

ТЕСТЫ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И РОСТ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

Использование культуры клеток для анализа стимулирующих и цитотоксических эффектов лекарственных веществ (ЛВ) и биологически-активных веществ (БАВ). Клетки растут при нормальных условиях: в среде, содержащей источники энергии, минералы, органические молекулы для биосинтеза, витамины и буфер с индикатором. В такой богатой среде очень быстро (в случае контаминации) развиваются микроорганизмы, поэтому необходимо обеспечить стерильность работ на всех стадиях экспериментов.

С помощью приведенных ниже методов можно оценить эффекты БАВ и ЛВ в клетках и их влияние на прирост с анализом морфологии, пролиферации и жизнеспособности клеток в культуре.

Культура клеток	Добавление БАВ	анализ:	- общая морфология
	→ инкубация 24-96ч.		- рост клетки - токсичность для клетки (жизнеспособность)

Растворы и материалы:

1. Суспензионная культура клеток *Arabidopsis thaliana* (Ath) или монослой клеток яичника Chinese Hamster (CHO) или COS7 (клетки почки обезьяны).
2. MS питательная среда (MS - Murashige Skoog) для Ath или DMEM (минимальная среда Дулбекко (Игла)) с различной композицией для CHO/COS.
3. Пластиковые планшеты и бутылки.
4. Стерильные пипетки.
5. Исследуемые вещества (см. приложение 1).

Процедура:

Ath клетки, день 1:

Клетки растут при температуре 20°C в MS среде при постоянном помешивании для сохранения их в суспензии.

1. Извлечение клеток из бутылки и подсчет их в камере Бюркера (гемоцитометр). Помните, что окрашиваются лишь мертвые клетки и их и нужно считать. Живые клетки со временем также начинают окрашиваться, поэтому подсчет надо проводить как можно скорее.
2. Добавление приблизительно 30000 клеток в каждую лунку 24-х луночного планшета. Доведите объем до 1 мл средой MS.
3. Добавление исследуемого вещества в нескольких повторностях и инкубирование клеток при 20°C.

Ath клетки, дни 2 - 4:

4. Изучение образцов под инвертированным микроскопом в течение 24 –96 часов с попыткой обнаружить какие-либо общие эффекты действия на клетки.
5. Забор аликвот (10, 25 и 100 mL) в планшеты, окрашивание белков для оценки влияния БАВ или ЛВ на рост (см. ниже).
6. Забор 50 mL аликвоты для теста на жизнеспособность (см. ниже).

CHO/COS клетки, день 1:

Клетки растут при 37°C с CO₂-инкубаторе при 5% CO₂.

1. Трипсинизированные клетки извлекают из флаконов и считают в камере Бюркера.
2. Добавляют ~2-10000 клеток на одну лунку в планшеты (96-лунок). Доводят объем до 0.2 mL средой DMEM с 10% эмбриональной сывороткой.
3. Добавляют исследуемое вещество в нескольких повторностях (контроль) и инкубируют клетки при 37°C.

CHO/COS клетки, дни 2 - 4:

4. Изучение образцов под инвертированным микроскопом в течение 24 –96 часов с попыткой обнаружить какие-либо общие эффекты действия на клетки.
5. Удаление питательной среды и отмывка клеток 3-хкратно фосфатно-солевым буфером (PBS или ФСБ).
6. Клетки половины лунок планшета используются в тесте окрашивания протеинов, другая половина в тесте на жизнеспособность для оценки эффекта БАВ или ЛВ.

Определение белков по Петерсону

Комплексное соединение, содержащее медь, связывается с пептидными связями в щелочной среде и формирует окрашенный комплекс, концентрация которого оценивается при длинных волнах. Количество белка может говорить о количестве клеток (по

интенсивности раствора). Доступно большое количество красителей для окрашивания белков (например, кристаллический фиолетовый).

Растворы и материалы:

1. Бидистиллированная очищенная вода
2. 0.8 M NaOH
3. CTC (О. 1 % CuSO_4 ; 0.2 % K-tartrate; 10 % Na_2CO_3) – хранить в темноте
4. 10% SDS
5. Folin-Ciocalteus reagent (хранить при 4°C) – сильный аллерген!
6. 0.1% Бычий сывороточный альбумин (БСА) в стерильной воде (хранить в морозильнике) – для калибровки прибора при длине волны 280 нм.
7. Планшеты (96 лунок)
8. ИФА-спектрофотометр для 96-ти луночных планшетов

Метод: (Analytical Biochemistry 83, 346-356, 1977)

Каждое измерение нуждается в построении стандартной кривой по растворам альбумина (1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15 единиц белка) – контроль H_2O .

1. Образец + H_2O (100 единиц)

Однородная суспензия Ath клеток. Используйте (для точности результатов) различные разведения образцов.

2. CTC: NaOH: SDS: H_2O (1:1:1:1) (100 единиц)

Осторожно перемешать, оставить на 10 минут.

3. Реактив Фолина : H_2O (1:5) (50 единиц)

оставить на 30 минут.

4. Измерение связывания при 750 нм в течение 2-х часов. График абсорбции строится по разнице содержания белка в БСА-стандартной кривой. Содержание белка в различных образцах может быть рассчитано по стандартной кривой. Примечание: исследуемая концентрация белка должна лежать в пределах значений стандартной кривой.

Тест на жизнеспособность с использованием красителя Trypan blue (Ath клетки)

В нормальных клетках плазматическая мембрана – барьер для полярных компонентов, которые не могут проходить сквозь липидный бислой. Таким образом, живые клетки могут быть отличимы от не живых или поврежденных клеток (по проницаемости мембраны). Например, краситель Trypan blue часто используется для окрашивания мертвых клеток.

Мертвые клетки выглядят темно-синими, а живые не окрашиваются.

Есть также возможность использовать прижизненный краситель – нейтральный красный (vital red) и окрашивать, таким же образом живые клетки. Такие «цветные тесты» используют для оценки количества живых клеток при получении первичной культуры из ткани или для теста на цитотоксичность БАВ или ЛВ.

Растворы и материалы:

1. 0.4 % Trypan blue в ФСБ или 0.9 % NaCl
2. Камера Бюркера
3. Микроскоп

Метод:

1. Аликвота 50mL суспензии клеток
2. Добавить 50 mL of Trypan blue раствора
3. Добавить по капле на каждую сторону гемоцитометра, притереть покровное стекло.
4. Считать количество клеток в двух А квадратах (1А квадрат равен 0.1mL) с каждой стороны камеры и рассчитывать количество живых клеток (разница между общим количеством клеток и количеством окрашенных (мертвых) клеток).

Окрашивание клеток с использованием Neutral (vital) Red (COS/CHO cells)

Растворы и материалы:

1. Глютаровый альдегид раствор (4.5 ml glutaraldehyde + 95.5 ml очищенной H_2O)
2. 0.1% Neutral red. (0.1 g краски в 95% этаноле до растворения. Затем добавить ФСБ до 100mL.)
3. 0.5 % уксусная кислота в 50% этаноле.

Метод:

1. Фиксация клеток 20 min в растворе 1. Промывка в ФСБ.

2. Аликвота 100 μ L neutral red раствора в каждую лунку (60 минут при 25°C)
3. Удаление красителя и промывка (3 раза) ФСБ.
4. Добавление 200 μ l раствора 3 (60 и более минут).
5. Считывание абсорбции красителя в ИФА-спектрофотометре при 550 nm.

Приложение 1. Исследуемые лекарственные вещества

Предлагаемые концентрации исследуемого вещества для калибровочного графика

Иссл-мое ЛВ	Ath клетки	CHO/COS клетки
1 mM	well* 1,2	3A-D, 7A-D**
0.1 mM	well 3,4	3E-H, 7E-H
10 μ M	well 5,6	4A-D, 8A-D
1 μ M	well 7,8	4E-H, 8E-H
Растворитель	well 9,10	5A-D, 9A-D
Пустые лунки	well 11,12	5E-H, 9E-H

*-well – № лунки планшета;

** - маркировка местоположения лунок в планшете

Соединения:

Внимание! Некоторые из этих компонентов токсичны!

Cd, Zn, Cu, Ca, Se, Vd,
 H_2O_2 , Acrylamide, NaN_3 ,
 Cycloheximid, Phospholipase A2 (PLA2)
 A12837, N-ethylmaleimide (NEM), Rodamin 123
 Acridin orange, Cytochalasin, β -Mercaptoethanol
 Actinomycin D (0.1mg/ml, dil (разведение) >100x)
 Vinblastine (0.1mg/ml, dil >100x)
 5-Fluorouracil(0.1mg/ml, dil >100x)
 cis-Platinum (0.1mg/ml, dil >100x)
 Melphalan (0.1mg/ml, dil >100x)
 Mitomycin C (0.1mg/ml, dil >100x)
 Cytosine arabinoside (0.1mg/ml, dil >100x)