

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРИ  
СКРИНИНГЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

**Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по курсу  
«Методы скрининга физиологически активных веществ»**



**Казанский федеральный  
УНИВЕРСИТЕТ**

Казань – 2016

**УДК 576.08**

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»*

*учебно-методической комиссии Химического института им. А.М. Бутлерова  
Протокол № 5 от 21 декабря 2016 г.*

*заседания кафедры медицинской химии КФУ  
Протокол № 4 от 12 декабря 2016 г.*

*Авторы-составители:  
научный сотрудник, к.б.н. А.Г. Иксанова,  
главный инженер проекта, к.б.н. О.В. Бондарь,  
доцент, д.х.н. К.В. Балакин*

*Рецензенты –  
профессор, д.х.н. В.В. Племенков  
профессор, д.б.н. А.А. Ризванов*

**Название:** МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРИ СКРИНИНГЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ. Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по курсу «Методы скрининга физиологически активных веществ» / А.Г. Иксанова, О.В. Бондарь, К.В. Балакин. – Казань: Казанский университет, 2016 – 40 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для специалистов, бакалавров и магистров химико-биологического профиля к практическим занятиям по курсу «Методы скрининга физиологически активных веществ».

Учебно-методическое пособие включает краткое описание основных методов исследования цитотоксичности физиологически активных соединений.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, ОСНОВАННЫЕ НА ПРЯМОМ ПОДСЧЕТЕ КЛЕТОК И КОЛОНИЙ.....	6
1.1 Определение числа клеток в монослое.....	6
1.2 Колониеобразующий тест .....	8
2 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ ЦЕЛОСТНОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ.....	10
2.1 Окраска суспензии клеток витальным красителем трипановым синим ....	10
2.2 Оценка выхода в среду инкубации фермента лактатдегидрогеназы .....	15
3 МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК .....	18
3.1 Методы, основанные на восстановлении тетразолия.....	18
3.1.1 MTT-тест.....	18
3.1.2 MTS, XTT и WST-1-тесты .....	22
3.2 Резазурин-тест .....	25
3.3 Тесты на протеазную активность клеток.....	27
4 МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ СИНТЕЗА ДНК .....	31
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	37
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	39

## ВВЕДЕНИЕ

Общепринятой системой первичного скрининга разрабатываемых лекарственных препаратов является использование тест-систем *in vitro*.

Крупный вклад в развитие клеточной токсикологии внес шведский ученый, цитолог доктор Bjorn Ekwall. Сформулированная им в 1983 году концепция «базовой цитотоксичности» (basal cytotoxicity) лежит в основе использования клеточных тест-культур при оценке токсичности веществ как альтернативы использованию животных. Bjorn Ekwall организовал международный токсикологический проект под названием Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity Programm (MEIC), в котором 50 отобранных химических веществ тестились в 100 лабораториях во всем мире, причем было применено в конечном счете 84 различных теста *in vitro*, методы выбирались на местах самими лабораториями. Все лаборатории работали на добровольных началах, без финансовой компенсации. Набор химических соединений для исследования был выбран экспертами Шведского информационного центра отравлений (Swedish Poison Information Centre). Соединения включали лекарственные средства, химические вещества, применяемые в промышленности, биоциды, яды и т.д., для которых были заранее известны сублетальные и летальные дозы в организме человека по данным клинических и судебно-медицинских заключений.

Этот проект продолжался почти 10 лет и наглядно продемонстрировал возможность использования тестов *in vitro* для прогнозирования токсических концентраций химических веществ в организме человека.

В ходе работы над этим проектом было выделено 3 типа токсичности:

- Базовая (общая) цитотоксичность — неблагоприятное воздействие химических веществ на общие для всех клеток структуру и функции, необходимые для выживания клетки, деления, репликации ДНК и т. д.
- Органоспецифическая цитотоксичность — влияние на структуры и функции, специфические для определенных клеток тканей и органов (например,

в результате воздействия процессов биотрансформации, связывания со специфическими рецепторами). Для ее определения используются тесты на клеточных линиях различных тканей органов (кровь, печень, почки и т. д.).

- Внеклеточная токсичность — проявляется, если ксенобиотик непосредственно не влияет на клетку, но его действие критическое на уровне целостного организма и охватывает процессы, происходящие вне клеток (например, клеточная секреция).

Автор указывал, что все три типа цитотоксичности могут иметь место *in vivo*, поэтому должны учитываться в стратегии исследований *in vitro*. По мнению Ekwall базовую цитотоксичность соединений «можно тестировать на недифференцированных клеточных линиях... используя простые и недорогостоящие тесты на клеточных культурах» (Ekwall, 1983).

Внедрение альтернативных методов в токсикологические исследования происходит под контролем таких международных организаций, как Европейский центр по утверждению альтернативных методов (ECVAM), Международный комитет центра по утверждению альтернативных методов (ICCVAM), Европейское сообщество токсикологов *in vitro* (ISTIV) и других.

Ekwall в 2000 году был составлен набор тестов, определявших базовую токсичность и показавших наилучшее прогнозирование острой токсичности после отравления химическими веществами: 1) содержание белка (24 ч), 2) содержание АТФ (тест 24 ч), 3) изменения морфологии клеток (тест 24 ч), 4) изменения pH (тест 7 сут).

Результаты опытов *in vitro* не могут быть использованы для абсолютно точного прогнозирования токсичности *in vivo*, поскольку токсикологические механизмы в недостаточной степени исследованы. Вместе с тем, в процессе развития опытов *in vitro* происходит дальнейшее изучение клеточных и молекулярных механизмов токсичности.

# 1 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, ОСНОВАННЫЕ НА ПРЯМОМ ПОДСЧЕТЕ КЛЕТОК И КОЛОНИЙ

Как правило, мертвые клетки открепляются от дна культурального планшета. Это свойство может быть использовано при оценке количества прикрепленных клеток после воздействия исследуемыми лекарственными соединениями. Метод основан на спектрофотометрическом измерении лизатов клеток после их окраски кристаллическим фиолетовым (связывается с ДНК и белками).

## 1.1 Определение числа клеток в монослое

*Реактивы, материалы и оборудование:*

- Питательная среда α-MEM/ DMEM / 199 / RPMI-166;
- Пенициллин-стрептомицин;
- L-глутамин;
- Эмбриональная телячья сыворотка;
- Изотонический раствор (Хенкса, PBS и др.);
- 0,2% спиртовый раствор кристаллического фиолетового (0,2 г кристаллического фиолетового растворить в небольшом объеме mQ, добавить 2 мл этилового спирта и довести объем в мерной колбе до 100 мл);
- 1% раствор SDS (додецилсульфата натрия)

*Ход работы:*

1. Первоначально определяют калибровочную зависимость для конкретной клеточной линии. Готовят клеточную суспензию с концентрацией  $5 \times 10^5$  клеток/мл. С помощью 8-канального дозатора в лунки 96-луночного планшета вносят по 100 мкл питательной среды. Далее в первые лунки (A1-H1) вносят по 100 мкл клеточной суспензии ( $5 \times 10^5$  клеток/мл) и тщательно перемешивают. В этих лунках будет наибольшее количество клеток (25 тыс/лунку). Далее из лунок A1-H1 по 100 мкл суспензии переносят в

последующие лунки и тщательно перемешивают согласно схеме, указанной на рисунке 1.

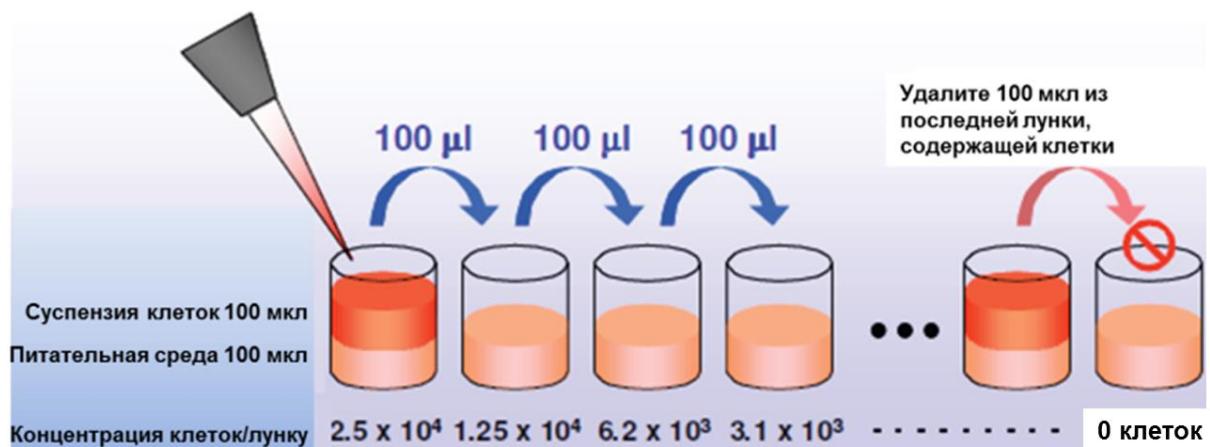


Рисунок 1 – Метод серийных разведений клеточной супензии

2. Клетки оставляют в СО<sub>2</sub> инкубаторе для адгезии клеток к субстрату в течение 5-24 часов в зависимости от индивидуальных особенностей клеточной культуры.

3. Далее питательную среду удаляют из планшета и лунки дважды промывают изотоническим раствором, остатки которого осторожно убирают с помощью вакуумного аспиратора.

4. В каждую лунку добавляют по 50 мкл 0,2% раствора кристаллического фиолетового и инкубируют при комнатной температуре в течение 10-20 минут.

5. Трижды промывают планшет в водопроводной воде путем погружения его в большой химический стакан. Промывку осуществляют осторожно, не допуская отрыва клеток с поверхности планшета. Воду между промывками следует менять. По окончании планшет высушивают в течение 2-24 часов, переворачивая его на фильтровальную бумагу.

6. С помощью многоканальной пипетки добавляют по 100 мкл детергента 1% раствора SDS и инкубируют планшет с крышкой при комнатной температуре в течение 20 минут при покачивании. Следует убедиться в однородности окраски лунок.

7. На планшетном ридере измеряют светопоглощение при 570 нм и строят калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации клеток.

8. Для исследования цитотоксичности лекарственных соединений в лунки 96-ти луночного планшета вносят  $1 - 2 \times 10^4$  клеток в 100 микролитрах культуральной среды. Концентрация клеток может быть скорректирована с учетом скорости пролиферации конкретной клеточной линии. Далее планшеты с клетками инкубируют 16-24 часа в  $\text{CO}_2$  инкубаторе для адгезии клеток к субстрату.

9. На следующие сутки питательную среду заменяют на новую среду в объеме 90 мкл. Серию разведений исследуемого лекарственного соединения готовят в питательной среде. С использованием многоканального дозатора и стерильных наконечников в лунки планшета с клетками вносят аликовты приготовленных растворов исследуемых соединений в объеме 10 микролитров в каждую лунку. Исследование проводят в трипликах. В контрольные лунки планшета вместо анализируемых соединений вносят аналогичные объемы растворителя.

10. Инкубацию с препаратами проводят в условиях 5%  $\text{CO}_2$  при 37°C в течение 1-72 часов в зависимости от целей исследования.

11. По истечении времени инкубации, культуральную среду с исследуемыми веществами удаляют из планшета с помощью вакуумного аспиратора и повторяют шаги, описанные в пунктах 3-7 данного раздела.

12. Результаты выражают в процентах по отношению к контролю или в абсолютных концентрациях клеток.

## **1.2 Колониеобразующий тест**

Колониеобразующий тест известен с 1950-х годов, первая его методика была описана в статье 1956 года при исследовании рентгеновского облучения на клетках HeLa. Клоногенный анализ, или колониеобразующий тест позволяет оценить способность одной клетки давать начало клеточной колонии. Известно,

что колония состоит как минимум из 50-ти клеток. Оценка клоногенности является методом выбора при определении репродуктивной гибели клеток после лучевой терапии, но может применяться для определения эффективности других цитотоксических агентов.

*Реактивы, материалы и оборудование:*

- Питательная среда α-MEM/ DMEM / 199 / RPMI-166;
- Пенициллин-стрептомицин;
- L-глутамин;
- Эмбриональная телячья сыворотка;
- Изотонический раствор (Хенкса, PBS и др.);
- Фиксирующий буфер (ледяная уксусная кислота, метанол, дистиллированная вода в соотношении 10:10:80);
- 0,4% спиртовый раствор кристаллического фиолетового (0,4 г кристаллического фиолетового растворить в небольшом объеме mQ, добавить 4 мл этилового спирта и довести объем в мерной колбе до 100 мл).

*Ход работы:*

1. Клетки (50-5000 клеток на лунку) культивируют в 980 мкл питательной среды согласно условиям культивирования в 6-луночном планшете в течение суток.

2. Серию разведений исследуемого лекарственного соединения готовят в питательной среде. На следующие сутки среду меняют на 980 мкл новой питательной среды. С использованием многоканального дозатора и стерильных наконечников в лунки планшета с клетками вносят аликовты приготовленных растворов исследуемых соединений в объеме 20 микролитров в каждую лунку. Исследование проводят в трипликах. В контрольные лунки планшета вместо анализируемых соединений вносят аналогичные объемы растворителя. Инкубацию с препаратами проводят в течение 7-21 дней.

3. По истечении указанного срока выросшие колонии отмывают 3 раза холодным раствором ФСБ и фиксируют в фиксирующем буфере (ледяная

уксусная кислота, метанол, дистиллированная вода в соотношении 10:10:80).

4. Далее колонии окрашивают 0,4% спиртовым раствором кристаллического фиолетового и подвергают микроскопированию с помощью стереомикроскопа. Лунки фотографируют и подвергают анализу с помощью программы ImageJ. Результаты представляют в процентном отношении к контролю, не подвергавшемуся действию препаратов. Для лекарственного препарата строят кривую «доза-эффект» и определяют величину  $IC_{50}$ .

## **2 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ ЦЕЛОСТНОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ**

### **2.1 Окраска суспензии клеток витальным красителем трипановым синим**

Большинство красителей плохо проникает через клеточную мембрану неповрежденных клеток и слабо связываются внутриклеточными структурами. Увеличение проницаемости клеточной мембраны при повреждении клетки приводит к возрастанию количества красителя, вошедшего в клетку и связавшегося с компонентами цитоплазмы.

По оптическим свойствам различают витальные красители для видимого света и флуорохромы. По химическим свойствам различают кислотные и основные красители. Примеры кислотных красителей: феноловый красный, цианол, трипановый синий, литиевый кармин. Примеры основных красителей: нейтральный красный, метиленовый синий. Проникая в клетки животных, одни красители диффузно окрашивают цитоплазму, другие красители откладывают в виде гранул в области комплекса Гольджи, оставляя ядро и цитоплазму неокрашенными.

Трипановый синий при проникновении в цитоплазму клеток способен адсорбироваться на ядерных белках. При этом даже самое слабое окрашивание ядра является индикатором повреждения клеточной мембраны. Метод прост, не трудоёмок, позволяет получить ответ в течение нескольких минут.

*Реактивы, материалы и оборудование:*

- трипановый синий

- изотонический раствор (DPBS, раствор Эрла, раствор Хэнкса и др.)
- микропробирки типа Эппендорф
- камера Нэйбауэра/Горяева для подсчёта клеток
- автоматический счетчик клеток
- инвертированный микроскоп

*Ход проведения теста:*

Предварительно необходимо подготовить гемоцитометр (камеру Горяева или камеру Неубайэра), протерев предметное и покровное стекла камеры бумажной салфеткой, смоченной в 70% этиловом спирте. Покровное стекло плотно необходимо притереть к предметному стеклу или зажать с помощью фиксаторов гемоцитометра до появления колец Ньютона, так чтобы покрыть заштрихованные области (рисунок 2). Это приведет к образованию камеры с фиксированным объемом, поскольку края предметного стекла подняты над заштрихованной поверхностью ровно на 0,1 мм. Во время подсчета клеток недопустимо наличие пузырей воздуха на сетке камеры, так как это мешает точности подсчета.

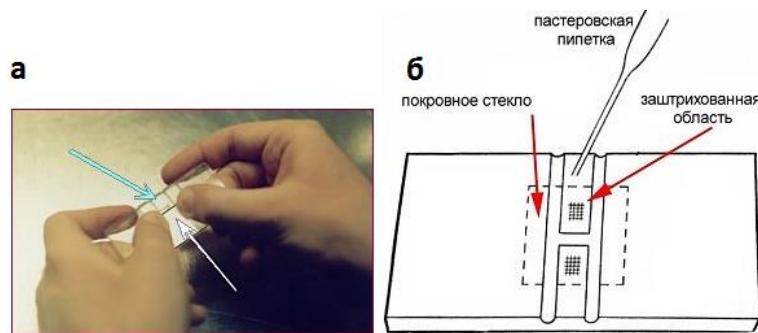


Рисунок 2 а – притирка предметного и покровного стекол гемоцитометра,

б – внесение суспензии клеток в камеру гемоцитометра

Камера Горяева и камера Неубайэра представляют собой прозрачные предметные стекла, с бороздами и нанесённой микроскопической сеткой. Обе камеры предназначены для подсчета количества клеток, в частности форменных элементов крови, в заданном объеме жидкости и отличаются параметрами градуированной области. Градуированная область камеры Неубайэра содержит

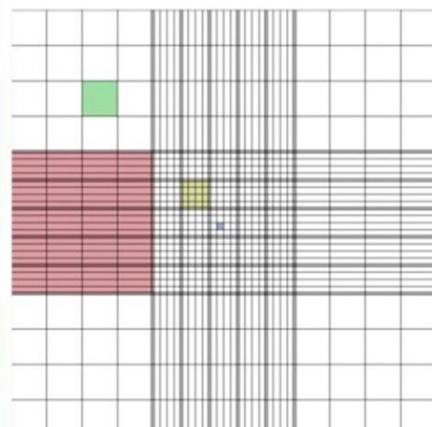
9 больших квадратов размерностью 1 x 1 мм (площадь 1  $\text{мм}^2$ ). Большие квадраты с помощью градуировки в трех направлениях дополнительно разделены на малые квадраты размерностью: 0,25 x 0,25 мм (0,0625  $\text{мм}^2$ ), 0,25 x 0,20 мм (0,05  $\text{мм}^2$ ) и 0,20 x 0,20 мм (0,04  $\text{мм}^2$ ). Центральный квадрат дополнительно разделен на квадраты 0,05 x 0,05 мм (0,0025  $\text{мм}^2$ ) как показано на рисунке 3а.

Сетка камеры Горяева содержит 225 больших квадратов (15 рядов по 15 больших квадратов в каждом), разграфленных вертикально, горизонтально, крест на крест и неразграфленных (рисунок 3б). Постоянной величиной в камере является так называемый «малый квадрат», сторона которого равна 1/20 мм, следовательно, его площадь равна 1/400  $\text{мм}^2$ .

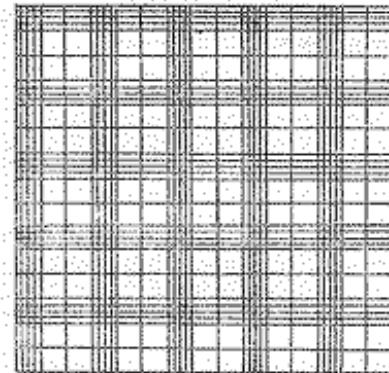
Для определения жизнеспособности клеток, клеточную суспензию окрашивают красителем трипановым синим. Для этого отделяют небольшой объем клеточной суспензии в отдельную пробирку, добавляют к ней равный объем 0,1%-ного раствора трипанового синего. Трипановый синий окрашивает только мертвые клетки, живые клетки остаются неокрашенными. Также существуют методы избирательного окрашивания структурных компонентов клетки. В частности, краситель индиго контрастирует ядра клеток, кумасси синий белки цитоскелета, родамин 123 митохондрии.

Часть окрашенной или неокрашенной клеточной суспензии отбирают с помощью автоматического дозатора (достаточно 10-20 микролитров). Заполняют счетную камеру гемоцитометра, используя силу капиллярного всасывания.

Размеры	Площадь	Объем в 0.1 мм бороздке
1 x 1 mm	1 mm <sup>2</sup>	100 nL
0.25 x 0.25 mm	0.0625 mm <sup>2</sup>	6.25 nL
0.25 x 0.20 mm	0.05 mm <sup>2</sup>	5 nL
0.20 x 0.20 mm	0.04 mm <sup>2</sup>	4 nL
0.05 x 0.05 mm	0.0025 mm <sup>2</sup>	0.25 nL



а



б

Рисунок 3 а – градуировка камеры Неубайэра; размеры, площадь и объем квадратов градуировки суммированы в таблице; б – градуировка камеры Горяева

Подсчитывают общее количество жизнеспособных клеток в любых 4x больших квадратах камеры Неубайэра (как показано на рисунке 4), включая клетки, касающиеся всех ограничивающих граней. Считать следует клетки, касающиеся правой и верхней ограничивающих линий, но не клетки, касающиеся левой и нижней ограничивающих линий, чтобы избежать повторного подсчета одних и тех же клеток. Если суспензия клеток концентрированная, а клетки мелкие, допускается подсчет клеток в меньшем количестве квадратов. Аналогичным образом можно подсчитать количество клеток в камере Горяева. Для точного подсчета достаточно подсчитать общее количество жизнеспособных клеток в 15 квадратах по диагонали камеры Горяева, включая клетки, касающиеся всех ограничивающих граней.

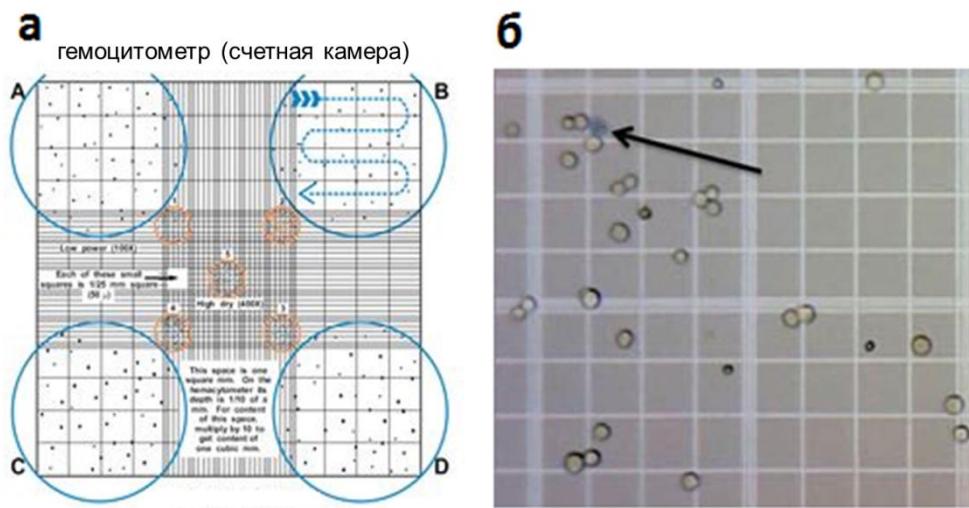


Рисунок 4 а – порядок подсчета клеток в камере Неубайэра, б – микрофотография клеток в гемоцитометре (живые клетки прозрачные, стрелкой обозначена мертвая окрашенная клетка)

Рассчитывают количество жизнеспособных клеток в одном миллилитре суспензии по следующей формуле для камеры Неубайэра:

$$X = (A / B) \times n \times 10000$$

где  $X$  — искомое количество клеток в 1 мл суспензии;  $A$  — сумма живых клеток, сосчитанных в определенном количестве квадратов;  $B$  — количество больших квадратов, в которых проводился подсчет клеток. Учесть разведение  $n$ , если клеточная суспензия была разбавлена (в частности, при добавлении трипанового синего).

Для камеры Горяева справедлива следующая формула подсчета количества клеток:

$$X = (A / B) \times 250000$$

где  $X$  — искомое количество клеток в 1 мл суспензии;  $A$  — сумма клеток, сосчитанных в определенном количестве квадратов;  $B$  — количество сосчитанных малых квадратов.

При работе с автоматическим счетчиком клеток Countess automated cell counter (Invitrogen) используют одноразовые пластиковые камеры, идущие в комплекте с прибором. Суспензию клеток смешивают с трипановым синим в соотношении 1:1 (v:v) и, как описано ранее, наносят на рабочую поверхность

одноразовой камеры с помощью капиллярных сил. Одноразовую двухстороннюю камеру вставляют в разъем счетчика стороной, содержащей суспензию клеток. На экране появится рабочее поле камеры с анализируемыми клетками. Для получения увеличенных изображений клеток используют кнопку «Zoom» на сенсорном экране. С помощью бокового черного винта с надписью «Focus» фокусируются на клетках таким образом, чтобы живые клетки имели вид сфер с прозрачным центром и темной мембраной (только такие клетки будут приниматься в расчёт в качестве живых!), а мертвые клетки были равномерно окрашены трипановым синим без темного обода. Нажимают кнопку «Count cell» на сенсорном экране, после чего на экране появится информация о количестве живых и мертвых клеток в анализируемом образце.

Метод не предназначен для выявления незначительных повреждений цитоплазматических мембран, поскольку краситель проникает в клетки лишь тогда, когда плазматическая мембрана становится проницаемой для высокомолекулярных соединений, например белков. Кроме того, метод не применим при исследовании соединений, увеличивающих проницаемость цитоплазматических мембран (ПАВ, Плуроники и т.д.).

## **2.2 Оценка выхода в среду инкубации фермента лактатдегидрогеназы**

Лактатдегидрогеназа – цитозольный фермент, который участвует в обратимом превращении пирувата в лактат и содержится в большинстве тканей организма. При повреждении цитоплазматической мембраны клеток лактатдегидрогеназа высвобождается в среду культивирования.

Суть метода заключается в том, что ЛДГ катализирует превращение лактата в пируват при одновременном восстановлении НАД в НАДН, который далее восстанавливает в присутствии тетразолиевой соли в красный формазан (рисунок 5).

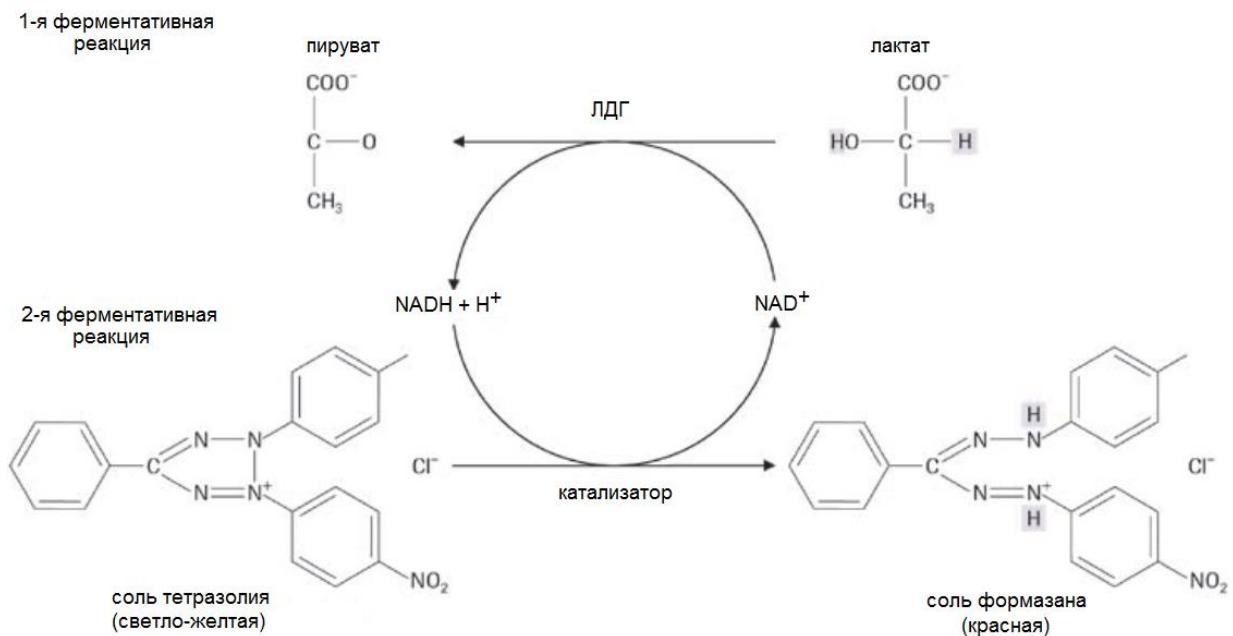


Рисунок 5 – Последовательность реакций в тесте по определению активности ЛДГ

*Реактивы, материалы и оборудование:*

- клетки млекопитающих;
- изотонический раствор (DPBS, раствор Эрла, раствор Хэнкса и др.);
- культуральная среда (DMEM, RPMI и др.);
- пенициллин-стрептомицин      или      другие      антибиотики      или      антимикотики;
- L-глутамин или другие заменимые/незаменимые аминокислоты;
- эмбриональная телячья сыворотка или другие;
- автоматический пипетор;
- стерильные серологические пипетки;
- пробирки объемом 2, 15, 50 мл;
- автоматические дозаторы и стерильные наконечники к ним;
- CO<sub>2</sub> инкубатор;
- бокс биологической безопасности (ламинарный бокс 2 класса);
- Трис буфер 200 mM, pH 8,0. Растворить 24,2 г Трис-основание в 1 л mQ, pH довести до 8,0 соляной кислотой и простерилизовать автоклавированием.

- 2X ЛДГ тест-буфер. Растворить 223 мг INT (2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride), 57 мг PMS (N-methylphenazonium methyl sulfate), 575 мг NAD (nicotinamide adenine dinucleotide), и 3,2 г молочной кислоты в 480 мл 200 мМ Трис буфера, pH 8,0. Хранить буфер следует при -20°C.

- Микропланшетный ридер
- Центрифуга с адаптером для планшетов

*Ход работы:*

1. Для осуществления теста в лунки 96-ти луночного планшета вносят  $1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  клеток в 100 микролитрах культуральной среды.

2. В качестве контроля используют лунки с клетками, не подвергающиеся действию препаратов, а также лунки с питательной средой без клеток.

3. До лечения исследуемыми препаратами клетки адгезивных культур инкубируют 12-16 часов в условиях 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C для прикрепления ко дну планшета. Суспензионные культуры клеток подвергают инкубации с препаратами после посадки в планшет.

4. Инкубацию с препаратами проводят в условиях 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C в течение 1-24 часов.

5. Далее планшет центрифугируют при 1500-2000 об/мин в течение 5 минут и с помощью многоканальной пипетки осторожно, не касаясь дна лунок, отбирают по 50 мкл супернатанта из каждой лунки и переносят в новый планшет.

6. В каждую лунку добавляют по 50 мкл 2X ЛДГ тест-буфера и аккуратно перемешивают в течение 30 секунд. Планшет инкубируют при комнатной температуре (22 – 25°C) в течение 10-30 минут без доступа света.

7. Активность фермента измеряют, отбирая аликовты сред инкубации. Оценивают светопоглощение при 450 нм (максимум поглощения продукта

реакции-формазана). Расчет активности фермента производят по калибровочному графику и по формуле:

$$A = \frac{B \times k}{(T_2 - T_1) \times V} = \text{нмоль/мин/мл} = \text{Ед/л}$$

, где А – активность лактатдегидрогеназы, В - количество НАДН, образованное за промежуток времени  $T_2 - T_1$ , рассчитанное по калибровочной кривой (нмоль), к – коэффициент разведения образца,  $T_2 - T_1$  – промежуток времени (мин), V – объем образца, добавленного в лунку (мл).

### **3 МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК**

#### **3.1 Методы, основанные на восстановлении тетразолия**

Для оценки жизнеспособности могут быть использованы различные соли тетразолия. Наиболее часто используются следующие: MTT, MTS, XTT и WST-1. Представленные соединения можно разделить на 2 группы: 1) MTT, имеющего положительный заряд и легко проникающего в живые эукариотические клетки; 2) MTS, XTT и WST-1, имеющих отрицательный заряд и с трудом проникающих в клетки. Последняя группа, как правило, используется с промежуточным акцептором электронов, который может переносить электроны из цитоплазмы или плазматической мембраны, что способствует восстановлению солей тетразолия в окрашенный продукт формазан.

##### **3.1.1 МТТ-тест**

МТТ-реагент под действием митохондриальных дегидрогеназ жизнеспособных клеток превращается в нерастворимый в воде формазан, имеющий фиолетовую окраску (рисунок 6).

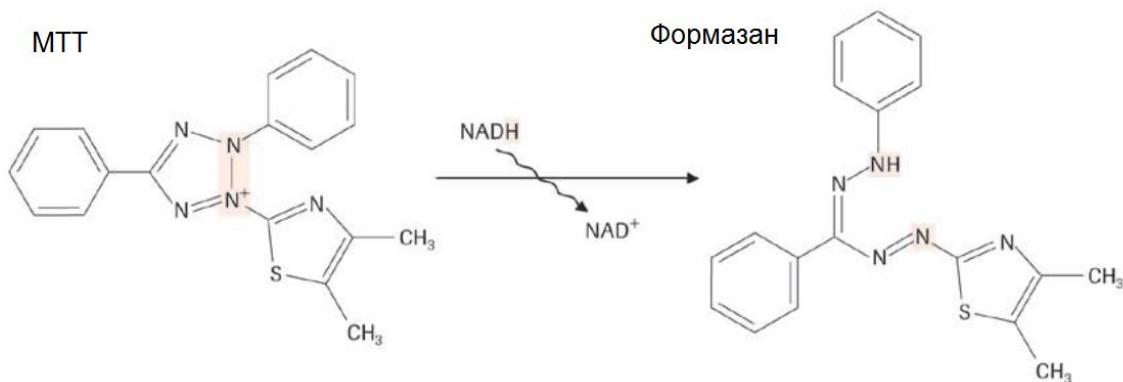


Рисунок 6 – Реакция превращения МТТ в формазан

При лизисе клеток кристаллы формазана легко переходят в раствор таких органических растворителей, как изопропанол или ДМСО. По данным оптической плотности раствора формазана (500-600 нм) определяют активность митохондриальных дегидрогеназ, и, соответственно, жизнеспособность клеток (рисунок 7).



Рисунок 7 – 96-луночный планшет после проведения МТТ-теста

Реактивы, материалы и оборудование

- Коммерчески доступные киты:
    - CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Promega Corporation Cat.# G4000,
    - Cell Growth Determination Kit, MTT based. Sigma-Aldrich Cat.# CGD1-1KT, and
    - MTT Cell Growth Assay Kit. Millipore Cat. # CT02.
    - Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT Powder). Sigma-Aldrich Cat.# M2128.

- Вода деионизированная (сопротивление 18 МОм, <5 ppbTOC);
- Диметилсульфоксид ХЧ;
- Питательная среда α-МЕМ;
- Питательная среда DMEM;
- Пенициллин-стрептомицин;
- L-глутамин;
- Эмбриональная телячья сыворотка;
- Изотонический раствор (Хенкса, Версена, Дульбекко и т.д.);
- Раствор Трипсина-ЭДТА;
- 96-луночные планшеты, F-Туре;
- Пробирки полипропиленовые на 15, 50 мл;
- Микропробирки 0,6; 1,5; 2,0 мл;
- Наконечники для дозаторов 10, 200, 1000 мкл;
- Мерные колбы на 5 и 10 миллилитров;
- Культуральные сосуды «Фласки»;
- Шприцевые фильтры с PTFE мембраной, размер пор 0,22 микрометра.
- Вортекс;
- Камера Нойбауэра для подсчёта клеток;
- Ламинарный шкаф;
- Оптический микроскоп;
- Планшетный ридер;
- СО<sub>2</sub> инкубатор;
- Термостат BWT-U (BioSan);
- Одноканальные пипетки с переменным объемом дозируемой жидкости 0,5-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл;
- Многоканальные пипетки с переменным объемом дозируемой жидкости 0,5-10 мкл, 10-100 мкл, 30-300 мкл;
- Вакуумный аспиратор медицинский.

*Ход работы:*

1. Клетки культивируют в среде  $\alpha$ -MEM/DMEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и 1% пенициллина-стрептомицина в атмосфере 5%-го  $\text{CO}_2$  при 37 °C до образования монослоя.
2. Для получения клеточной суспензии монослой клеток трипсинизируют с последующей инактивацией трипсина добавлением полной питательной среды с сывороткой.
3. Подсчёт клеток производят в камере гемоцитометра методом исключения трипанового синего.
4. Для осуществления трехдневного теста в лунки 96-ти луночного планшета в зависимости от пролиферативного потенциала вносят 1000÷3000 клеток в 200 микролитрах культуральной среды. Перед внесением в планшет клетки тщательно суспендируют. Клеточную суспензию вносят в лунки планшета с помощью многоканального дозатора и стерильных наконечников. Далее планшеты с клетками инкубируют 24 часа в  $\text{CO}_2$  инкубаторе для адгезии клеток к субстрату.
5. В стерильном 96-луночном планшете готовят серийные разведения анализируемых соединений в стерильном изотоническом растворе для водорастворимых соединений. Для водонерастворимых соединений определяют предел растворимости.
6. С использованием многоканального дозатора и стерильных наконечников в лунки планшета с клетками вносят аликовты приготовленных растворов исследуемых соединений в объеме 22 мкл в каждую лунку. Исследование проводят в трипликатах. В контрольные лунки планшета вместо анализируемых соединений вносят аналогичные объемы растворителя.
7. После внесения исследуемых веществ клетки культивируют в  $\text{CO}_2$  инкубаторе в стандартных условиях в течение 72 часов.
8. По истечении времени инкубации культуральную среду с исследуемыми веществами удаляют из планшета с помощью вакуумного аспиратора.

9. В ванночке для многоканального дозатора готовят смесь: 9 мл культуральной среды + 1 мл МТТ-реагента (5 мг/мл в растворе Хэнкса) на один 96-луночный планшет. Приготовленную реакционную смесь вносят в объеме 100 мкл в каждую лунку планшета и инкубируют в CO<sub>2</sub> инкубаторе 3,5 часа.

10. По истечении времени инкубации культуральную среду с исследуемыми соединениями с осторожностью, стараясь не задевать клетки, удаляют вакуумным аспиратором, в каждую лунку планшета вносят по 100 мкл ДМСО и инкубируют 5-10 минут. Появившееся фиолетовое окрашивание детектируют на планшетном ридере при 555 нм (референтная длина волны – 650 нм).

11. Результаты обрабатывают с помощью программного обеспечения OriginPro 8. Рассчитывают процент жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке относительно лунок положительного контроля, жизнеспособность которых принимают за 100%. Далее строят графики зависимости жизнеспособности клеток, выражаемые в процентах относительно десятичного логарифма концентраций добавленных соединений. Полученную кривую подвергают анализу “Fit Sigmoidal - DoseResp” в программном обеспечении OriginPro 8, находят логарифм концентрации в точке 50% жизнеспособности клеток. Рассчитывают концентрацию полумаксимального ингибирования роста клеток (IC<sub>50</sub>).

### **3.1.2 MTS, XTT и WST-1-тесты**

MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум), в присутствии феназина метосульфата (PMS) производит формазановый продукт с максимумом поглощения при 490-500 нм в фосфатном буферном солевом растворе. MTS-тест часто описывается как 'одноступенчатый' МТТ-тест, в котором удобно добавлять реагент непосредственно в культуру клеток без периодичных стадий в тесте МТТ (рисунок 8А).

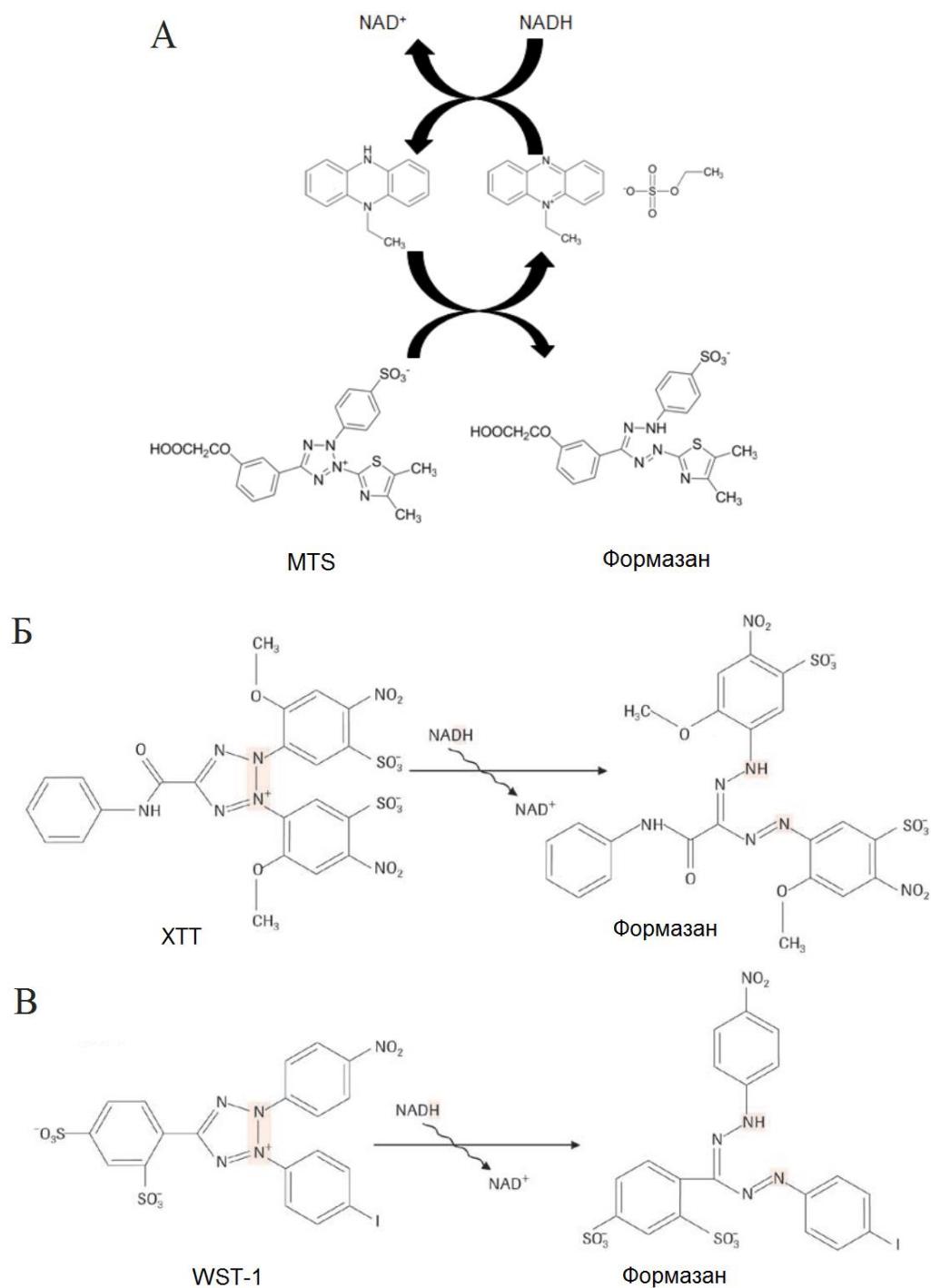


Рисунок 8 – Молекулярные структуры MTS (А), XTT (Б), WST-1 (В) и их соответствующие продукты реакции

ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилид) был предложен в качестве замены МТТ, давая большую чувствительность и более высокий динамический диапазон. Образующийся формазановый краситель растворим в воде, это позволяет избежать последнюю стадию растворения (рисунок 8Б).

WSTs (*Water-soluble Tetrazolium salts*, водорастворимые тетразолиевые соли) — группа других водорастворимых красителей для теста МТТ, разработанная с тем, чтобы давать другие спектры поглощения получаемых формазанов (рисунок 8В).

WST-1 и особенно WST-8 (2-(2-метокси-4-нитропентил)-3-(4-нитропентил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2Н-тетразолиум) имеют преимущества перед МТТ в том, что они восстанавливаются вне клеток, соединяются с медиатором электронов PMS и формируют водорастворимый формазан. Наконец, WST-тесты могут быть прочитаны сразу же (в отличие от МТТ-тестов, которые требуют стадию растворения), дают более эффективный сигнал, чем МТТ и уменьшают токсичность для клеток (в отличие от проницаемого для клеток МТТ, и его нерастворимого формазана, который накапливается внутри клеток).

#### *Реактивы, материалы и оборудование*

- Коммерчески доступные киты:
  - CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Promega Corporation Cat.# G3580,•
    - In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based. Sigma-Aldrich Cat.# TOX2-1KT,•
    - Cell Counting Kit-8 (WST-8 based). Dojindo Molecular Technologies, Inc. Cat.# CK04-01,
    - MTS Reagent Powder. Promega Corporation Cat.# G1111,•
    - XTT sodium salt. Sigma-Aldrich Cat.# X4626
- Остальные реактивы, материалы и оборудование аналогичны тесту МТТ.

#### *Ход работы:*

- 1-8. Аналогичны разделу 3.1.1 МТТ-тест.
9. Готовят смесь следующего состава: 9 мл культуральной среды + 900 мкл MTS реагента (2 мг/мл в растворе Хэнкса) + 100 мкл катализатора

phenazine methosulfate (0,92 мг/мл в растворе Хэнкса).

10. Культуральную среду с исследуемыми соединениями с осторожностью, стараясь не задевать клетки, удаляют вакуумным аспиратором. Приготовленный раствор MTS-реагента вносят в объеме 100 мкл в каждую лунку планшета и инкубируют в СО<sub>2</sub> инкубаторе 1-4 часов.

11. Появившееся окрашивание детектируют на планшетном ридере при 550 нм (референтная длина волны – 700 нм).

12. Пункт аналогичен разделу 2.1.1 МТТ-тест.

### **3.2 Резазурин-тест**

Резазурин представляет собой водорастворимый прижизненный краситель, который используется с 1950-х годов для оценки бактериального и дрожжевого загрязнения биологических жидкостей и молока. Метод определения с его участием основан на способности живых клеток восстанавливать голубой нефлуоресцирующий резазурин до розового флуоресцентного резоруфина, который можно определить колориметрически или флуориметрически (последний способ более чувствителен) (рисунок 9).

Резазурин, в отличие от МТТ, восстанавливается более широким спектром ферментов: кроме митохондриальных дегидрогеназ его восстанавливают также цитохромы и дегидрогеназы, находящиеся в цитоплазме клетки. Методологические особенности эксперимента с резазурином позволяют использовать в исследовании суспензионные культуры и дают возможность в дальнейшем использовании культуры.

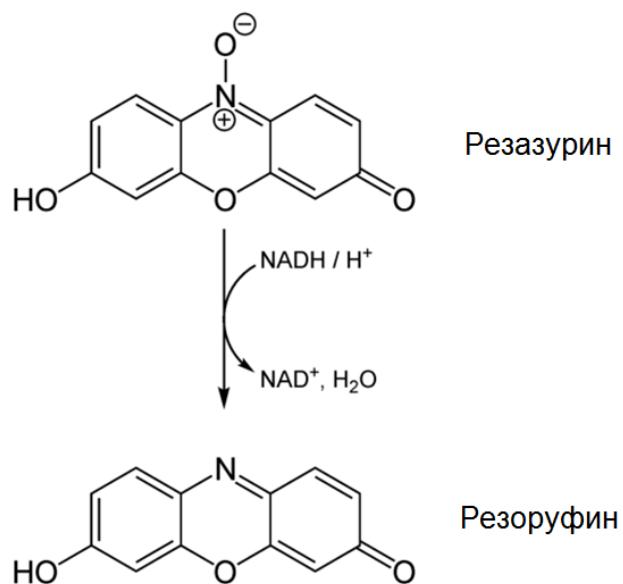


Рисунок 9 – Реакция восстановления резазурина в резоруфин в живых клетках

*Реактивы, материалы и оборудование*

- Коммерчески доступные киты:
  - CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Promega Corporation Cat.# G8081,•
  - In Vitro Toxicology Assay Kit, Resazurin based. Sigma-Aldrich Cat.# TOX8-1KT,•
  - alamarBlue®—Rapid & Accurate Cell Health Indicator. Life Technologies, Inc. Cat.# DAL1100•
  - alamarBlue® AbD Serotech Cat.# BUF012B•
  - Resazurin sodium salt. Sigma-Aldrich Cat.# R7017-1G
  - Остальные реактивы, материалы и оборудование аналогичны тесту МТТ.

*Ход работы:*

1-8. Аналогичны разделу 3.1.1 МТТ-тест.

9. В ванночке для многоканального дозатора готовят смесь: 9 мл культуральной среды + 3 мл Резазурин-реагента (0,15 мг/мл в растворе Хэнкса) на один 96-ти луночный планшет. Приготовленную реакционную смесь вносят в объеме 120 мкл в каждую лунку планшета и инкубируют в CO<sub>2</sub> инкубаторе 1-

4 часов.

10. Флуоресценцию детектируют на планшетном ридере при длине возбуждения 560 нм, испускания – 590 нм.

11. Пункт аналогичен разделу 2.1.1 МТТ-тест.

### 3.3 Тесты на протеазную активность клеток

В качестве маркера на жизнеспособность могут рассматриваться тесты по определению внутриклеточной протеазной активности. Недавно был разработан флуоресцентный субстрат внутриклеточных протеаз – глицилфенилаланил-аминофторкумарин GF-AFC. Он проникает в живые клетки, где цитоплазматическая аминопептидаза отщепляет глицин и фенилаланин, высвобождая аминофторкумарин, и происходит генерация флуоресцентного сигнала, пропорционального количеству жизнеспособных клеток (рисунок 10).

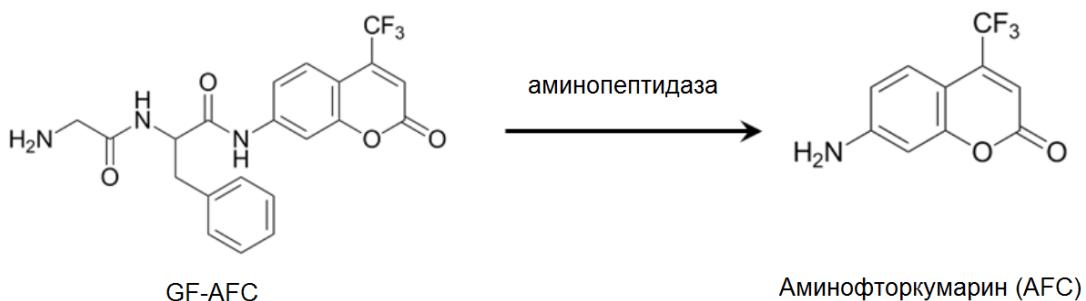


Рисунок 10 – Реакция превращения глицилфенилаланил-аминофторкумарина во флуоресцирующий продукт аминофторкумарин

#### *Реактивы, материалы и оборудование*

- Коммерчески доступные киты:
  - CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay kit. Promega Corporation (-20 °C).
- Остальные реактивы, материалы и оборудование аналогичны тесту МТТ.

#### *Ход работы:*

1-8 Пункты аналогичны разделу 3.1.1 МТТ-тест.

9. Готовят 2х раствор реагента: 10 мкл субстрата GF-AFC добавляют к 10 мл тестового буфера, тщательно перемешивают и используют в течение 24 часов в условиях хранения при комнатной температуре или в течение 7 дней при 4 °C. В ванночке для многоканального дозатора готовят смесь: 10 мл культуральной среды + 10 мл 2х раствора реагента на один 96-луночный планшет. Приготовленную реакционную смесь вносят в объеме 200 мкл в каждую лунку планшета и инкубируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе 0,5-3 часов.

10. По истечении времени инкубации флуоресценцию детектируют на планшетном ридере при длине возбуждения 380–400 нм, а испускания – 505 нм.

11. Анализ полученных результатов проводят в соответствии с алгоритмом, описанным в пункте 11 раздела 2.1.1 МТТ-тест.

### 3.4 Определение внутриклеточного уровня АТФ

Измерение внутриклеточного уровня АТФ с помощью люциферазы светлячка входит в набор тестов для высокопроизводительного скрининга разрабатываемых лекарственных препаратов (рисунок 11).

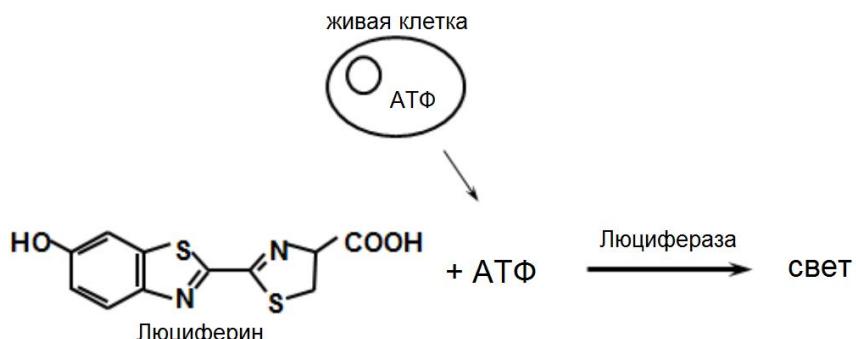


Рисунок 11 – Принцип определения уровня АТФ по активности люциферазы

#### *Реактивы, материалы и оборудование*

- Коммерчески доступные киты:

- CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Promega Corporation Cat.# G7570

- ATPLite™ 1 step, Perkin Elmer Cat.# 6016731,

- Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit. Sigma-Aldrich Cat.# FLASC-1KT.

*Ход работы:*

1 вариант (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Promega Corporation)

1. Размораживают при комнатной температуре входящие в кит реагенты: CellTiter-Glo® Buffer и CellTiter-Glo® Substrate. Переносят 10 мл буфера в ампулу, содержащую лиофилизат субстрата, осторожно перемешивают, получают раствор, далее именуемый CellTiter-Glo® Reagent.

2. Последовательность инкубации лекарственных соединений с клетками аналогична ранее описанной (пп 1 – 8 раздела 3.1.1 МТТ-тест). Отличие заключается в используемых планшетах – в случаях определения флуоресценции или люминесценции следует использовать непрозрачные (белые/черные) планшеты.

3. В ванночке для многоканального дозатора готовят смесь: 10 мл культуральной среды + 10 мл CellTiter-Glo® Reagent на один 96-луночный планшет. Приготовленную реакционную смесь вносят в объеме 200 мкл в каждую лунку планшета и встряхивают планшеты на орбитальном шейкере в течение 2 минут для индукции лизиса клеток. Следует помнить, что процедуру следует выполнять в закрытом планшете без доступа света.

4. Для стабилизации люминесцентного сигнала позволительно выдержать планшет в течение 10 минут при комнатной температуре. Люминесценцию детектируют на планшетном ридере.

5. Результаты обрабатывают с помощью программного обеспечения OriginPro 8. Рассчитывают процент люминесценции в каждой опытной лунке относительно лунок контроля, люминесценцию которых принимают за 100%. Далее строят графики зависимости люминесценции, выражаемые в процентах относительно десятичного логарифма концентраций добавленных соединений. Полученную кривую подвергают анализу “Fit Sigmoidal - DoseResp” в программном обеспечении OriginPro 8, находят логарифм концентрации в точке

50% жизнеспособности клеток. Рассчитывают концентрацию полумаксимального ингибирования роста клеток ( $IC_{50}$ ). Следует отметить, что с течением времени (1-24 часов) интенсивность сигнала падает, поэтому измерение следует проводить в течение первых 30 минут после добавления CellTiter-Glo® Reagent.

## 2 вариант (набор «Люмтек»)

1. Клетки (100 тыс. клеток в лунке) культивируют в 1 мл питательной среды в стандартных условиях в 24-луночном культуральном планшете в течение суток для их прикрепления к поверхности дна лунки.

2. Далее среду заменяют на среду, содержащую исследуемые лекарственные соединения в раскладке концентраций, и продолжают культивирование в течение 72 часов.

3. По истечении времени инкубации культуральную среду с исследуемыми веществами удаляют из планшета с помощью вакуумного аспиратора. Клетки промывают изотоническим раствором.

4. Далее добавляют буфер, активирующий выработку АТФ, состоящий из: NaCl (122 mM), NaHCO<sub>3</sub> (25 mM), глюкозы (10 mM), KCl (3 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,2 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,4 mM), CaCl<sub>2</sub> (1,4 mM) и HEPES (10 mM) и культивируют клетки в течение 30 минут в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

5. Клетки лизируют буфером, содержащим Tris-HCL (0,05 M), EDTA (2 mM), TritonX100 (1%), NaF (10 mM). Лизирующий буфер добавляют в объеме 0,5-1 мл. Далее лизаты клеток собирают в пробирки Эппendorф и замораживали при -74 °C. Измерение уровня АТФ проводили в течение 24 часов после заморозки.

6. Непосредственно перед анализом клеточные лизаты размораживают и центрифугируют от клеточного дебриса 5-7 минут при 20000g, супернатант отбирают для последующего анализа содержания АТФ.

7. Содержание АТФ в клеточных лизатах определяют с помощью хемилюминесцентного метода в реакции с участием люциферазы, D-люциферина и АТФ с использованием высокочувствительного АТФ-реагента

производства "Люмtek".

8. В лунки черного 96-луночного планшета вносят 50 мкл АТФ-реагента и измеряют фоновый сигнал хемилюминесценции на планшетном ридере. Затем вносят по 50 мкл образца или АТФ-контроля (для контроля), перемешивают и измеряют биолюминесцентный сигнал.

9. Величину сигнала вычисляют по формуле:

$$I_{\text{обр}} = I - I_{\text{фон}}$$

где  $I_{\text{обр}}$  – биолюминесцентный сигнал для образца;  $I$  – измеряемый сигнал для образца;  $I_{\text{фон}}$  – фоновый сигнал.

10. Концентрацию АТФ в анализируемом образце рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{АТФ}} = \frac{10^{-8} \times I_{\text{обр}}}{I_{\text{контроль}} \times C_{\text{белка}}}$$

где  $C_{\text{АТФ}}$  – концентрация АТФ в анализируемом образце, моль/мг белка;  $10^{-8}$  – концентрация АТФ-контроля;  $I_{\text{обр}}$  – биолюминесцентный сигнал для образца;  $I_{\text{контроль}}$  – биолюминесцентный сигнал для АТФ-контроля;  $C_{\text{белка}}$  – концентрация белка в образце.

11. Результаты представляют в процентном отношении к контролю, не подвергвшемуся инкубации с исследуемыми лекарственными соединениями.

#### 4 МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ СИНТЕЗА ДНК

В процессе клеточной пролиферации до момента деления клетки на две дочерние происходит процесс репликации ДНК (рисунок 12). Подобная близкая связь между синтезом ДНК и удвоением клеток делает весьма привлекательным измерение синтеза ДНК для оценки клеточной пролиферации. Если к клеточной культуре добавить меченные прекурсоры ДНК, то делящиеся клетки внедряют меченные нуклеотиды в состав своих ДНК. Традиционно такие тесты предполагают использование радиоактивно меченых нуклеозидов, в основном меченого тритием тимицина ( $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ ). Количество  $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ , внедренного в

клеточную ДНК, может быть оценено при помощи метода подсчета сцинтилляций в жидкой фазе (LSC).

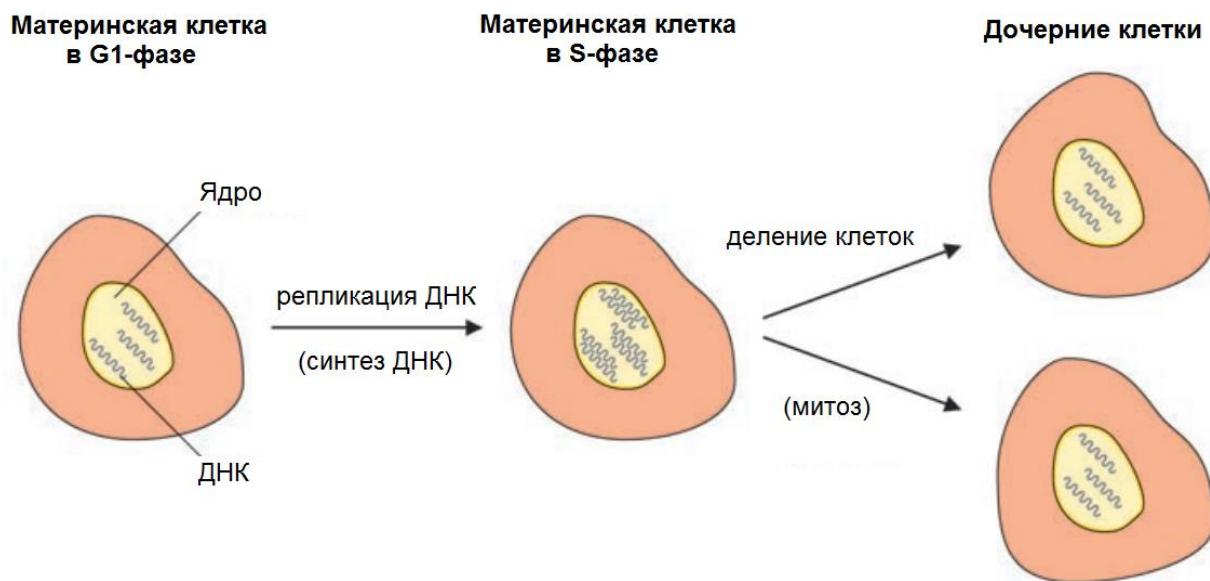


Рисунок 12 – В процессе пролиферации клеток наблюдается тесная взаимосвязь между синтезом ДНК и удвоением клеток

Экспериментально было показано, что аналог тимицина 5-бром-2'-дезоксиуридин (BrdU) способен внедряться в клеточную ДНК на место тимицина (рисунок 13). Внедренный BrdU может быть детектирован при помощи количественного клеточного энзиматического иммунотеста, использующего специфические антитела к BrdU. Использование BrdU для подобных пролиферационных тестов позволяет избежать экспериментальных проблем, связанных с применением радиоактивных меток, таких как  $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ .

Данный тест предполагает экстракцию ДНК из BrdU-меченых пролиферирующих клеток с последующим иммунотестом. Поскольку эта процедура является достаточно трудоемкой, она была адаптирована под формат 96-луночных планшетов.

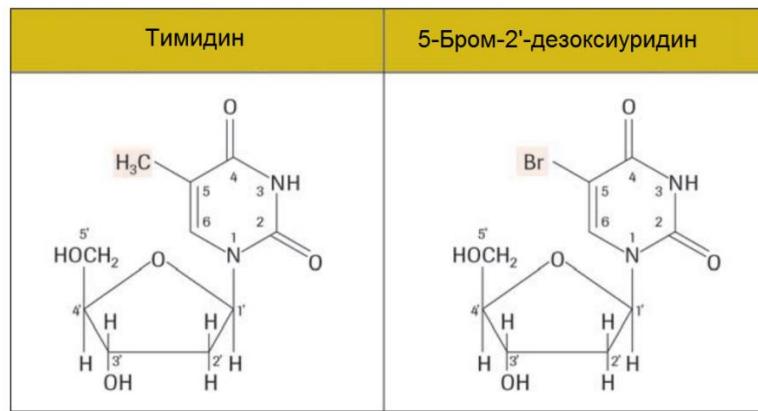


Рисунок 13 – Структуры тимицина и BrdU

Этот вариант не требует выращивания клеток, а полный тест от момента начала выращивания культуры до анализа данных ELISA при помощи планшетного ридера осуществляется в одном планшете (рисунок 14).

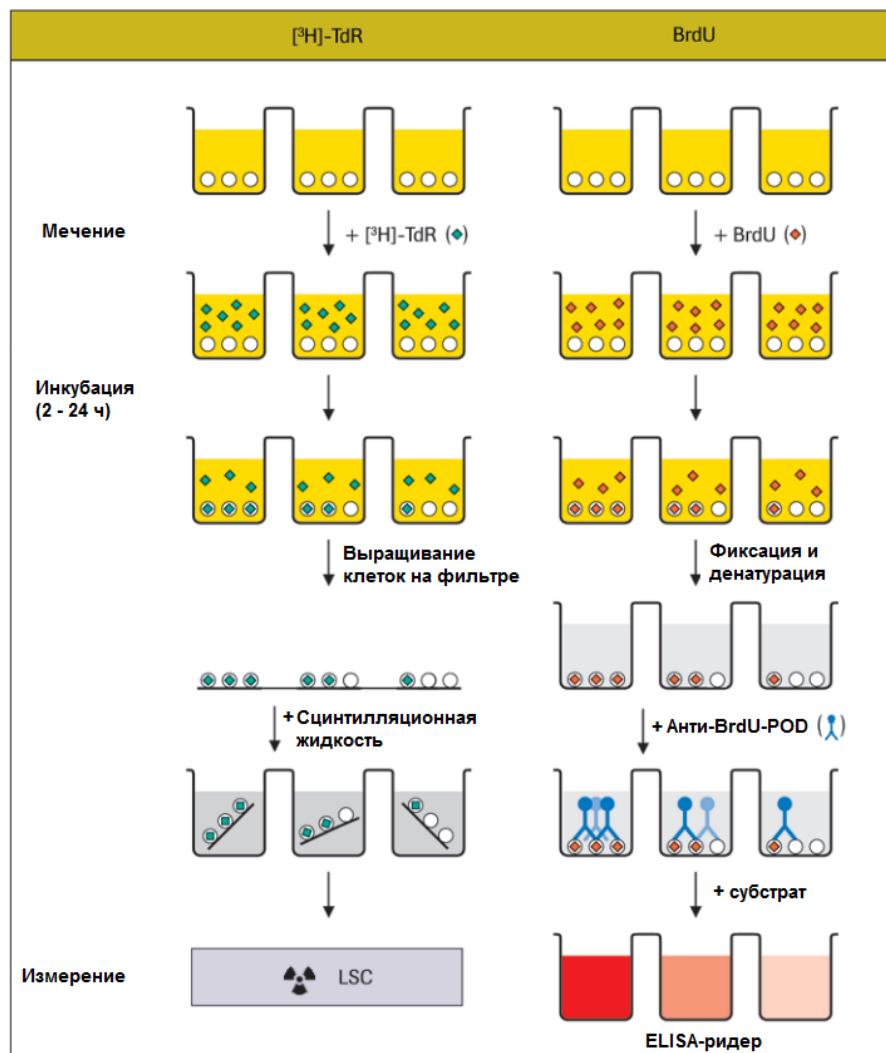


Рисунок 14 – Количественный тест на синтез ДНК с использованием модифицированных нуклеозидов [<sup>3</sup>H]-TdR и BrdU

## *Реактивы, материалы и оборудование*

Тестовый набор «Cellular DNA fragmentation ELISA», кат. № 11 585 045 001. В состав набора входят:

1. Анти-ДНК антитело (клон М-СА-33)
2. Анти-BrdU-POD, Fab-фрагменты (клон BMG 6H8)
3. Покрывающий буфер
4. Буфер для промывания
5. Буфер для инкубации
6. Раствор субстрата
7. Реагент для мечения BrdU
8. Адгезивное покрытие

Тип теста – колориметрический сэндвич-тест ELISA (от англ. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). В тесте используются два типа мышиных моноклональных антител: одно из них специфично к ДНК, другое – к BrdU (рисунок 15).

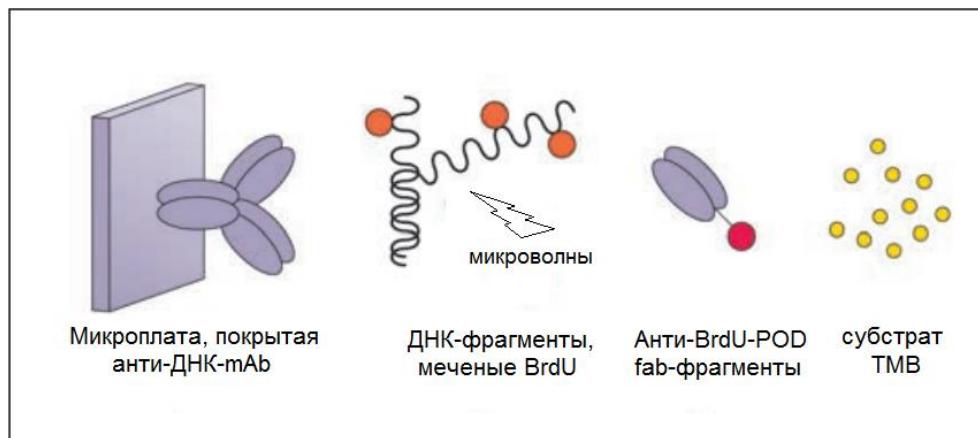


Рисунок 15 – Основные реагенты, используемые в тесте

## *Ход работы*

Подробная блок-схема 1 эксперимента отражена на рисунке 16:

1. Проводят предварительное мечение клеток BrdU.

2. Инкубируют меченные клетки в присутствии или индуктора апоптоза (исследуемого лекарственного соединения), или клеточного эфектора (для цитотоксичности, вызываемой клетками, например, Т-лимфоцитами).

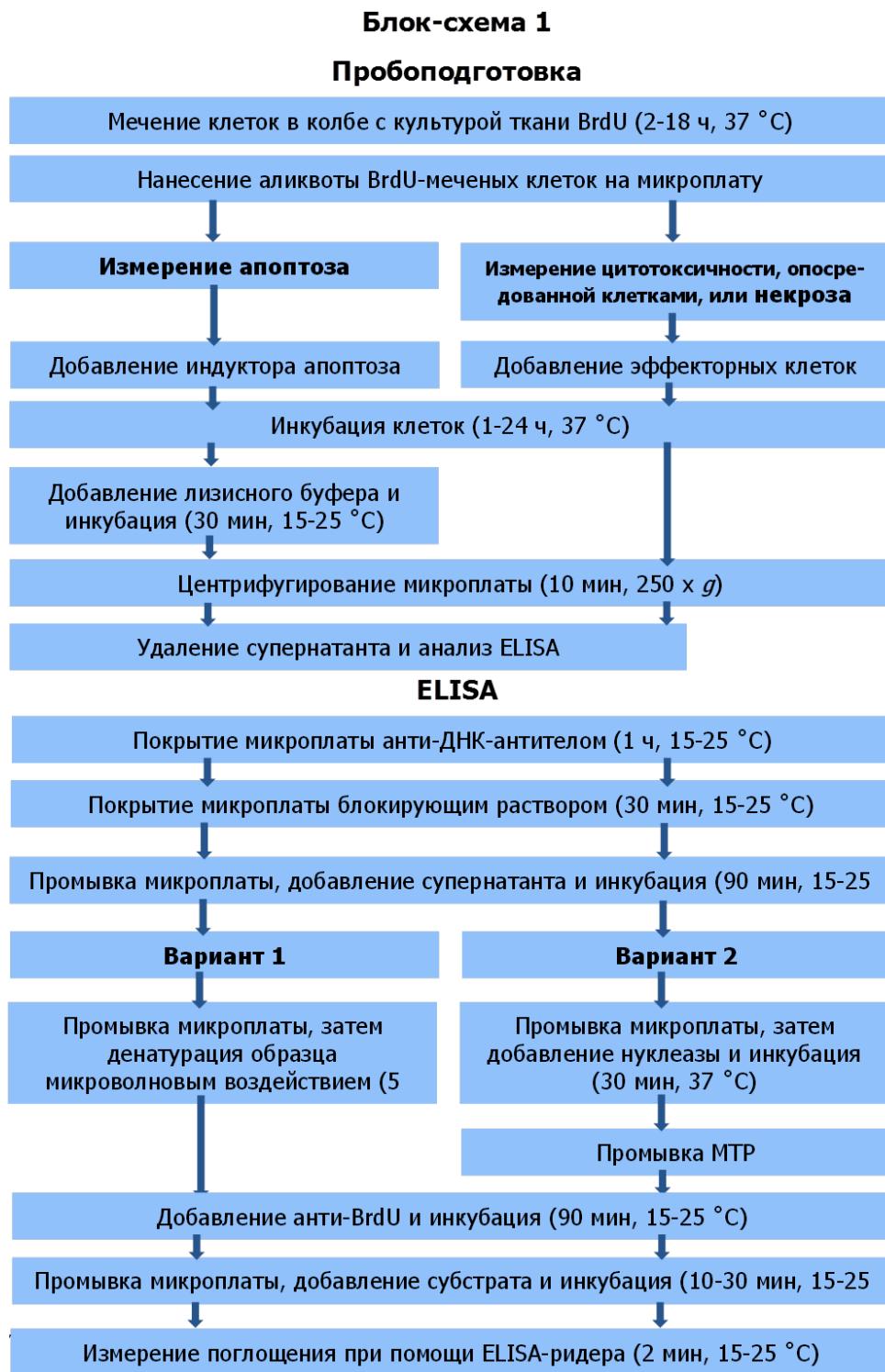


Рисунок 16 – Блок-схема эксперимента по оценке синтеза ДНК

3. По окончании инкубации клетки центрифугируют, а затем анализируют супернатант (для цитотоксичности, опосредованной клетками, или некроза) или клеточный лизат (для апоптоза). Для теста используют супернатант, содержащий низкомолекулярную ДНК. При необходимости, для теста могут быть использованы оба указанных типа образцов.

4. Абсорбируют анти-ДНК-антитело в лунках планшета.

5. Добавляют в планшет супернатант (см. п. 2). Фрагменты ДНК тестируемого образца, меченные BrdU, связываются с иммобилизованным анти-ДНК-антителом.

6. Денатурируют иммунокомплексованные BrdU-меченные ДНК-фрагменты посредством микроволнового воздействия или обработки нуклеазой. Эта процедура необходима для того, чтобы сделать доступным антиген BrdU.

7. Вводят в реакцию конъюгат анти-BrdU и пероксидазы (POD) с BrdU-меченой ДНК для образования иммунокомплекса.

8. Количественно оценивают связывание анти-BrdU-POD с иммунокомплексом при помощи субстрата пероксидазы (ТМВ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день существует большое количество тестов для высокопроизводительного скрининга цитотоксичности разрабатываемых лекарственных соединений. Безусловно, их набор не ограничивается перечисленными в данном учебно-методическом пособии. Так, к примеру, при оценке метаболического статуса клеток часто используют тесты, основанные на выявлении флуоресценции продукта метаболизма красителя Calcein-AM assay, линейка красителей ViaFluor™. При оценке работы внутриклеточных ферментов как показателя жизнеспособности часто исследуют аденилаткиназную, лактатдегидрогеназную, глутатион-S-трансферазную активности. При оценке уровня ДНК в клетках часто используют специфические флуоресцентные красители – DAPI, YOYO-1, SYBR GREEN-1, Hoechst 33258, Ethidium bromide и другие.

Каждый из скрининговых тестов имеет ряд своих преимуществ и недостатков. Так, наиболее популярным и дешевым методом скрининга разрабатываемых лекарственных препаратов до сих пор остается МТТ-тест, хотя данные МТТ-теста, основанного на активности митохондриальных редуктаз, не всегда коррелируют с выживаемостью клеток. Некоторые исследования указывают на то, что экстракты растений и редокс-активные полифенолы способны восстанавливать соли тетразолия даже в отсутствии клеток. Клоногенный тест является прямым методом определения пролиферативного потенциала клеток, к недостаткам метода можно отнести трудность интерпретации результатов колониеобразования при фазово-контрастном микроскопировании неокрашенных колоний и длительность исследования, так как подсчет колоний возможен лишь на 14–21 день. Применение метода включения тимицина ограничено неудобством использования радиоактивной метки и тем, что она связывается только с реплицирующейся ДНК в делящихся клетках. Определение внутриклеточного уровня АТФ является более чувствительным и воспроизводимым методом оценки жизнеспособности клеток в сопоставлении с МТТ-тестом, однако

требует наличия соответствующего прибора для определения хемилюминесценции, кроме того, интенсивность сигнала падает со временем.

При выборе того или иного метода скрининга цитотоксичности необходимо учитывать следующие факторы: возможность взаимодействия исследуемых лекарственных соединений либо непосредственно с компонентами тест-набора, либо с компонентами клеток, способными искажать данные о жизнеспособности клеток (к примеру, безопасные полимеры способны увеличивать проницаемость плазматической мембраны для красителей); чувствительность метода (минимально необходимое количество клеток); длительность теста; стоимость теста.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кольман, А. Байёрн Эквалл и его вклад в современную клеточную токсикологию / А. Кольман // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 10. – С. 888 – 891.
2. Гильдеева Г.Н. Актуальные проблемы доклинических исследований: переход к альтернативной *in vitro*-токсикологии / Г.Н. Гильдеева // Вестник Росздравнадзора. – 2015. - № 5. – С. 59 – 62.
3. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // J. Immunol. Meth. – 1983. - № 65. – P. 55 – 63.
4. Marshall, N.J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function / N.J. Marshall, C.J. Goodwin, S.J. Holt // Growth Regul. – 1995. – Vol. 5(2). – P. 69–84.
5. Berridge, M.V. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction / M.V. Berridge, A.S. Tan // Arch Biochem Biophys. – 1993. – Vol. 303(2). – P. 474–82.
6. CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #112. [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: <http://www.promega.com/~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20Non-Radioactive%20Cell%20Proliferation%20Assay%20Protocol.pdf>
7. Huyck, L. The XTT cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix / L. Huyck, C. Ampe, M. Van Troys // Assay Drug Dev Tech. – 2012. – Vol. 10(4). – P. 382–392.
8. Squatrito, R. Comparison of a novel redox dye cell growth assay to the ATP bioluminescence assay / R. Squatrito, J. Connor, R. Buller // Gynecologic Oncology. – 1995. – Vol. 58. – P. 101–105.
9. Bernas, T. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes / T. Bernas, J. Dobrucki // Cytometry. – 2002. – Vol. 47(4). – P. 236–42.

10. MTT Cell Proliferation Assay. Instruction Guide. American Type Culture Collection [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: <http://atcc.org/~/media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>.
11. Tominaga, H. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay / H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto // Anal Commun. – 1999. – Vol. 36. – P. 47–50.
12. Goodwin, C.J. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS / C.J. Goodwin, S.J. Holt, S. Downes, N.J. Marshall // J Immunol Methods. – 1995. – Vol. 179(1). – P. 95-103.
13. Shum, D. A high density assay format for the detection of novel cytotoxic agents in large chemical libraries / D. Shum, C. Radu, E. Kim, M. Cajuste et al. // J Enz Inhib Med Chem. – 2008. – Vol. 23(6). – P. 931–945.
14. Invitrogen alamarBlue Assay manual. [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100\\_TI%20alamarBlue%20Rev%201.1.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TI%20alamarBlue%20Rev%201.1.pdf).
15. Niles, A.L. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers / A.L. Niles, R.A. Moravec, P.E. Hesselberth et al. // Anal Biochem. – 2007. – Vol. 366. – P. 197–206.
16. CellTiter-Fluor® Technical Bulletin. [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.promega.com/~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/CellTiter-Fluor%20Cell%20Viability%20Assay%20Protocol.pdf>
17. Auld D.S. A basis for reduced chemical library inhibition of firefly luciferase obtained from directed evolution / D.S. Auld, Y-A. Zhang, N.T. Southall et al. // J Med Chem. – 2009. – Vol. 52. – P. 1450–1458.
18. Riss T.L. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays / T.L. Riss, R.A. Moravec // Assay Drug Dev Technol. – 2004. – Vol. 2(1). – P. 51–62.
19. Hans-Jürgen Rode. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation, 4th edition / Hans-Jürgen Rode // Mannheim, Germany: Roche Diagnostics GmbH, 2008.