

STANOVENÍ CYTOTOXICITY LÉČIV *IN* *VITRO* (XTT ASSAY)

LENKA BRŮČKOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

*Centralizovaný rozvojový projekt MŠMT č. C29:
„Integrovaný systém vzdělávání v oblasti výskytu a eliminace reziduí léčiv v
životním prostředí“*



Vyučující:

Mgr. Lenka Brůčková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Teoretická část práce a princip úlohy:

Mezi základní testy hodnotící cytotoxickou aktivitu exogenních agens chemické nebo fyzikální povahy patří metoda využívající redukci tetrazoliových solí na barevné formazany. Tento způsob detekce využívá schopnosti buněk přeměnit mírně zbarvenou tetrazoliovou sůl na sytě zbarvený formazan. Tetrazoliové soli jsou kvartérní amoniové soli, jejich konverze probíhá v mitochondriích buněk a je uskutečněna působením aktivity dehydrogenáz a kofaktorů NADH a NADPH. Jedná se o strukturně velice podobné látky, které tvoří produkt s absorpčním maximem při různé vlnové délce. Test se standardně provádí na mikrotitračních destičkách. Na spektrofotometru snadno měřitelná intenzita zabarvení odpovídá množství přítomných metabolizujících mitochondrií, respektive živých buněk a umožňuje stanovit rozdíly v buněčné viabilitě mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Množství takto vzniklého formazanu se snižuje s klesající viabilitou buněk, respektive aktivitou dehydrogenáz.

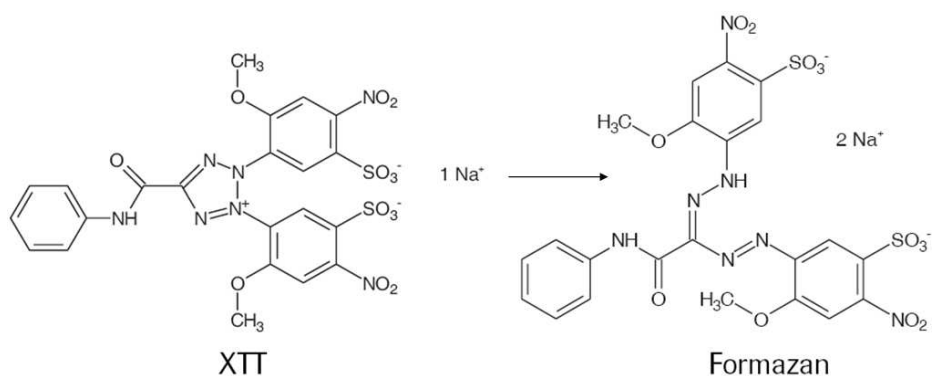
Princip úlohy:

XTT metoda byla poprvé použita v roce 1988 pro stanovení viability buněk. Solubilní sloučenina XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) je v živých buňkách redukována na ve vodě rozpustný oranžový formazan pomocí enzymu sukcinátetrazoliumreduktázy (**Obrázek 1**). Enzym podílející se na této přeměně je mitochondriální dehydrogenáza, která je přítomna jen v životaschopných buňkách. Mnoho buněčných linií redukuje XTT s malou účinností. Z toho důvodu je do reakce přidáván fenazin methosulfát (PMS). Po tomto přídatku dojde k výraznému zvýšení buněčné redukce XTT. Vzniklý ve vodě rozpustný formazan je kvantifikován spektrofotometrem při vlnové délce 470 nm. Intenzita absorbance je přímo úměrná množství živých buněk¹.

Modifikací XTT je MTT test. Žlutá sůl MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) je mitochondriálními dehydrogenázami dýchacího řetězce redukována na fialový formazan. Na rozdíl od XTT testu musí být u MTT metody použito

rozpuštědlo, ve kterém se rozpouští vzniklý formazan. Rychlost tvorby formazanu odpovídá aktivitě dýchacího řetězce a odráží tak metabolickou aktivitu buňky.

Další test využívá MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) nebo ve vodě rozpustné tetrazoliové soli (WSTs)².



Obrázek 1: Tetrazoliová sůl (XTT) se přemění pomocí sukcinátetrazoliumreduktázy, která je lokalizována v mitochondriích metabolicky aktivních buněk, na barevný formazan (Roche Applied Science).

V experimentu se provede stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz prostřednictvím substrátu XTT u leukemické linie MOLT-4 po působení nově syntetizovaných léčiv.

Příprava buněčných linií:

Práce v laboratoři buněčných linií si vyžaduje vysoké požadavky na sterilitu práce. Nezbytnou výbavou pro kultivaci buněčných linií je CO₂ inkubátor, laminární box, mikroskop, centrifuga a vodní lázeň. Velice výhodný je také analyzátor částic, kterým se stanovuje počet a životaschopnost buněk. Provoz v laboratoři buněčných linií se řídí pravidly sterility práce např. používáním ochranných pomůcek (jednorázové pláště, ústní roušky, speciální obuv do laboratoře apod.), UV-lamp a také každodenním úklidem. Nutností je oddělení kulturační místnosti a přípravný od ostatních prostor, dále je vhodné zajistit omezený a kontrolovatelný přístup osob, apod.

1. část: Pasážování suspenzních buněk MOLT-4:

Termínem pasážování označujeme přenesení buněk do nových kultivačních lahví, kde mohou buňky dále růst v prostředí nového média.

Pomůcky:

kultivační nádoby, sérologické pipety, automatický pipetor, Pasteurova pipeta, mikropipety, vodní lázeň (37 °C), centrifugační zkumavky, centrifuga, laminární box, CO₂ inkubátor (37 °C) a analyzátor Casy (Roche)

Roztoky:

sterilní roztok 1% PBS, sterilní kompletní kultivační médium pro MOLT-4

Postup práce:

Před začátkem práce se do vodní lázně vloží roztok PBS a kultivační médium k vytemperování na 37 °C. Buňky se převedenou z kultivační láhve pomocí sérologické pipety do zkumavky, poté se centrifugují při 1500 rpm/5 min. Supernatant se odstraní Pasteurovou pipetou do odpadu a na buněčnou peletu se nanese 1 ml kultivačního média. Z takto připravené suspenze buněčné linie se provede počítání buněk na analyzátoru Casy (Roche) přenesením 10 µl buněčné suspenze do předem připravené nádobky pro počítání, ve které je 9990 µl Casy pufu.

Do nové kultivační nádoby se přenesou čerstvé kultivační médium. Objemy kultivačního média se liší podle velikosti kultivační nádoby: kultivační láhev 25 cm² - 5 ml kultivačního média; kultivační láhev 75 cm² - 10 ml kultivačního média; kultivační láhev 175 cm² - 75 ml kultivačního média. Do připravených kultivačních nádob se pipetuje takový objem buněk, aby výsledná koncentrace byla 3×10⁵/ml. K výpočtu se použijí data z analyzátoru Casy. Buňky se ovlivní testovanými léčivy a inkubují po dobu 24 h, při 37 °C a 5% CO₂.

Po inkubaci se buněčná suspenze převede z kultivační láhve pomocí sérologické pipety do zkumavek, které se centrifugují při 1500 rpm/5 min. Supernatant se odstraní Pasteurovou pipetou do odpadu a na buněčnou peletu se přidá 6 ml PBS. Buněčná suspenze se centrifuguje při 1500 rpm/5 min. Supernatant se odstraní Pasteurovou pipetou do odpadu a na buněčnou peletu se přidá 1 ml kultivačního média. Ze suspenze se provede počítání buněk na analyzátoru Casy (Roche) přenesením 10 µl buněčné suspenze do předem připravené nádobky pro počítání s Casy pufrem. Ze získaných dat se vypočítá potřebné množství kultivačního média, které je nutné k naředění buněk na výslednou koncentraci 2×10⁶/ml.

2. část: Stanovení cytotoxicity léčiv prostřednictvím kvantifikace aktivity mitochondriálních dehydrogenáz buňky (XTT test)

Cíl: Stanovit cytotoxický efekt nově syntetizovaných léčiv po 24 hodinovém působení na buňky T- lymfoblastické leukemie MOLT-4

Pomůcky:

automatické pipety, destička mikrotitrační - 96 jamek, electron-coupling reagent (ECR), XTT labeling reagent, spektrofotometrický reader pro mikrotitrační destičky, špičky, centrifugační zkumavky 15 ml kónické

Použité buňky:

nádorová buněčná linie T lymfoblastů: MOLT-4

Použité roztoky:

sterilní roztok 1% PBS, sterilní kompletní kultivační médium pro linii MOLT-4, testované látky: nově syntetizovaná léčiva

Postup práce:

Nasazení buněk MOLT-4 do kultivačních falkon a jejich ovlivnění testovanými látkami proběhne 24 hodin před praktickým cvičením.

Do mikrotitrační destičky se v prvním kroku nanese po 100 μ l suspenze ovlivněných buněk MOLT-4 (koncentrace 200 000 bb/100 μ l média) a kontrol. Vynechají se jamky, kde se přidá pouze samotné médium. Jednotlivé vzorky i kontroly se testují ve 3 opakováních.

Namíchá se potřebné množství XTT směsi (XTT labeling mixture), na jednu jamku se pipetuje 100 μ l směsi. Potřebné množství XTT směsi se získá smícháním 50 μ l XTT (XTT labeling reagent) + 1 μ l ECR (electron coupling reagent). Během experimentu se vypočte celkové množství XTT a ECR, které je potřeba smíchat k získání dostatečného množství reagens pro provedení pokusu o daném počtu obsazených jamek mikrotitrační destičky. Tento postup se neprovádí na přímém světle. Směs XTT se dává co nejrychleji tak, aby nedošlo k ovlivnění reakce časovou prodlevou. Po přidání XTT směsi se destička přenese do vlhčeného inkubátoru a buňky s reagens se inkubují při 37° C v kontrolované 5% CO₂ atmosféře.

Měření absorbance pomocí spektrofotometru a vyhodnocení získaných dat:

Před přidáním XTT směsi se zapne spektrofotometrický reader pro mikrotitrační destičky na měření absorbance. Nastaví se vlnová délka a vytvoří se protokol pro měření absorbance při 470 nm.

Po napipetování XTT směsi se vytáhne destička z vlhčeného inkubátoru a pomocí spektrofotometru pro měření mikrotitračních destiček se kvantifikuje absorbance. Po skončení měření se destička vrátí do inkubátoru. Měření se opakuje ještě 2 h od přidání XTT směsi.

Experiment se vyhodnotí. Pro zhodnocení se použije průměrná hodnota absorbance v 3 jamkách. Odečte se hodnota průměrné absorbance v čase 0 h od průměrné absorbance v čase 2 h. Průměrná hodnota absorbance neovlivněných buněk se rovná 100% viabilitě. Vyjádří se hodnota jednotlivých vzorků testovaných léčiv i dalších kontrol v % buněčné viability.

Závěr:

Stanovení cytotoxicity testovaných léčiv se provedlo prostřednictvím kvantifikace aktivity mitochondriálních dehydrogenáz buňky, tzv. XTT testem. Uveďte výsledky viability pozitivní a negativní kontroly a výsledky screeningu všech testovaných vzorků.

PK %	VZ1 %	koncentrace léčiva:
NK %	VZ2 %	koncentrace léčiva:
		VZ3 %	koncentrace léčiva:

Likvidace odpadů:

Použitý materiál a mikrotitrační destičky se zlikvidují do připravených odpadních nádob. Tento materiál se uzavře do sterilizačních nádob a odveze se na sterilizaci a dále se odveze přímo do spalovny.

Literatura:

¹SCUDIERO, D.A., SHOEMAKER, R.H., PAULL, K.D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T.H., CURRENS, M.J., SENIFF, D., BOYD, M.R. *Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines*. Cancer Res., 1988, vol. 48, no. 17, p. 4827-4833.

²SCHANTZ, J.T., NG, K.W. *A Manual for Primary Human Cell Culture*. Singapore : World Scientific Publishing, p. 151, 2004.