

RAPORT KOŃCOWY

z wykonania Etapu I. Charakterystyka komórek macierzystych MIC-1.

projektu pn. „Pozyskiwanie farmaceutyków drogą analizy chemicznej i ich izolacji do badań podstawowych”.

W ramach etapu 1 wykonano 4 zadania mające na celu charakterystykę porożogennych komórek macierzystych MIC-1:

Zadanie 1.1 Metody selekcji komórek macierzystych MIC-1 do badań

Zadanie 1.2 Przygotowanie homogenatu komórkowego i supernatantu do badań

Zadanie 1.3 Analiza cytogenetyczna

Zadanie 1.4 Analiza cyklu komórkowego i mikroskopowa

W ramach zadania 1.1 zaplanowano ustalenie drogą eksperymentalną najbardziej odpowiednich warunków hodowli porożogennych komórek macierzystych MIC-1, a także dalsze prowadzenie hodowli w sposób ciągły, zapewniając stały dostęp do materiału do badań. Przetestowano różne warunki hodowli: sprawdzano wpływ różnych stężeń surowicy, obecności dodatków, np. czerwieni fenolowej, glukozy, a także badano różne sposoby mrożenia i rozmrażania komórek celem ich bezpiecznego przechowywania, z możliwością założenia nowej hodowli w dowolnym czasie. Ustalono skład pojedynczej kompletnej porcji pożywki - 500 ml DMEM, 50 ml FBS, 5 ml glutaminy, 0,5 ml gentamycyny i 2,5 ml fungizonu. Komórki linii MIC-1 są hodowane w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C, w zmodyfikowanej atmosferze gazowej zawierającej 5% stężenie CO₂ i odpowiedniej wilgotności. CO₂ w cieplarni pełni funkcję buforującą i pozwala utrzymać odpowiednie pH pożywek hodowlanych. Odpowiednią wilgotność wewnątrz inkubatora uzyskujemy wlewając do tacy znajdującej się na dnie cieplarki wodę destylowaną lub demineralizowaną zawierającą 0,5% stężenie siarczanu miedzi, który ma właściwości grzybobójcze.

Zadanie 1.2 polegało na optymalizacji procesu homogenizacji ultradźwiękowej pelletu komórkowego, a także bieżącej produkcji homogenatu i supernatantu do dalszych badań, co miało na celu zapewnienie stałego dostępu do materiału do badań. Analizowany był wpływ poszczególnych warunków tego procesu (czas homogenizacji, amplituda, cykl pracy, utrzymanie stabilnej temperatury procesu) na jakość produktów – homogenatu i supernatantu. Produkty powstałe w ramach tego zadania wykorzystywane były na potrzeby kolejnych zadań. Homogenizację prowadzono dwukrotnie w buforze fosforanowym (4x15 s z przerwami po 10 s, amplituda 30%), po sonikowaniu homogenat odwirowywano przez 10 min. przy 14000g i przekazywano do dalszych badań.

W ramach zadania 1.3 zaplanowano analizę chromosomów porożogennych komórek macierzystych MIC-1 w stadium metafazy mającą na celu ocenę ich kształtu, liczby oraz telomerów po ich uprzednim wytrawieniu trypsyną i zabarwieniu barwnikiem fluorescencyjnym. Na podstawie szczegółowej analizy dostępnej literatury, wybrano sondy zbudowane z najbardziej konserwatywnych i powtarzalnych sekwencji dla szerokiego spektrum organizmów żywych. Synchronizacji komórek dokonano za pomocą trzech metod:



głodzenia, z użyciem zestawu do synchronizacji oraz inkorporacji BrdU (5-bromo-2'-deoksyuridine) do DNA podczas podziału komórek w trakcie fazy S cyklu komórkowego. W celu zatrzymania podziałów komórkowych w stadium metafazy do hodowli dodawano kolchicynę. Po inkubacji komórki odklejano, wywoływano szok osmotyczny, komórki utrwalano, a następnie przenoszono na szkiełka mikroskopowe. Gotowe preparaty suszono i barwiono metodą Giemsy, techniką GTG, a także techniką FISH. Preparaty barwione odczynnikiem Giemsy analizowano przy użyciu mikroskopu świetlnego w świetle białym celem określenia podstawowego zestawu chromosomów w kariotypie linii komórkowej MIC-1. Po przeprowadzeniu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) preparaty poddano analizie w mikroskopie fluorescencyjnym. Zastosowanie barwienia pozwoliło na określenie liczby chromosomów wchodzących w skład podstawowego zestawu kariotypu linii komórkowej MIC-1- $2n = 68$. Stosując technikę FISH stwierdzono występowanie typowych sygnałów hybrydyzacyjnych na wszystkich chromosomach.

W ramach zadania 1.4 zaplanowano barwienie komórek BrdU i analizę komórek w cytometrze obrazowym In Cell Analyzer 2000, a także analizę mikroskopową – obrazowanie morfologii i powierzchni komórek macierzystych w zależności od fazy rozwojowej i warunków wzrostu z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych Bioscope Catalyst II. Celem doświadczenia polegającego na barwieniu komórek BrdU (5-bromo-2'-deoksyuridine) było określenie długości fazy G1 oraz S cyklu komórkowego poróżogennych komórek macierzystych MIC-1. Obrazowanie za pomocą mikroskopii sił atomowych wykazało obecność na otrzymanych preparatach komórek macierzystych, typowych morfologicznie, wykształcających liczne wypustki plazmatyczne umożliwiające fizyczne i prawdopodobnie biologiczne oddziaływania (np. przekaz materiału, energii i informacji) międzykomórkowe.

Szczegółowe wyniki analizy znajdują się w załącznikach.