

Hodowla komórek śródbłónka w warunkach perfuzyjnych z systemem pompy ibidi oraz mikroszkielełkiem typu μ -Slide I^{0.6} Luer

1. Informacje ogólne

Poniższa nota aplikacyjna opisuje protokół dotyczący testu perfuzji, który łączy ze sobą system pompy ibidi wraz z mikroszkielełkiem typu μ -Slide I^{0.6} Luer. Ponadto, znajduje się w niej kilka zaleceń dotyczących zastosowań ludzkich komórek śródbłónka żyły pępowinowej (HUVEC). Protokół ten można dostosować do indywidualnych potrzeb eksperymentalnych.

W celu skonfigurowania systemu niezbędne są następujące materiały:

- Mikroszkielełki typu μ -Slide I^{0.6} Luer, ibiTreat (ibidi, 80186)
- System pomp ibidi (szczegóły dostępne w [instrukcji systemu pompy ibidi](#))
- Zestaw do perfuzji (CZERWONY), 15 cm, średnica: 1,6 mm (ibidi, 10962)
- Zacisk do wężyka
- Komórki HUVEC wraz z medium hodowlanym do wzrostu komórek śródbłónka oraz płodową surowicą cielęcą (FCS)
- Standardowy sprzęt przeznaczony do hodowli komórkowych (sterylny blat roboczy, zestaw do rozdzielania komórek, butelki hodowlane itp.)
- Statyw μ -Slide (ibidi, 80003)

2. Hodowla komórkowa

Komórki należy hodować zgodnie ze standardowym protokołem. W przypadku komórek HUVEC zalecamy zastosować pożywkę: Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Niemcy, C-22010) wzbogaconą o 2% płodową surowicą cielęcą (FCS).

Uwaga: Komórki śródbłónka nigdy nie powinny wzrastać do gęstości 100% ze względu na fakt, że konfluentna warstwa komórek wchodzi w stan zahamowania wzrostu, który zatrzymuje proliferację komórek, a także zmienia fizjologię komórek.

Istotne jest również to, że wszystkie komórki muszą być zdrowe, tj. w dobrym stanie fizjologicznym, ponieważ słabe i zubożone komórki mogą nie wytrzymać natężenia przepływu i mogą zostać wypłukane z powierzchni kolonii. W przypadku pracy z komórkami podstawowymi, sprawność komórkowa może znacznie różnić się w zależności od danej partii.

3. Przygotowanie materiału

Dzień przed rozpoczęciem eksperymentu

Należy umieścić płytki kanałowe oraz zestawy do perfuzji w inkubatorze (w opakowaniu). Następnie, do sterylnej probówki należy dodać wymaganą ilość pożywki hodowlanej i również umieścić ją w inkubatorze. Należy pamiętać, aby pozostawić lekko odkręconą nakrętkę, aby umożliwić ujście nadmiernego ciśnienia w probówce.

Następnie, należy zamontować pompę ibidi obok inkubatora oraz połączyć ją z komputerem, kablem elektrycznym, a także z rurkami doprowadzającymi w inkubatorze. Butelkę osuszającą należy zainstalować pomiędzy tylnym portem pompy, a przewodem prowadzącym do inkubatora, aby doprowadzić do zassania gazu atmosferycznego.

Ważna informacja: Należy umieścić wszystkie wymagane materiały, takie jak szkiełka, pożywkę oraz rurki (zestawy do perfuzji) w inkubatorze (w temperaturze 37°C oraz 5% CO₂) na całą noc przed rozpoczęciem eksperymentu. Jest to niezbędne, aby nie pojawiały się pęcherzyki powietrza.

Lepkość medium w 37°C wynosi ok. 0,007 dyn*s/cm² (patrz [nota aplikacyjna 11 „Natężenie ścinania oraz szybkość przepływu”](#)).

W dzień eksperymentu

Należy zamontować zestaw do perfuzji z systemem płynów (tak jak opisano w instrukcji systemu pompy ibidi), a następnie dodać około 12 ml zbilansowanego medium hodowlanego do zbiorników (po 6 ml z każdej strony). Aby usunąć bąbelki powietrza z rurek, należy rozpocząć cykl przepływu średniego. W tym celu można zastosować wstępnie zdefiniowaną konfigurację w oprogramowaniu pompy (należy przejść do menu → „Samouczek”, a następnie wybrać → „Wczytaj konfigurację demo” → „Usuń pęcherzyki powietrza”).

	Ciśnienie	Naprężenie ścinające	Natężenie przepływu	Zakres czasu
1)	50.0 mbar	brak (brak płytki)	35.6 ml/min	nieograniczony

Podczas uruchamiania programu należy delikatnie postukać palcem w probówce oraz adaptory, aby usunąć pęcherzyki powietrza. Po usunięciu całego powietrza z probówek, poziom w obu zbiornikach należy ponownie zrównoważyć do 5 ml.

Niezmiernie istotne jest, aby wszystkie pęcherzyki powietrza zostały usunięte przed dopasowaniem płytki do systemu perfuzyjnego z płynami! Jakikolwiek gaz pozostający w systemie może wpływać na szybkość przepływu, a w najgorszym przypadku może dojść do zatrzymania przepływu lub wypłukania komórek.

Test zacisku

Test należy wykonać w każdym nowo zamontowanym zestawie do perfuzji, aby sprawdzić poprawność zamontowania wężyków!

Należy uruchomić pompę z wyraźnie widocznym przepływem (np. za pomocą konfiguracji „Usuń pęcherzyki powietrza”), a następnie zacisnąć przewód w dolnej pętli zestawu do perfuzji (pod zaworem zaciskowym). Prawidłowe położenie mocowania pokazano na rysunku 1.

Warto upewnić się, że przepływ zatrzymuje się całkowicie, gdy przewód jest zaciśnięty. Test ten należy wykonać po obydwóch stronach zaworu!

Jeśli przepływ nie ustaje, należy sprawdzić czy rurki zostały prawidłowo zamontowane do zaworu zaciskowego (warto wyregulować wejście zaworu rozciągając rurkę oraz przesuwając ją w górę i w dół. Następnie można ponownie wykonać test zacisku).

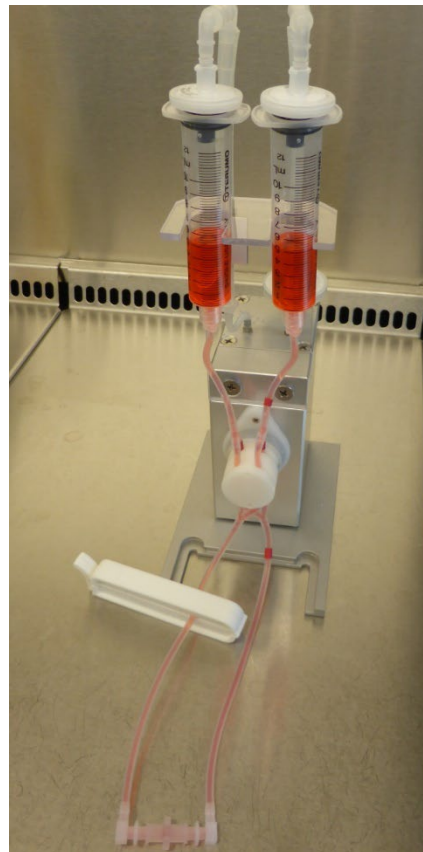
Jeśli nie można rozwiązać problemu, należy skontaktować się z firmą ibidi, aby sprawdzić, czy zawór nie został uszkodzony.

Ważne!

Należy sprawdzić prawidłowe położenie rurek za pomocą testu zacisku!

Rysunek 1: Należy wykonać test zacisku, aby sprawdzić, czy rurki są prawidłowo podłączone. Po zablokowaniu wężyka za pomocą zacisku, ciecz nie powinna przepływać z jednego zbiornika do drugiego.

Bardzo istotne jest, aby wykonać ten test po obydwóch stronach zacisku!



4. Kalibracja natężenia przepływu

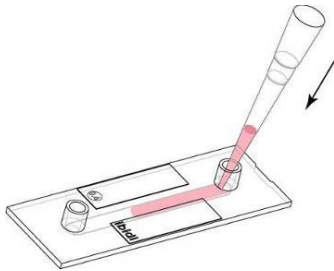
Aby przewidzieć prawidłowe naprężenie ścinające lub szybkość ścinania, należy zmierzyć natężenie przepływu przed rozpoczęciem eksperymentu z komórkami. Ze względu na takie czynniki jak wahania temperatury lub zmienne produkcyjne, wartości natężenia przepływu mogą różnić się od wartości obliczonych przez oprogramowanie. Szczegółowe instrukcje dotyczące ponownej kalibracji można znaleźć w instrukcji PumpControl.

Po skalibrowaniu natężenia przepływu, należy ustawić pracę pompy na cykl średniego ciśnienia (np. ustawienia demo → „Usuń pęcherzyki powietrza”) w celu przygotowywania komórek na mikroszkiełku.

5. Wysiewanie komórek na mikroszkieletku typu μ -Slide I^{0.6} Luer

Wszystkie poniższe czynności należy wykonywać w sterylnych warunkach pracy!

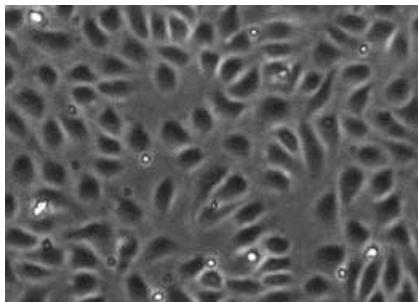
Najpierw należy rozpakować mikroszkieletko μ -Slide i umieścić je w statywie μ -Slide, a następnie zamontować zatyczki na adaptery Luer na czas przygotowywania zawiesiny komórek. Aby otrzymać końcową liczbę komórek (1×10^5 komórek/cm²), należy przygotować zawiesinę $1,6 \times 10^6$ komórek/ml. Łącznie będzie to $2,5 \times 10^5$ komórek/ μ -Slide.



Rysunek 2: Wysiewanie komórek na mikroszkieletko μ -Slide

Następnie należy zdjąć zatyczki z adapterów i dodać 150 μ l zawiesiny komórek do kanału, umieszczając końcówkę pipety bezpośrednio we wlocie kanału (patrz rysunek 2).

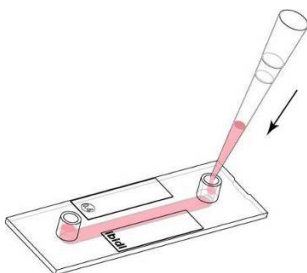
Kolejnym krokiem jest założenie zatyczek na adaptery Luer, po czym odstawienie mikroszkieletek w celu inkubacji (w 37°C i 5% CO₂) na jedną lub dwie godziny, aby uzyskać odpowiednią przyczepność komórek.



Rysunek 3: Konfluentna warstwa komórek HUVEC, dwie godziny po wysianiu

Po zakończonej inkubacji, komórki powinny utworzyć warstwę konfluentną, jak pokazano na rysunku 3. Konfluentna warstwa komórek posiada kluczowe znaczenie na wytrzymałość komórek na naprężenie ścinające.

Zasadniczo na tym etapie komórki są gotowe do podłączenia do zestawu perfuzyjnego. Jeśli system perfuzyjny nie zostanie podłączony bezpośrednio po inkubacji, to należy wypełnić zbiorniki nadmiarem medium, tak jak pokazano w następnym kroku.



Rysunek 4: Napełnianie zbiorników medium

Do każdego zbiornika dodać po 60 μ l pożywki hodowlanej. Należy unikać kierowania końcówki pipety bezpośrednio w stronę wlotu kanału, ponieważ może to prowadzić do zmiany naprężenia ścinającego nad warstwą komórek.

Po napełnieniu zbiorników należy je ponownie zamknąć, a następnie umieścić komórki w inkubatorze na czas przygotowania płynów perfuzyjnych.

W przypadku przeprowadzania hodowli komórkowej dłużej niż jeden dzień w warunkach statycznych, pełną wymianę pożywki należy przeprowadzać co najmniej raz na 24 godziny! Więcej szczegółowych informacji na temat hodowli komórkowych na mikroszkieletkach kanałowych można znaleźć w [instrukcji \$\mu\$ -Slide I Luer](#) oraz w nocie aplikacyjnej 3 „Wzrastanie komórek w μ -kanałach”.

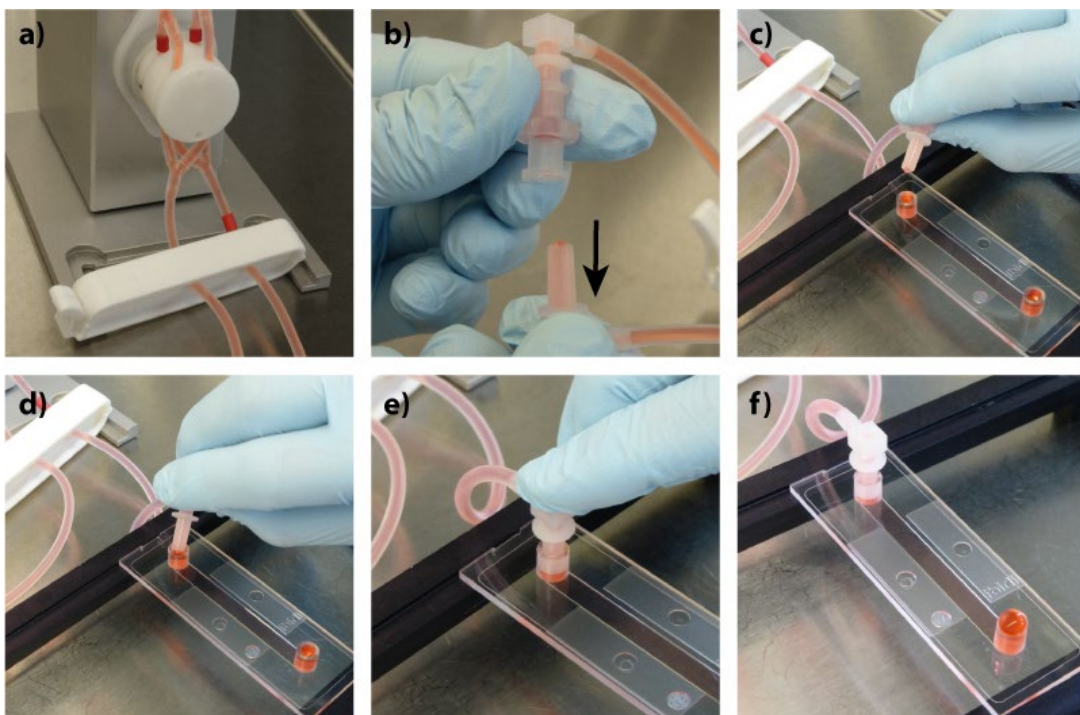
6. Podłączanie mikroszkiełek μ -Slide I^{0.6} Luer do zestawu perfuzyjnego

Gdy komórki przyczepią się do powierzchni, można połączyć mikroszkiełko do zestawu perfuzyjnego. Należy uważać, aby nie wykonywać zbyt szybkich i gwałtownych ruchów podczas wkładania adapterów Luer, ponieważ może to prowadzić do nagłego impulsu z wysokim napięciem ścinającym co może powodować odzepienie się komórek.

- Początkowo należy zatrzymać przepływ pompy i umieścić system płynów z zamontowanym zestawem perfuzyjnym w pokrywie.
- Następnie należy zacisnąć rurki w pobliżu zaworu za pomocą plastikowego zacisku (Rysunek 6a) i umieścić mikroszkiełko μ -Slide I Luer obok jednostki płynów. Nie wolno kłaść mikroszkiełka bezpośrednio na zimnej, metalowej powierzchni. Należy zastosować statyw μ -Slide lub szalki Petriego, aby zapobiec ostygnięciu szkiełka.
- W dalszym etapie należy zdjąć zatyczki i przemyć kanał za pomocą świeżego i ciepłego medium. Pożywkę należy nakładać powoli, aby uniknąć uszkodzenia komórek.
- Następnie należy napełnić zbiorniki medium do momentu pojawienia się menisku wypukłego (Rysunek 5).
- Następnie należy wyjąć pierwsze złącze Luer ze środkowego zacisku, trzymając go do góry (Rysunek 6-1, b). Warto upewnić się, że w środku nie pozostały pęcherzyki powietrza. Kolejnym krokiem jest przyłączenie kolejnego złącza Luer do mikroszkiełka, przechylając go ostrożnie, tak jak widać na rysunkach 6-1 (c-f).
- Na koniec należy mocno wcisnąć złącze kolankowe Luer do łącznika Luer, przekręcając adapter (e).

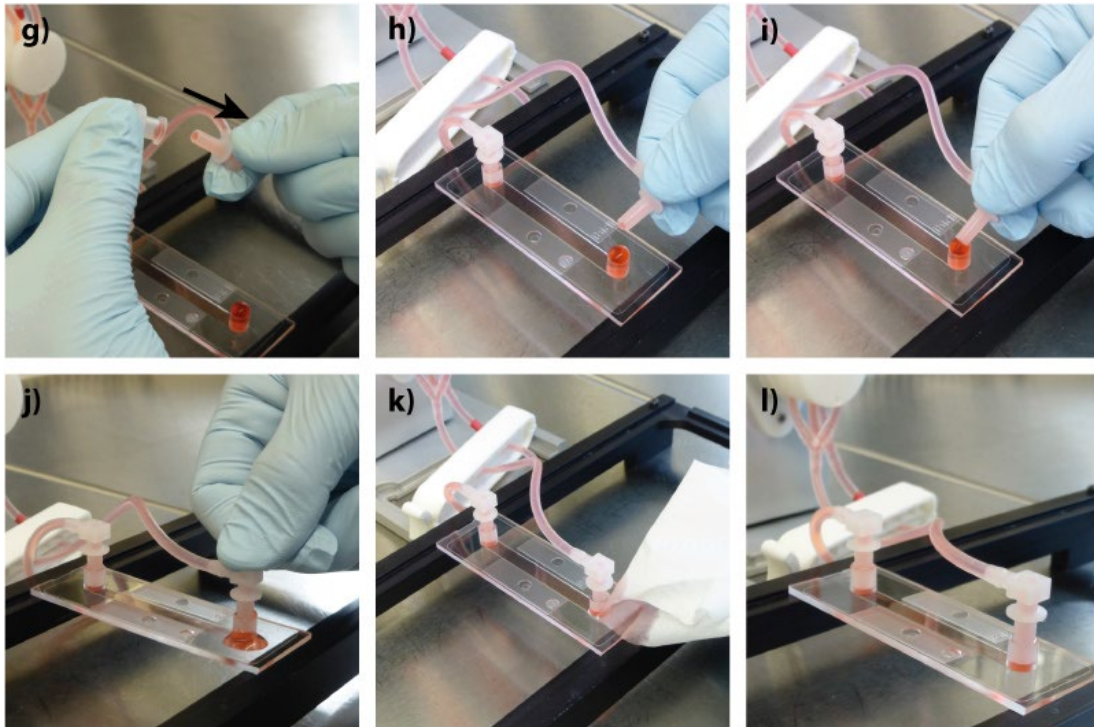


Rysunek 5: Wypełniony port Luer gotowy do podłączenia



Rysunek 6-1: Podłączanie mikropłytki do zestawu perfuzyjnego (pierwszy adapter)

Należy powtórzyć tę procedurę również z drugim łącznikiem Luer, a następnie usunąć nadmiar płynu za pomocą chusteczki (patrz Rysunki 6-2, g–l).



Rysunek 6-2: Podłączenie mikroślizki do zestawu perfuzyjnego (drugi adapter)

Należy wykonywać wszystkie procedury ostrożnie, ale również tak szybko, jak to tylko jest możliwe. Komórki mogą ulec zestresowaniu przy każdym zakłóceniu, dlatego mogą odzepić się od powierzchni mikroślizki, jeśli pojawi się zbyt duże pobudzenie.

Należy sprawdzić komórki pod mikroskopem po podłączeniu wężyka perfuzyjnego!

- Należy sprawdzić komórki pod mikroskopem. Istotne jest, aby warstwa komórek była stabilna, a komórki dobrze przylegały do powierzchni, ponieważ są one narażone na naprężenia ścinające. Jeśli komórki są zestresowane po procedurze podłączenia, należy pozostawić je na kilka godzin w celu regeneracji przed rozpoczęciem przepływu.
- Następnie należy ustawić cały zestaw w inkubatorze i podłączyć jednostkę płynową do pompy (wraz z przewodami ciśnieniowymi powietrza oraz kablem elektrycznym).

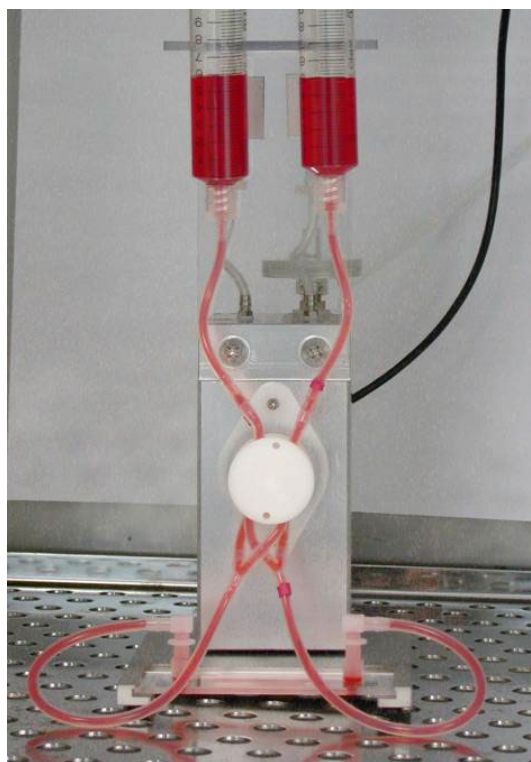
7. Uruchamianie pompy

Jeśli komórki są w dobrym stanie fizjologicznym, można rozpocząć przepływ, włączając pompę ciśnieniową za pomocą oprogramowania ibidi Pump Control.

W przypadku konfiguracji demonstracyjnej dołączony jest specjalny plik do oprogramowania Pump Control. Aby wybrać te ustawienia należy przejść do zakładki menu → „Samouczek”, a następnie wybrać → „Wczytaj konfigurację demo” → „Eksperyment demonstracyjny”.

Po wybraniu tej opcji, zostaną załadowane parametry eksperymentu przepływowego z umiarkowanym naprężeniem ścinającym. Program składa się z trzech cykli, które przyzwyczajają komórki stopniowym natężeniem, aż do końcowego naprężenia ścinającego.

Natężenie ścinające: 10 dyn/cm² (patrz tabela poniżej).



Rysunek 7: System płynów z zestawem perfuzyjnym oraz mikroszkiewką typu μ -Slide I Luer w inkubatorze.

	Ciśnienie	Naprężenie ścinające	Natężenie przepływu	Zakres czasu
1)	5.9 mbar	4.8 ml/min	2 dyn/cm ²	30 min
2)	15.4 mbar	11.9 ml/min	5 dyn/cm ²	30 min
3)	33.1 mbar	23.8 ml/min	10 dyn/cm ²	nieograniczony

PumpControl 1.6.0

Jednokierunkowy przepływ jest utrzymywany poprzez przełączanie dwóch zaworów systemu płynów. Przy stosowaniu nadciśnienia zgodnie z powyższymi zaleceniami, źródło przepływu będzie przechodzić od jednej rurki do drugiej (od lewej do prawej).

Szczegółowy opis naprężeń ścinających oraz szybkości ścinania na różnych slajdach znajduje się w [nocie aplikacyjnej 11 „Naprężenia ścinające i szybkości ścinania”](#). Szczegółowe informacje na temat pomp ibidi można znaleźć w [instrukcji systemu pomp ibidi](#).

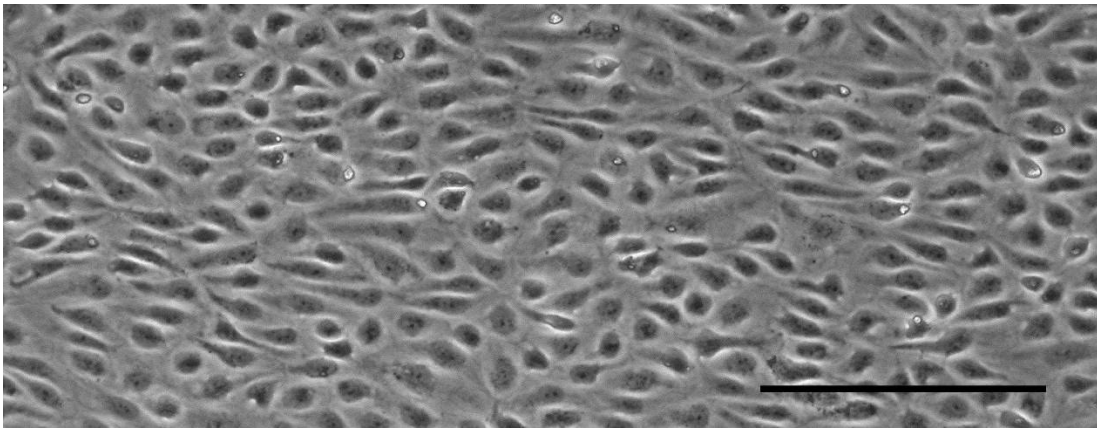
8. Obserwacja komórek pod mikroskopem

W celu obserwacji swoich komórek pod mikroskopem, należy wyłączyć pompę w momencie wyrównania poziomów płynu w zbiornikach. Następnie należy odłączyć przewód ciśnieniowy powietrza oraz kabel elektryczny od systemu płynów. Na koniec można umieścić całą jednostkę płynową z podłączonym mikroszkiewką na mikroskopie i obserwować swoje komórki.

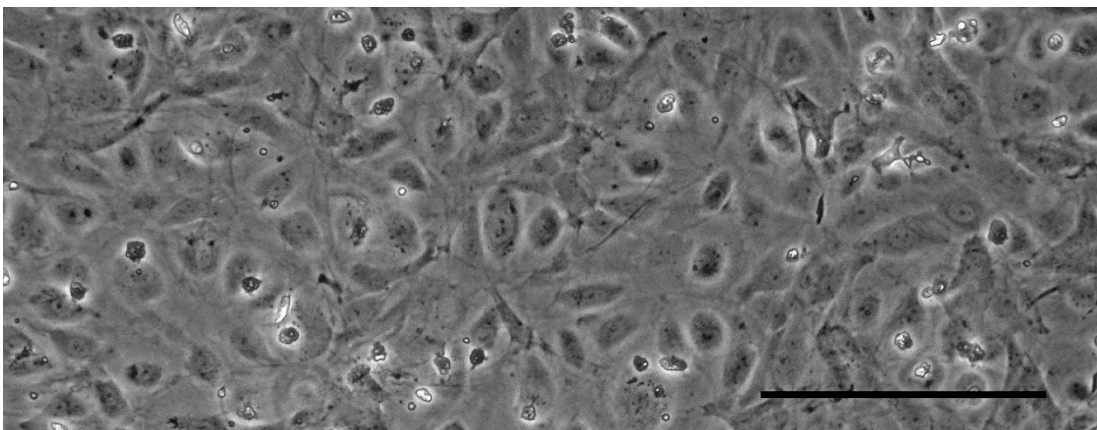
9. Morfologia komórek

Komórki śródbłonna są narażone w swoim środowisku fizjologicznym na naprężenia ścinające, dlatego utrzymywanie hodowli komórkowej z przepływającą pożywką jest lepiej skorelowane z ich naturalnymi warunkami fizjologicznymi niż komórki w hodowlach statycznych.

Dzięki specjalnym konfiguracjom, firma ibidi zaobserwowała lepsze narastanie kolejnych warstw komórek w ciągu pierwszych dwóch dni od rozpoczęcia eksperymentu z medium przepływowym. Komórki zorientowane są w kierunku przepływu. Na rysunkach 8 i 9 można porównać komórki HUVEC hodowane w warunkach hodowli przepływowej oraz statycznej. Wszystkie parametry, z wyjątkiem naprężenia ścinającego, pozostały takie same: komórki znajdują się w tym samym pasażu i były hodowane przez tydzień na mikroszkłeczkach typu μ -Slide I^{0.6} Luer (ibiTreat). Pożywkę hodowli statycznej zmieniano codziennie.



Rysunek 8: Komórki HUVEC w mikroszkłeczku typu μ -Slide I^{0.6} Luer hodowane przez siedem dni przy przepływie pożywki 20 dyn/cm². Komórki wykazują dobrą orientację w kierunku przepływu. Skala na rysunku wskazuje 200 μ m.



Rysunek 9: Rysunek 9: Komórki HUVEC w w mikroszkłeczku typu μ -Slide I^{0.6} Luer hodowane przez siedem dni w warunkach statycznych. Pożywkę zmieniano codziennie. Skala na rysunku wskazuje 200 μ m.

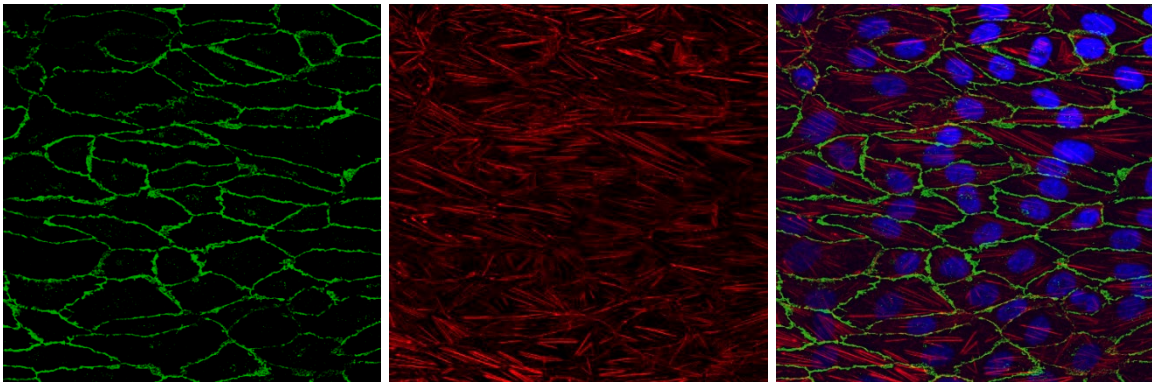
10. Immunofluorescencja

Komórki należy utrwalić oraz wybarwić za pomocą standardowej procedury. Podczas zmiany roztworów najpierw należy odpipetować płyn z obydwóch zbiorników. Należy przepłukać kanał dwukrotnie za pomocą 140 μ l świeżego roztworu. Za każdym razem należy dodawać nowy roztwór z jednej strony, a następnie pobierać go z drugiej strony. Ważne, aby kanał był zawsze wypełniony płynem!

Standardowy protokół barwienia immunofluorescencyjnego podano w nocie aplikacyjnej 2 „Barwienie fluorescencyjne przy użyciu mikroszkiełek typu μ -Slide I”.

Perfuzja

Komórki na poniższym rysunku były hodowane w warunkach pożywki przepływowej. Szkielet aktynowy jest zorientowany w kierunku przepływu. Widoczny jest wydłużony kształt komórki.

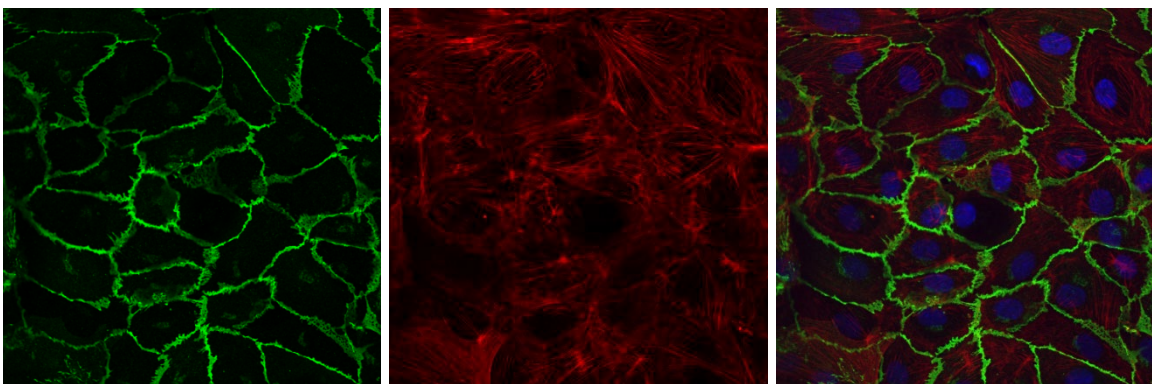


Rysunek 10: Komórki HUVEC wybarwione w mikroszkiełkach typu μ -Slide I^{0.6} Luer. Komórki HUVEC były hodowane przez siedem dni przy przepływie 20 dyn/cm².

Kolor niebieski: jądro komórkowe; zielony: kadheryny; czerwony: włókna aktynowe.

Kontrola statyczna w mikroszkiełkach typu μ -Slide I^{0.6} Luer

Komórki pokazane poniżej były hodowane w warunkach statycznych przez ten sam okres czasu co komórki w medium przepływowym (jeden tydzień). Kadheryny są wyraźnie widoczne, ale szkielet aktynowy nie jest ułożony w tzw. włókna stresowe, a komórki nie są zorientowane w kierunku przepływu.



Rysunek 11: Komórki HUVEC wybarwione na mikroszkiełkach typu μ -Slide I^{0.6} Luer. Komórki HUVEC były hodowane przez siedem dni w warunkach statycznych z wymianą pożywki co 24 godziny.

Kolor niebieski: jądro komórkowe; zielony: kadheryny; czerwony: włókna aktynowe.