

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11
№ госрегистрации

Инв. №



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАН РАН,

член-корреспондент РАН,

С.О.Бачурин

«25 декабря» 2015 г.

**«МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ВЕЩЕСТВ МТТ-ТЕСТОМ НА
КУЛЬТУРЕ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ MDCK-M»**

СТП-14.621.21.0008.11-2015

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.

С.Г. Ключков

« _____ » 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1. Наименование методики измерений	3
2. Назначение методики измерений и область применения	3
3. Нормативные ссылки	3
4. Погрешность измерений	4
5. Требования к показателям точности измерений	4
6. Условия измерений	4
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток млекопитающих	4
7.1. Реактивы	4
7.2. Материалы	5
7.3. Оборудование	5
8. Операции при выполнении методики определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре млекопитающих	6
8.1. Приготовление полной питательной среды	6
8.2. Подготовка клеточной линии MDCK-M к инкубированию	6
8.3. Посев клеток в 96-луночный планшет	7
8.4. Внесение соединений в 96-луночный планшет	7
8.5. Приготовление рабочего раствора МТТ	7
8.6. Выполнение МТТ-теста	8
9. Обработка и оформление результатов измерений	8
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды	9
11. Требования к квалификации операторов	10

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.11-2015 устанавливает методику «Методика определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток млекопитающих MDCK-M»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуру определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток.

Основными областями применения данной методики являются фармакология и токсикология - оценка безопасности потенциальных лекарственных препаратов различных фармакологических групп методами *in vitro*.

3. Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

4. Погрешность измерений

Не устанавливаются.

5. Требования к показателям точности измерений

В основе метода МТТ лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, растворимые в ДМСО. Уменьшение оптической плотности опытных проб по сравнению с контрольными, регистрируемое на планшетном ридере, например, Victor (Perkin Elmer, США), должно быть статистически значимым для заключения о цитотоксическом действии вещества на клетки.

6. Условия измерений

Диапазон температуры окружающей среды для проведения измерений – 18-27°C.

7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток млекопитающих

7.1. Реактивы

- среда DMEM/F12

- эмбриональная телячья сыворотка
- L-глутамин
- гентамицин
- раствор трипсина-ЭДТА 0,25%
- диметилсульфоксид
- МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия
- физиологический раствор

Все реактивы должны быть стерильными.

7.2. Материалы

- наконечники к дозаторам 0,1-5000 мкл
- флаконы культуральные площадью 25 см²
- пробирки центрифужные типа эппендорф 1,5-2,0 мл
- пробирки центрифужные 15 мл
- планшеты культуральные плоскодонные 96-луночные

Все материалы должны быть стерильными.

7.3. Оборудование

- ламинарный бокс II класса биобезопасности
- CO₂-инкубатор
- центрифуга настольная для пробирок на 15 мл, максимальное ускорение 2000 об/мин
- микроскоп инвертированный
- камера Горяева для подсчета клеток
- дозаторы одноканальные с переменным объемом 0,1-5000 мкл
- дозаторы восьмиканальные с переменным объемом 20-100 мкл
- планшетный ридер со светофильтрами близкими к 530 и 620 нм

8. Операции при выполнении методики определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток млекопитающих MDCK-M

Культура клеток MDCK-M (ATCC® CCL-34™) – собака, почка эмбриона – должна быть получена из известных источников, например Российской коллекции клеточных культур (Санкт-Петербург). Условия хранения -80°C в криохранилище.

Все операции, связанные с инкубированием клеток и приготовлением растворов проводить в стерильных условиях.

8.1. Приготовление полной питательной среды

Во флакон со средой DMEM/F12 добавить 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 1% гентамицина (не обязательный компонент). Хранить при +4°C в течение 2 недель.

8.2. Подготовка клеточной линии MDCK-M к инкубированию

Достать криопробирку с клеточной культурой из криохранилища. Пока она оттаивает приготовить культуральный флакон с 5 мл полной питательной среды.

В центрифужную пробирку перенести содержимое оттаявшей криопробирки и добавить еще 1-2 мл полной питательной среды для разбавления криопротектора. Отцентрифугировать 5 мин при 1000 об/мин. Слить надосадочную жидкость.

Ресуспендировать осадок клеток в 1 мл полной питательной среды и перенести в культуральный флакон.

На флаконе подписать название культуры и дату посева. Поместить флакон в CO₂-инкубатор (5% CO₂, влажная атмосфера).

8.3. Посев клеток в 96-луночный планшет

Достать флакон из CO₂-инкубатора и удалить питательную среду.

Промыть клетки дважды теплым дезинтегратором трипсин-ЭДТА 0,25% объемом 2 мл. С остаточным объемом дезинтегратора флакон поместить в CO₂-инкубатор на 7 мин.

Убедившись, что клетки открепилась, перевести их из монослоя в суспензию, перенести в центрифужную пробирку, центрифугировать 5 мин при 1000 об/мин, удалить надосадочную жидкость. Осадок ресуспендировать в 2 мл полной питательной среды и посчитать количество клеток с помощью камеры Горяева.

Приготовить суспензию клеток 1 млн клеток в 10 мл полной питательной среды. Посеять клетки в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл клеточной суспензии на лунку (10⁴ клеток в каждой лунке), поместить в CO₂-инкубатор.

8.4. Внесение соединений в 96-луночный планшет

Тестируемые вещества растворить в ДМСО в концентрации 10⁻² М. После 24 часов инкубации к культуре клеток MDCK-M добавить методом раститровки различные концентрации тестируемых соединений (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 и 1.56 мкМ). Каждую концентрацию выполнить в трех повторностях. В контрольные лунки добавить растворитель ДМСО в концентрации не более 1%. Конечный объем среды в лунке должен составлять 200 мкл. Планшет с внесенными соединениями поместить в CO₂-инкубатор.

8.5. Приготовление рабочего раствора МТТ

200 мг МТТ растворить в 40 мл теплого физиологического раствора (5мг/мл). Оставить для растворения на сутки, затем профильтровать. Хранить раствор МТТ при +4°C в защищенном от света месте. Раствор стабилен не меньше месяца.

8.6. Выполнение МТТ-теста

После 72 часов инкубации клеточной линии MDCK-M с опытными веществами внести в каждую лунку по 20 мкл рабочего раствора МТТ. Инкубировать еще 2 часа в условиях CO₂-инкубатора. Через 2 часа достать планшет из CO₂-инкубатора, заменить в каждой лунке среду на раствор ДМСО. Аккуратно встряхнуть планшет до растворения кристаллов формазана. С помощью планшетного ридера (например, Victor, PerkinElmer) определить оптическую плотность каждой лунки при 530 нм, вычесть измеренное фоновое поглощение при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), определить на основе дозозависимых кривых и/или с помощью программного обеспечения (например, OriginPro 9.0).

9. Обработка и оформление результатов измерений

Обработка результатов измерений осуществляется с помощью программного обеспечения WorkOut 2.5 (DazDag Ltd), установленной на рабочей станции планшетного ридера Victor3.

Выживаемость клеток MDCK-M в присутствии исследуемого вещества рассчитывается по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность.

При этом ОП не должна превышать 0,05 ед. (по шкале 0,0–1,0)

Стандартное отклонение рассчитывается по формуле: $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$, где \bar{x} — выборочное среднее значение (число1, число2, ...), n — размер выборки.

Концентрация вещества, которая вызывает 50% гибель клеток (IC₅₀), рассчитывается графически по дозозависимой кривой с помощью

программного обеспечения Origin (OriginLab Corporation). Значение функции

рассчитывается по формуле: $y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(LOGx_0 - x)p}}$, а значение IC50 по формуле: $EC50 = 10^{LOGx_0}$.

Результаты измерений оформляются в виде таблиц, с использованием табличного редактора MS Excel. В общем случае таблица имеет следующие графы:

ИД/шифр/код образца	Даты выполнения измерений	Значения показателя	Примечания	ФИО и подпись исполнителя

10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

11. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки.

Валидация методики определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток млекопитающих MDCK-M

Валидация процесса определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток млекопитающих MDCK-M проводилась в экспериментах по исследованию известных противоопухолевых агентов – камптотецина и даунорубицина.

Изучение цитотоксичности веществ по отношению к нормальным клеткам играет важнейшую роль в изучении токсичности потенциальных противоопухолевых препаратов. Для дальнейших доклинических исследований важно определить соотношение цитотоксичности изучаемых соединений на опухолевых клетках к цитотоксичности на нормальных клетках.

В рамках валидации метода определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток млекопитающих MDCK-M был проведен эксперимент по оценке цитотоксичности двух известных противоопухолевых агентов: камптотецина (хинолинового алкалоида, ингибитора топоизомеразы I) и даунорубицина (антрациклинового антибиотика, интеркалятора ДНК).

В результате эксперимента было установлено, что IC₅₀ камптотецина составляет $2,31 \pm 0,31$ мкМ, а даунорубицина $0,32 \pm 0,00$ мкМ.

Данные эксперимента по валидации представленного метода определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток человека MDCK-M подтверждают пригодность метода для оценки цитотоксичности различных химических веществ, включая потенциальные лекарственные противоопухолевые препараты.

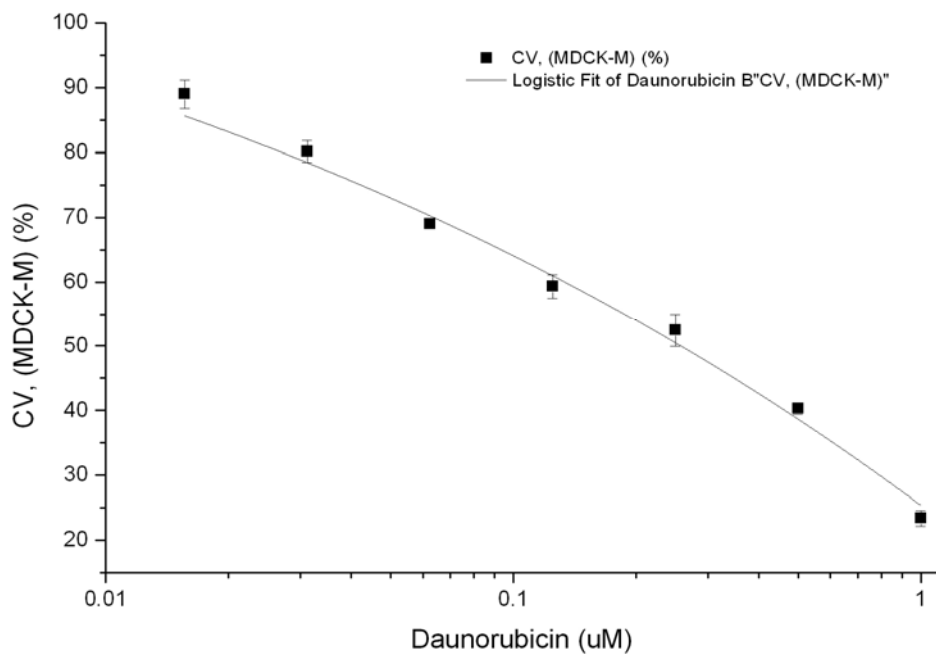


Рис.1. График дозозависимой кривой доксорубина в отношении клеток MDCK-

М

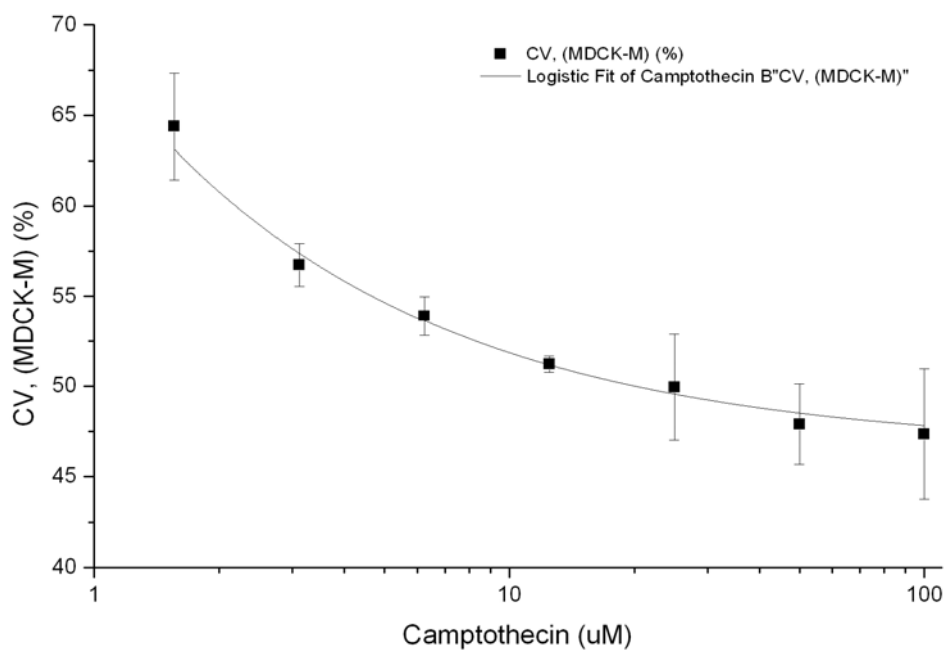


Рис.2. График дозозависимой кривой камптотецина в отношении клеток MDCK-M