pasaż komórek adherentnych

Materiały:

- butelka 75cm² z rosnącymi komórkami
- medium hodowlane
- PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺
- roztwór trypsyny (0,25%)

Wykonanie ćwiczenia:

23. Ogrzać wykorzystywane roztwory do temperatury 37°C
24. Ocenić stan hodowanych komórek (obserwacja mikroskopowa)
25. W komorze laminarnej usunąć medium hodowlane
26. Przepłukać komórki 2x PBSem bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺
27. Do naczynia hodowlanego dodać 1 ml (3 ml w przypadku dużej ilości komórek) roztworu trypsyny.
28. Komórki poddać procesowi trypsynizacji inkubując naczynie hodowlane w cieplarni, w temperaturze 37°C. Inkubację należy prowadzić do czasu odklejenia się komórek od dna naczynia hodowlanego, monitorując przebieg procesu trypsynizacji pod mikroskopem.
29. Dodać świeże medium hodowlane (2ml), komórki zawiesić i przenieść do falkonów
30. Komórki zwirować, usunąć supernatant, dodać świeże medium (2ml), komórki zawiesić
31. Policzyć gęstość żywych komórek w hodowli oraz żywotność komórek w hodowli
32. Obliczyć objętość roztworu, którą należy dodać do zawiesiny aby uzyskać gęstość komórek = 1×10^5 kom/ml
33. Rozcieńczyć zawiesinę komórek do odpowiedniej objętości

Wysiew komórek na materiały

Materiały:

- sterylne materiały
- zawiesina komórek o zadanej gęstości
- suplementowane medium hodowlane

Wykonanie:

1. Sterylne materiały umieścić w płytce 48-dołkowej
2. Materiały zalać medium hodowlanym i inkubować w inkubatorze przez okres 15 minut
3. Po czasie inkubacji odciągnąć medium hodowlane i od razu dodać odpowiednią objętość zawiesiny komórkowej
4. Materiały umieścić w inkubatorze na okres 72h

Uwaga: nie dopuścić do wysuszenia materiałów.

Każdorazowo przed wysiewem komórek do dołka zamieszać zawiesinę w falkonie.

Wysiew komórek do płytek testowych

Materiały:

- płytka 96-dołkowa
- zawiesina komórek o zadanej gęstości
- suplementowane medium hodowlane

Wykonanie:

4. Pipetą automatyczną pobrać po 200 μ l zawiesiny komórek i przenieść do dołka.
5. Czynność powtarzać dla wszystkich dołków testowych
6. Obejrzeć komórki pod mikroskopem – oznaczyć markerem dołki, w których liczba komórek wyraźnie mniejsza/większa (jeśli takie wystąpią)

Uwaga!

Każdorazowo przed wysiewem komórek do dołka zamieszać zawiesinę w falkonie

Cytotoksyczność ekstraktów cz.2 – analiza XTT

Cytotoksyczność materiałów cz.2 - barwienie do obserwacji CLSM

Cytotoksyczność nanocząstek cz.1

Cytotoksyczność ekstraktów cz.2 – test XTT

Materiały:

- XTT working solution
- PBS
- Płytki 96-dołkowe inkubowane z ekstraktami

Wykonanie:

1. Wyjąć płytki z komórkami inkubowanymi z ekstraktami, obejrzeć komórki pod mikroskopem, oznaczyć ewentualne nieprawidłowości w morfologii
2. Usunąć ekstrakty z dołków, komórki przepłukać PBS (1x)
 1. Wykonać test XTT – zalać dołki roztworem XTT, inkubować w ciemności w 37st.C przez okres 3h
 2. Odczytać absorbancję przy dł. fali 470nm i 650nm
 3. Zapisać wyniki

Cytotoksyczność materiałów cz.2 - barwienie do obserwacji CLSM

Materiały:

- Płytki 48-dołkowa z komórkami rosnącymi na powierzchni materiałów
- Roztwór paraformaldehydu
- Roztwór DAPI
- Roztwór Alexa
- Roztwór Triton
- PBS

Wykonanie:

1. Materiały polimerowe wraz z rosnącymi na ich powierzchni komórkami wyjąć z inkubatora
2. Wyjąć inserty, usunąć medium hodowlane, materiały delikatnie (!) przepłukać PBS (2x)

UWAGA: przy płukaniu postępować delikatnie, uważać, żeby materiały nie przekreśliły się na drugą stronę (komórki rosną na górnej powierzchni materiału)

3. Materiały zalać roztworem PFA
4. Płytkę owinać parafilmem i inkubować w temperaturze pokojowej 15 minut
5. Płukanie PBS 4x5 min, RT, wytrząsarka
6. Permeabilizacja w 0,2% Triton X-100, 8 min, RT
7. Płukanie PBS 4x5min, wytrząsarka
8. Materiały zalać 100 ul roztworu Alexa, 1h, RT, **w ciemności**
9. Płukanie PBS 4x5min, RT, wytrząsarka, **w ciemności**
10. Materiały zalać 100 ul roztworu DAPI, 6 minut, RT, **w ciemności**
11. Płukanie PBS 4x5min, RT, wytrząsarka, **w ciemności**
12. Na szkiełko nakrywkowe (cienkie) nałożyć kroplę kleju utrwalającego z DAPI, na kropki umieścić materiały stroną z komórkami do kropli, przykryć drugim szkiełkiem nakrywkowym, zabezpieczyć lakierem do paznokci. Zawinąć w folię, trzymać w ciemności.

Cytotoksyczność nanocząstek cz.1

Materiały:

Płytki 96-dołkowa z rosnącymi komórkami

Nanocząstki

Wykonanie:

1. Przygotować zawiesiny nanocząstek w medium hodowlanym w stężeniu :
10. Przygotować kontrolę pozytywną do testu cytotoksyczności: 1% roztwór Triton X w medium hodowlanym (objętość końcowa roztworu: 1ml)
11. Wyjąć z inkubatora płytki testowe z wysianymi na poprzednich zajęciach komórkami i obejrzeć je pod mikroskopem
12. Oznaczyć ewentualne nieprawidłowości w morfologii komórek
13. Usunąć medium z dołków, komórki 1x przepłukać roztworem PBS.
14. Dołki zalać odpowiednio: zawiesiną nanocząstek/medium/roztworem z dodatkiem czynnika cytotoksycznego
15. Płytkę umieścić w inkubatorze na okres 72h

Cytotoksyczność nanocząstek cz.2 – test XTT
Obserwacje komórek na mikroskopie konfokalnym

Cytotoksyczność nanocząstek cz.2 – test XTT

Materiały:

- XTT working solution
- PBS
- Płytki 96-dołkowe inkubowane z nanocząstkami

Wykonanie:

4. Wyjąć płytki z komórkami inkubowanymi z nanocząstkami, obejrzeć komórki pod mikroskopem, oznaczyć ewentualne nieprawidłowości w morfologii
5. Usunąć roztwory z dołków, komórki przepłukać PBS (2x)
3. Wykonać test XTT – zalać dołki roztworem XTT, inkubować w ciemności w 37st.C przez okres 3h
4. Odczytać absorbancję przy dł. fali 470nm i 650nm
6. Zapisać wyniki

Obserwacje komórek rosnących na materiale – mikroskopia konfokalna

Wykonanie:

1. Wykonać zdjęcia (3 powtórzenia) dla każdej próbki
2. Policzyć liczbę komórek/jednostkę powierzchni (program ImageJ)