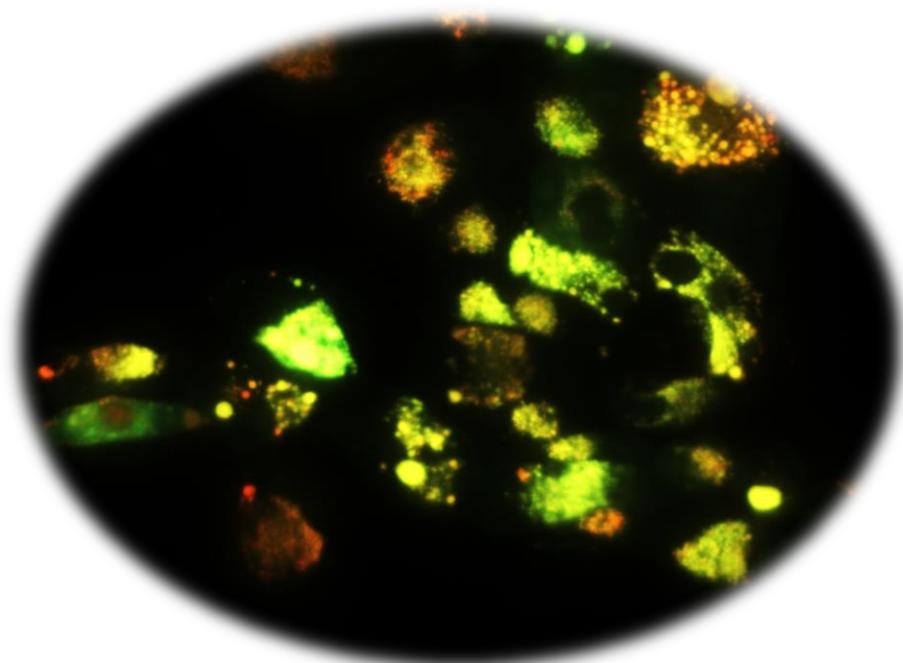


А.Ю. Прилепский
А.С. Дроздов
В.А. Богатырев
С.А. Староверов

**МЕТОДЫ РАБОТЫ С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ
И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ**



Санкт-Петербург
2019

Министерство образования и науки
Российской Федерации

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

А.Ю. ПРИЛЕПСКИЙ
А.С. ДРОЗДОВ
В.А. БОГАТЫРЕВ
С.А. СТАРОВЕРОВ

**МЕТОДЫ РАБОТЫ С КЛЕТОЧНЫМИ
КУЛЬТУРАМИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ
НАНОМАТЕРИАЛОВ**

Учебно-методическое пособие

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология
в качестве учебно-методического пособия для реализации образовательных
программ высшего образования магистратуры

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург

2019

Прилепский А.Ю., Дроздов А.С., Богатырев В.А., Староверов С.А. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов – СПб: Университет ИТМО, 2019. – 43 с.

Рецензенты:

Кошель Елена Ивановна, кандидат биологических наук, доцент (квалификационная категория "ординарный доцент") химико-биологического кластера, Университета ИТМО.

В пособии изложены основные методы работы с адгезионными животными клеточными культурами, приведены примеры определения цитотоксичности наночастиц с использованием оценки митохондриальной дыхательной активности (МТТ-теста), окраски флуоресцентными и абсорбционными красителями, дано описание необходимой лабораторной техники: ламинарного бокса, инкубатора, инвертированного микроскопа, счетчика клеток. Пособие направлено на выработку базовых навыков работы с клеточными культурами при проведении токсикологических экспериментов.

Предназначено для студентов-магистрантов химико-биологического кластера Университета ИТМО, обучающихся по программе Молекулярная биология и биотехнология (дисциплина «Нанотоксикология» и «Перспективные материалы для биомедицинских применений»), а также может быть рекомендовано студентам естественно-научного профиля при выполнении ими ряда работ в специализированных практикумах.



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2019

© Прилепский А.Ю., Дроздов А.С., Богатырев В.А., Староверов С.А., 2019

Оглавление

Оглавление.....	3
Введение.....	4
1. Общие принципы работы с клеточными линиями	6
2. Определение жизнеспособности	12
3. Протоколы работы с клеточными культурами	14
3.1. Протокол приготовления полной среды DMEM	14
3.2. Поддержание культуры	17
3.2.1. Нарботка первичной биомассы.....	17
3.2.2. Пересев клеток	17
3.2.3. Смена среды.....	19
3.3. Замораживание и размораживание клеток.....	21
3.3.1. Замораживание культуры.....	21
3.3.2. Размораживание культуры.....	22
4. Протоколы определения жизнеспособности.....	23
4.1. Протокол МТТ-теста	23
4.2. Окрашивание флуоресцентными красителями.....	26
4.3. Получение и обработка изображений на микроскопе Leica DMI 3000B	28
4.4. Окрашивание трипановым синим	35
5. Статистика	36
5.1. Критерий Стьюдента	36
5.2. Правило трех сигм	38
Список терминов.....	40
Список литературы	42

Введение

Культуры клеток – метод сохранения в жизнеспособном состоянии клеток животных или растений. Культуры клеток *in vitro* представляют собой генетически однородную популяцию, в связи с чем активно используются в генетике, иммунологии, биотехнологии, вирусологии для решения целого круга экспериментальных задач: выяснения причин и механизмов клеточной гибели и перерождения, получения фармацевтических препаратов, в том числе высокоспецифических антител (иммуноглобулинов), тестирования новых лекарств, изучения токсичных свойств различных субстанций и многое другое.

Первые опыты по выращиванию клеток и тканей животных вне организма были сделаны в начале XX века. Возможности использования метода возросли после того, как научились получать изолированные клетки из различных животных тканей путём их обработки протеолитическими ферментами, растворяющими межклеточное вещество. Этот принцип до сих пор применяется при первичном выделении клеток из тканей и пересевах для отделения их от субстрата (культурального пластика, подложки). Следующая задача – обеспечить условия инкубационной среды, близкие к физиологическим, и невозможность попадания и развития чужеродных организмов (контаминации). Исследователь может изменять эти условия в определённых пределах, что позволяет ему оценивать влияние на рост клеток самых различных факторов – pH, температуры, концентрации аминокислот, витаминов и других веществ. Более того, при работе с культурами клеток существенные результаты могут быть получены при использовании очень небольшого числа клеток. Например, эксперименты, требующие для выяснения того или иного вопроса 100 крыс или 1000 человек, могут быть с равной статистической достоверностью поставлены на 100 культурах на покровных стёклах. Это является важным преимуществом, когда касается человека, и, кроме того, снимает многие этические проблемы, возникающие при необходимости использовать для экспериментов большую группу животных.

Поскольку клетки в культуре легко доступны для различных биохимических манипуляций, при работе с ними токсиканты, лекарства, гормоны и др. могут быть введены в культуральную среду в заданной концентрации и в течение заданного периода. Количество этих веществ может быть на порядок меньше, чем при экспериментах на животном, что является немаловажным преимуществом при работе с дорогостоящими реактивами. Исчезает также опасность того, что исследуемое вещество метаболизируется печенью, запасается мышцами или экскретируется почками. При использовании клеточных культур, как правило, бывает нетрудно установить, что при определённой концентрации добавленное в культуру вещество находится в контакте с клетками в течение данного периода времени. Это обеспечивает получение реальных значений скорости поглощения или распада исследуемых веществ.

Очевидные преимущества работы с генетически однородными клетками и тканями в контролируемых условиях вне организма по сравнению с проведением опытов на целых организмах делают этот метод одним из наиболее универсальных в медико-биологических исследованиях. Клеточные культуры используются для изучения закономерностей *пролиферации* и контролируемой гибели [1, 2].

Работа с животными клеточными культурами требует соблюдения строгих правил, в частности, по отношению к стерильности. В данном учебно-методическом пособии даны рекомендации по основным этапам работы с клеточными адгезионными культурами: приготовление культуральной среды, наработка клеточной биомассы, поддержание культуры, её замораживание и размораживание, определение жизнеспособности клеток после воздействия серебряных наночастиц.

Определение жизнеспособности клеток после воздействия наночастиц представляет определенную сложность, в основном связанную с неконтролируемым вкладом наночастиц в общую оптическую плотность раствора в лунке планшета. Происходит это из-за изменений, вызванных агрегацией наночастиц в культуральной среде, а также их взаимодействием с молекулами красителя или другого реагента, используемого для определения жизнеспособности. В силу этого в работе дано описание нескольких базовых способов определения жизнеспособности клеток, позволяющих при одновременном их применении получить корректный результат [3]. Предназначено для студентов-магистрантов химико-биологического кластера Университета ИТМО, обучающихся по программе Молекулярная биология и биотехнология (дисциплина «Нанотоксикология» и «Перспективные материалы для биомедицинских применений»), а также может быть рекомендовано студентам естественно-научного профиля при выполнении ими ряда работ в специализированных практикумах.

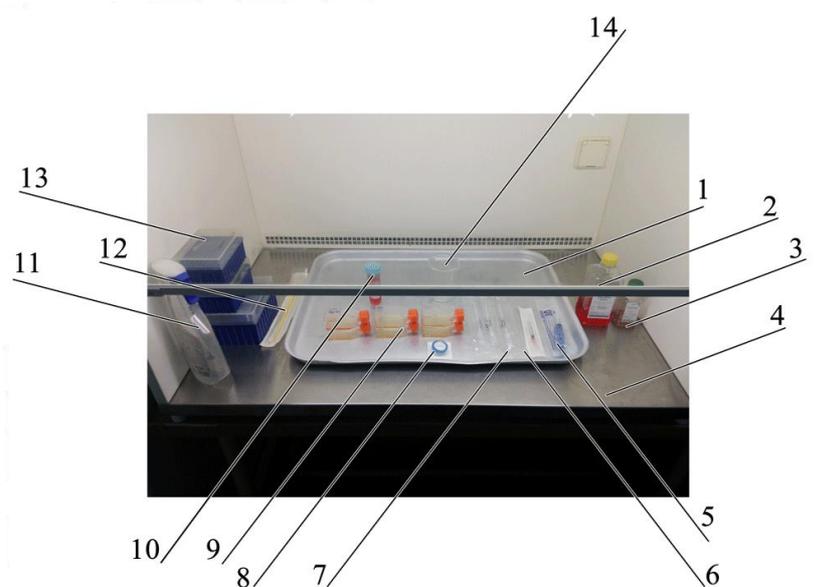


Рисунок 1. Примерное расположение предметов внутри ламинара: 1 – поднос (полностью стерильная зона), 2 – неполная среда DMEM, 3 – сыворотка крови плодов коровы, 4 – рабочая область для размещения нестерильных объектов, 5 – шприц на 10 мл, 6 – шприц на 1 мл, 7 – пипетки Пастера, 8 – шприцевая фильтр-насадка, 9 – флаконы с культурами клеток, 10 – новая полная среда, 11 – этанол в пульверизаторе, 12 – шпатель для снятия клеток, 13 – наконечники для автоматических пипеток, 14 – стакан для слива старой среды

1. Общие принципы работы с клеточными линиями

1. Вся работа с культурами клеток осуществляется только в чистом помещении в пределах ламинарного бокса (рис. 1). Находиться в чистом помещении разрешается только в халате и сменной обуви.

2. Перед началом любой работы нужно убедиться, что все необходимые реактивы и инструменты находятся в чистом помещении. Это необходимо, чтобы не выходить и не заходить в чистое помещение во время работы.



Рисунок 2. Полное УФ-облучение бокса. Включена потолочная УФ-лампа, бактерицидная камера (справа), рециркулятор воздуха (не видно на фото) и УФ-облучение внутри ламинара (слева). Полное облучение бокса необходимо проводить раз в неделю

3. Перед любыми операциями в боксе необходимо включить ультрафиолетовое (УФ) облучение в ламинаре минимум на 30 минут. Если для работы необходимы нестерильные инструменты, которые невозможно обработать в автоклаве, то необходимо протереть их 70% этанолом и положить в бокс под УФ-лампу. После облучения рабочие поверхности бокса необходимо дополнительно протереть салфеткой, смоченной этанолом, особое внимание уделить местам, недоступным для УФ-облучения. **Работать в боксе с включенной УФ-лампой запрещается!**

4. Дезинфекция поверхностей осуществляется 70% этанолом или 6% перекисью водорода, однако у перекиси водорода есть один недостаток: после неё остаются белые следы, которые смываются только водой. К тому же с перекисью водорода разрешается работать только в перчатках. Намного практичнее использовать 70% этанол. Его удобно хранить в банке с пульверизатором, это облегчит как обработку поверхностей, так и рук. Для обработки поверхностей необходимо использовать специальные стерильные безворсовые салфетки для чистых помещений, однако можно пользоваться и обычной стерильной ватой или обеззоленной бумагой, сложенной в несколько раз. Поверхности бокса необходимо протирать этанолом после работы, а также проводить тщательную очистку бокса, инкубаторов и



Рисунок 3. Настенный рециркулятор воздуха. Обеспечивает дезинфекцию воздуха с помощью УФ-ламп, размещенных внутри. Рециркулятор необходимо включать раз в неделю во время полного облучения бокса

чистого помещения минимум раз в месяц.

5. Удобно, когда в ламинарном боксе – две зоны чистоты: полностью стерильная зона, где располагаются исключительно стерильные объекты, такие как крышки от пробирок с новой средой, флаконы с клетками, пипетки Пастера, фильтры, шприцы с иглами, сыворотка (обычно такой зоной является металлический поднос с закругленными углами, расположенный по центру бокса, который можно продезинфицировать более тщательно); зона, которая также обрабатывается УФ и этанолом, но где могут располагаться емкости с неполной средой, взятые из холодильника, коробки со стерильными типсами, автоматические пипетки и другие нестерильные объекты (обе зоны указаны на рис. 1).

6. Перед началом работы необходимо вымыть руки и запястья с мылом. Работу в боксе осуществлять в халате, верхняя одежда под халатом должна быть с коротким рукавом, чтобы её края не выглядывали из-под халата.

Работать с клетками нужно в неопудренных стерильных перчатках или без перчаток, однако в обоих случаях необходимо обрабатывать руки этанолом, уделяя особое внимание кончикам пальцев и пространству между пальцами. При работе необходимо следить, чтобы рукава халата не задевали открытые флаконы, крышки и т.д.

7. Культивирование клеток осуществляется в специальных культуральных флаконах, пробирках со скошенным дном или планшетах (рис. 4). Флаконы используются для рутинной наработки биомассы и поддержания клеточной культуры. Существуют разные флаконы, отличающиеся типом крышек, наличием вентиляции, объемом, материалом пластика и т.п. В нашей лаборатории используются флаконы объемом не более 40 мл, это минимизирует количество затрачиваемой на поддержание культуры среды, а количество клеток в одном флаконе достаточно для проведения полноценного МТТ-теста. Каждый флакон, пробирка и планшет должны быть подписаны с указанием названия клеточной культуры и датой посева, а в лабораторном журнале должно быть также указано, с чем инкубируется данная культура. Ознакомиться с видами посуды для культивирования и заказать её можно на сайте компании РосМедБио [4].



Рисунок 4. Лабораторный пластик для культивирования клеток. Верхний ряд, слева направо: планшеты на 6, 12, 24, 96 лунок. Нижний ряд, слева направо: культуральный флакон, пробирка со скошенным дном, криопробирка



Рисунок 5. Внутренний вид инкубатора с подачей CO₂. Внизу установлена емкость с раствором медного купороса. Стрелкой показан кожух датчика CO₂

8. Культивирование большинства клеточных линий осуществляется в специальных инкубаторах при 37°C и 5% CO₂. Внутреннее пространство инкубатора должно поддерживаться в чистоте, разрешается размещать в нем только клеточные линии во флаконах или планшетах. Если в инкубаторе предусмотрена ванна для увлажнения воздуха, в неё необходимо наливать только

дистиллированную воду и добавлять несколько капель концентрированного раствора медного купороса (цвет воды в ванне должен быть голубым). Раз в месяц следует извлечь из инкубатора все разборные детали (стойки, полки) и провести их тщательную дезинфекцию этанолом или 6% перекисью водорода. При работе с инкубатором открывать дверцу только на необходимое для извлечения флаконов расстояние, не держать дверцу открытой долго. Особое внимание уделить датчику CO₂. Его схематическое устройство представлено на рис. 6. Сверху датчик закрыт воздухопроницаемым жестким пористым кожухом. Так как внутри инкубатора поддерживается высокая влажность, создается опасность размножения грибов, плесени или бактерий в порах кожуха. Это может приводить к завышению показателей CO₂ на несколько процентов. Поэтому при обнаружении превышения концентрации углекислого газа внутри

инкубатора, в первую очередь, нужно снять и прочистить кожух датчика и осмотреть сам датчик, после этого произвести калибровку согласно инструкции, прилагаемой к инкубатору.

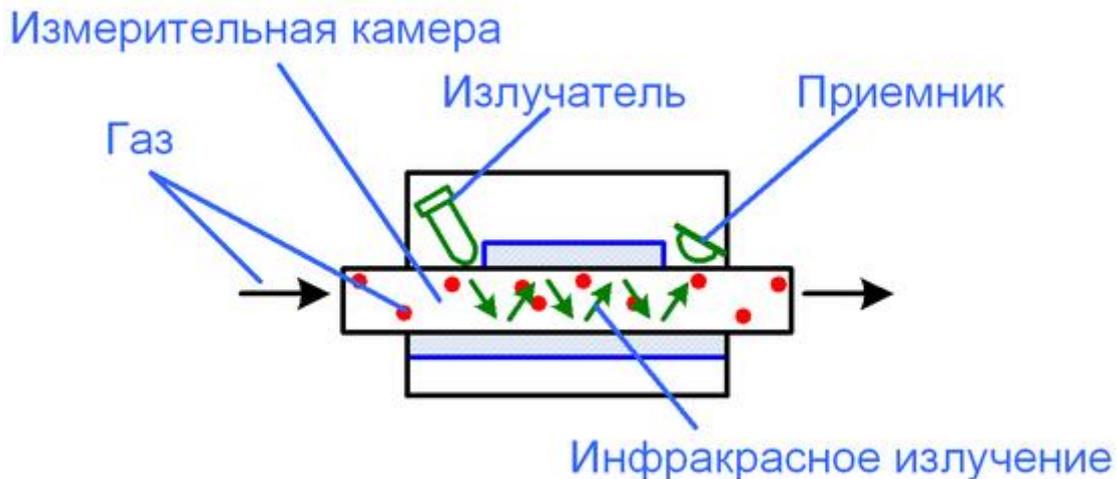


Рисунок 6. Схема работы датчика углекислого газа. Излучатель представляет собой маломощный инфракрасный диод с длиной волны испускаемого света 4 мкм, работающего в импульсном режиме. После прохождения через воздух, насыщенный CO₂, свет ослабляется, и это изменение детектируется. Сравнивая интенсивность излученного и принятого света, можно установить концентрацию CO₂

9. Клеточные культуры по способу культивирования могут быть адгезионными или суспензионными. Для адгезионных клеточных культур, которым посвящено это пособие, нормальным является состояние, в котором клетки образуют монослой на ростовой поверхности флакона. Форма большинства адгезионных здоровых клеток – веретенообразная (рис. 11). Суспензионные культуры свободно находятся в культуральной среде, не образуют монослой, но могут объединяться в агрегаты, содержащие до нескольких тысяч клеток. Существуют еще культуры тканей, которые инкубируют в специальной среде.

Клеточные культуры приобретаются в коллекциях клеточных культур или в специализированных фирмах. Основными являются:

- Биолот [5]
- Российская коллекция клеточных культур в Институте цитологии РАН [6]
- НИИ канцерогенеза в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина [7].

Клеточные культуры поставляются в замороженном виде или в культуральном флаконе, полностью заполненном средой (рис. 7). Второй способ является предпочтительным, поскольку позволяет сразу начать работу с клеточной культурой.

10. Необходимо помнить, что все клеточные культуры при интенсивном использовании рано или поздно начинают стареть и погибать (говорят, что культура «вырождается»). Время жизни культуры зависит от интенсивности пересевов и физиологических особенностей клеток и изменяется в пределах от нескольких недель до 2–3 лет. Первым признаком гибели является утончение веретенообразных клеток, когда на их концах появляются длинные узкие выпячивания мембраны. Помимо этого, клетки открепляются от флакона даже через несколько дней после пересева или смены среды (рис. 11). Чтобы постоянно иметь доступ к молодой культуре, клетки специальным образом замораживают.



Рисунок 7. Культуральный флакон для перевозки клеточных культур

11. Основными процедурами для поддержания клеточных линий являются пересев и смена среды. В зависимости от скорости роста культуры пересев можно делать раз в неделю или чаще. Определить необходимость пересева можно по следующим признакам: клетки открепляются от флакона, цвет среды изменяется с красно-оранжевого на желтый, под микроскопом в среде видно очень много округлых клеток. Смена среды осуществляется минимум раз в неделю, при необходимости – с интервалом 3–4 дня. Желательно производить смену среды каждой клеточной культуре отдельно, не размещая разные клеточные культуры одновременно в ламинаре.

12. Если в инкубаторе нет ванны с водой для поддержания влажности, флаконы могут открываться плохо, поэтому крышку можно поддеть обратным концом стерильного пинцета. Общее правило: крышки от флаконов, а также пробирок со средой и сывороткой нужно держать или в руках за те места, за которые они открывались, или положить в стерильную зону бокса внутренней стороной вверх. Необходимо избегать касания внутренних частей и краев крышки, а также не касаться горлышка флакона. Закрывать каждый флакон следует только



Рисунок 8. Одноразовые пипетки Пастера

его крышкой.

13. Большая часть работ по переносу культуральной среды и суспензий клеток осуществляется с помощью одноразовых пластиковых пипеток Пастера (рис. 8). У каждой пипетки – индивидуальная упаковка, открывать её следует со стороны груши. Конец пипетки должен всегда находиться в воздухе. Если случайно произошло касание концом пипетки поверхности, пипетку необходимо выбросить и взять новую. Грушу нужно жимать указательным, безымянным и большим пальцем, надавливая вдоль всей длины груши. Также можно использовать автоматические пипетки и степпер (рис. 9), наконечники к ним должны быть обязательно стерильными (об этом говорит маркировка на упаковке (рис. 10).

14. После пересева или смены среды старую можно залить 10% перекисью водорода 1:1 и утилизировать.



Рисунок 9. Степпер (слева) и автоматические одноканальные пипетки (в центре на 200 мкл, справа на 1000 мкл)



Рисунок 10. Стерильные наконечники для пипеток в упаковке. Стрелкой указана маркировка «Стерильные»

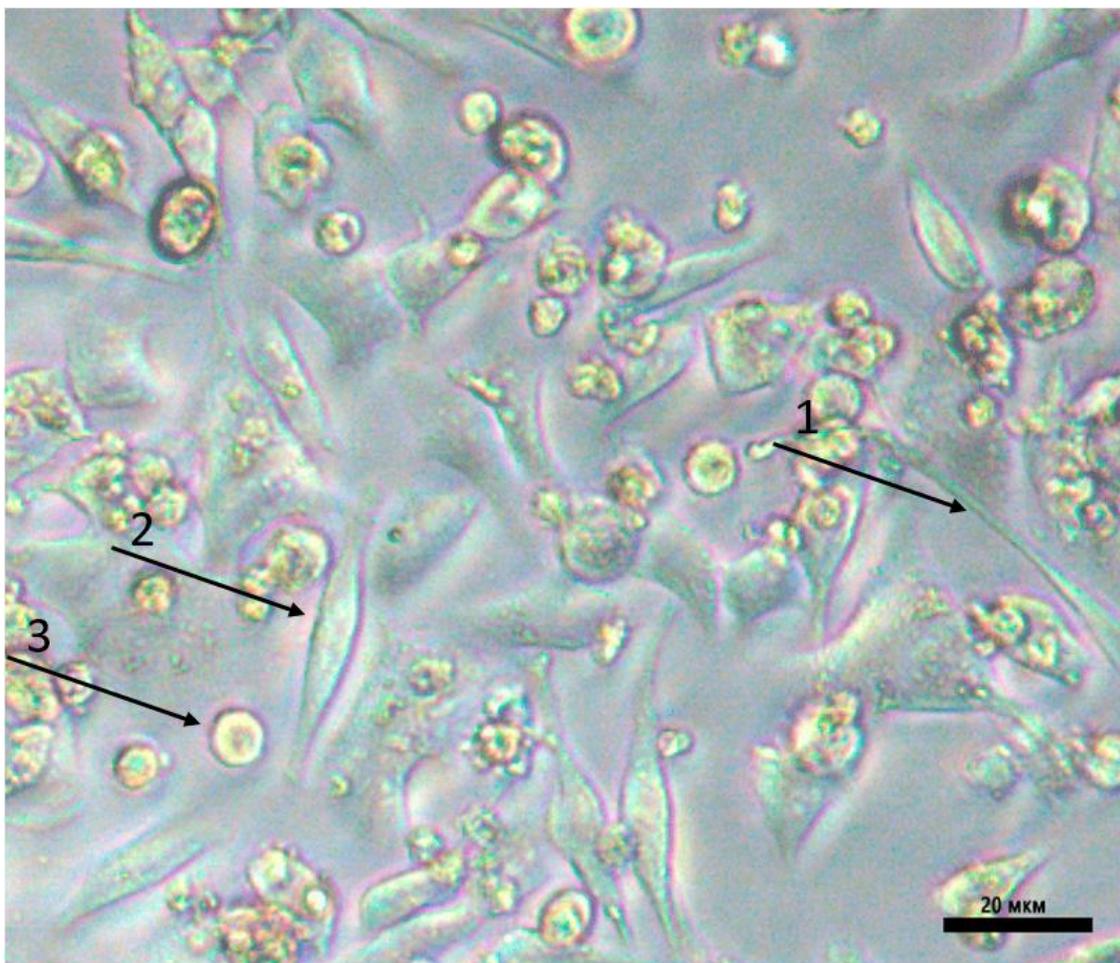


Рисунок 11. Монослой клеток HEp-2. Стрелками указано: 1 – утончение концов клеток, один из первых признаков гибели популяции, 2 – здоровая веретенообразная клетка, 3 – открепившаяся, возможно, мертвая, клетка

2. Определение жизнеспособности

Клеточные культуры являются самым распространенным тест-объектом для оценки токсичности различных веществ. Работа с клеточными линиями не так сложна и трудоемка, как с лабораторными животными, и позволяет не только оценить воздействие различных субстанций на клеточном уровне, но и спрогнозировать возможные токсические последствия для всего организма. В данном пособии рассмотрена процедура определения токсичности наноматериалов на примере коллоидного серебра.

При определении токсического действия какого-либо вещества интерес представляют следующие параметры: максимальная недействующая концентрация NOEC, минимальная действующая концентрация LOEC, полулетальная концентрация LC₅₀, полностью летальная концентрация LC₁₀₀.

Основными способами контроля и определения жизнеспособности популяции являются:

- 1) микроскопия, в том числе с использованием флуоресцентных красителей, для выявления патоморфологических изменений в клетках;
- 2) тесты на определение жизнеспособности, выражающейся в активности внутриклеточных ферментов (МТТ, LDH);
- 3) специфические тесты, например, пересев клеток после инкубирования с токсикантом для определения приживаемости и т.д.

Рассмотрим более подробно методы, применяемые в данном пособии: МТТ-тест, окрашивание флуоресцентными красителями и окрашивание трипановым синим.

МТТ-тест заключается в определении митохондриальной активности клеток [8]. Он основан на восстановлении (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (МТТ) клеточными ферментами – оксиредуктазами. В результате восстановления образуется водонерастворимый формазан, количество которого коррелирует с количеством жизнеспособных клеток. Определить количество формазана можно оптическим методом с помощью спектрофотометра, поскольку раствор формазана поглощает свет на длине волны около 540 нм. Данный метод еще называют определением дыхательной активности клетки. Стандартным способом определения токсических концентраций является последовательное разведение токсиканта с заданным шагом. Концентрация исследуемых веществ при постановке МТТ-теста высчитывается из следующего принципа: в первой лунке с самой большой концентрацией должна наблюдаться полная гибель клеток, а в последней лунке с самой маленькой концентрацией не должно быть отличий от контроля. Самым распространенным методом является метод двойных разведений, когда в каждой следующей лунке концентрация токсиканта в два раза меньше, чем в предыдущей. В тех случаях, когда токсическое действие вещества неизвестно, за основу берут токсическое действие схожих по химическому строению веществ и проводят сначала десятикратные разведения, а затем двойные. В особых случаях можно делать 10% разведения.

Метод селективного окрашивания флуоресцентными красителями основывается на способности некоторых флуорохромов связываться с определенными клеточными органеллами или селективно проникать только в поврежденные клетки. Самым распространенным является окрашивание с использованием пропидия йодистого, который проникает только через мембраны мертвых клеток. Данная особенность позволяет селективно окрасить клеточную популяцию. В качестве парного красителя можно использовать любой неселективный флуорохром, например акридиновый оранжевый или флуоресцеин. Таким образом, подбирая флуоресцентные красители так, чтобы они окрашивали в разные цвета живые и мертвые клетки, можно оценить степень жизнеспособности популяции. Помимо вышеописанного способа, существует еще несколько базовых способов определения жизнеспособности клеток с помощью флуоресцентных красителей, в частности, по состоянию нуклеиновых кислот

(DAPI и акридиновый оранжевый, AO), по концентрации определенных молекул (Flu-LDH). Оценка жизнеспособности клеток по состоянию нуклеиновых кислот несколько сложнее, чем по состоянию клеточной мембраны, поскольку в данном случае необходимо дифференцировать клетки с частично оранжевыми ядрами.

Еще одним флуоресцентным методом является использование так называемых селлтрекеров (от англ. Cell Tracker – клеточная метка). Эти красители, например 5-хлорметилфлуоресцеин диацетат (CM-FDA), не флуоресцируют, но, проникая внутрь живой клетки, подвергаются действию неспецифических диэстераз, после чего начинают флуоресцировать. Модификация позволяет красителю наследоваться от материнской клетки к дочерней и сохранять свою флуоресценцию до 72 часов. С помощью данного красителя можно оценить скорость пролиферации клеток после воздействия токсиканта, миграцию клеток, и т.д. Детальнее ознакомиться с селлтрекером можно по ссылке [9].

Альтернативным методом определения жизнеспособности является окрашивание абсорбционным красителем трипановым синим. Этот метод можно отнести к методам, основанным на проницаемости клеточных мембран, однако он не является флуоресцентным. Трипановый синий проникает через мембраны мертвых клеток и окрашивает их в синий цвет, в результате чего они отличаются от живых клеток в фазово-контрастном микроскопе.

Одновременное применение нескольких методов позволяет избежать возможной ошибки из-за неконтролируемого вклада наночастиц в оптическую плотность при МТТ-тесте, а также возможную флуоресценцию препаратов при исследовании во флуоресцентном микроскопе. Результаты тестов необходимо объединить и изучить на предмет того, какие концентрации совпадают во всех тестах, а какие нет. Для получения достоверных данных эксперимент необходимо полностью повторить несколько раз.

3. Протоколы работы с клеточными культурами

3.1. Протокол приготовления полной среды DMEM

Среда DMEM является основной средой для поддержания большого числа животных культур клеток и подходит для культивирования таких культур, как HeLa, HEp-2, A549, C6, SPEV-2 и другие. Она поставляется в пластиковых или стеклянных бутылках и является неполной, так как в ней отсутствует сыворотка. В нашей лаборатории используется сыворотка крови плодов коровы, поскольку она обеспечивает наиболее стабильные ростовые характеристики клеток. Сыворотка хранится в замороженном виде при -20°C , для размораживания её необходимо поместить в холодильник на несколько часов. Инструкция по хранению среды и сыворотки, а также её состав и сертификаты качества обычно прикладываются к посылке. В среде должны присутствовать антибиотики. Антибиотики можно



Рисунок 12. Бутылки с питательной средой DMEM, RPMI -1640 и сывороткой крови плодов коровы

добавлять в среду постоянно, если с культурами ведется активная работа, или в качестве лечения. Основные антибиотики для работы с культурами клеток – это канамицин, гентамицин, амфотерицин, пенициллин, стрептомицин, неомицин. Для постоянного использования хорошо подходит смесь пенициллин-стрептомицин-неомицин (Sigma Aldrich, США), которую можно приобрести в готовом виде [10]. Её следует добавлять из расчета 100 мкл раствора на 50 мл полной среды.

Антибиотики обычно поставляются в сухом виде, разводить и добавлять их необходимо согласно прилагаемой инструкции, а хранить в замороженном виде. Перед применением размораживается и отбирается только часть от всего объема антибиотика, это позволяет использовать его дольше с сохранением свойств, поскольку цикл замораживания-размораживания снижает его эффективность. Также можно разделить антибиотик на несколько пробирок и использовать их по мере необходимости.

Состав полной среды: 45 мл неполной среды DMEM, 5 мл сыворотки крови плодов коровы, 100 мкл (или другой необходимый объем) антибиотиков. Среду удобно хранить и использовать в 50-мл пробирках с юбкой, на упаковке пробирок обязательно должно быть указано, что они стерильны. В зависимости от потребности можно приготовить любое количество среды за один раз, однако не рекомендуется готовить более четырех пробирок одновременно. Во-первых, одна шприц-насадка позволяет профильтровать сыворотки на 4 пробирки, а во-вторых, если какой-то из компонентов не был стерилизован должным образом, будет испорчено минимальное число компонентов.

Таким образом, для приготовления 200 мл полной среды необходимо:

- Неполная среда DMEM (180 мл)
- Сыворотка (20 мл)
- Антибиотики (400 мкл)
- 4 стерильных пробирки объемом 50 мл
- 1 одноразовый шприц объемом 10 мл
- 1 одноразовый шприц объемом 1 мл
- 1 фильтр-насадка с порами 0,22 мкм
- Этанол 70%

- Стерильные неопудренные перчатки
- Стерильная емкость для слива старой среды (стеклянный стакан)
- Салфетка для чистых помещений.

Среда готовится следующим образом:

1. Емкости с неполной средой и сывороткой достать из холодильника, обработать этанолом и поместить на стол рядом с ламинаром (на емкостях образуется конденсат, который не должен попадать в ламинар).

2. Открыть новые пробирки для среды и поставить их в ряд. Профильтровать сыворотку через фильтр 0,22 мкм. Нефильтрованную сыворотку нужно забирать из пробирки 10-мл шприцем с иглой, набирать чуть более 10 мл, затем снять иглу, надеть фильтр, надеть иглу, слить несколько капель сыворотки в слив. Емкость для слива перед использованием необходимо помыть стандартным образом (любое моющее средство) и обработать этанолом из пульверизатора. **Сыворотка - самый дорогой компонент и легко может быть заражена. Необходимо быть максимально аккуратным.**

3. Разлить по 5 мл сыворотки в две пробирки. Перед повторным забором сыворотки из банки снять иглу, снять насадку, надеть иглу, забрать сыворотку. Ни игла, ни насадка не должны касаться поверхностей: иглу на время снятия можно поместить в колпачок, фильтр-насадку – в его упаковку.

4. Открыть емкость со средой DMEM, обработать горлышко бутылки этанолом из пульверизатора, через край налить в каждую пробирку 45 мл среды, не касаясь горлышками и не допуская стекания среды по бутылке. Не нужно стараться соблюсти идеальную точность в количестве наливаемой среды или сыворотки.

5. Набрать в 1-мл шприц 400 мкл антибиотиков (разведенных согласно протоколу или готовых) и добавить в каждую пробирку.

6. Закрыть крышки, перемешать. Оставить готовую среду в ламинаре на сутки с целью контроля возможного заражения. Если через сутки при комнатной температуре среда не изменила цвет, не появилась мутность – поместить среду в холодильник. Если в какой-либо пробирке есть подозрение на заражение, оставить в боксе еще на сутки-двое: развитие инфекции проявится в виде изменения цвета среды. Зараженную среду следует отдать на автоклавирование и утилизировать в установленном порядке.

Даже если за несколько дней в боксе при комнатной температуре в среде не было выявлено заражение, оно может проявиться через несколько дней даже при хранении среды в холодильнике. Поэтому перед любым использованием среды необходимо проверять, что она стерильна. Самый простой способ – визуальная оценка. Нормальный цвет среды – красный. Если цвет среды желтый, или на просвет среда мутная, плавают белые шарики, нитевидные образования, похожие на вату и т.п. – среду следует отдать на автоклавирование, а также сообщить об этом руководителю. Если цвет среды чуть фиолетовый, среду можно использовать,

такой цвет она приобретает при контакте с воздухом, если пробирку несколько раз открывали.

3.2. Поддержание культуры

Поддержание культуры включает в себя наработку первичной биомассы после получения культуры из банка клеточных культур, пересев культуры и смену среды, а также замораживание и размораживание культуры.

3.2.1. Нарработка первичной биомассы

Приобретенные культуры клеток обычно поставляются в двух видах: в культуральном флаконе с монослоем клеток или в замороженном виде. У каждого из этих способов есть свои недостатки, однако первый способ проще в плане дальнейшей работы с клетками.

Прежде всего необходимо тщательно продезинфицировать бокс, ламинар и инкубатор, поскольку новая культура может поставляться без антибиотиков. Для транспортировки во флаконах клеточный монослой заливают полной средой до краев флакона, используют флаконы с завинчивающейся крышкой без вентиляции, дополнительно закрыв крышку снаружи пленкой. Сразу после получения клеточной культуры необходимо определить её состояние с помощью микроскопа. Если монослой сохранен, а клетки не открепляются от дна, нужно поставить флакон в инкубатор на сутки для стабилизации состояния культуры. Следующий этап – рассев во флаконы в требуемом количестве. Неиспользуемая в эксперименте часть культуры может быть заморожена. Если при микроскопии обнаружено, что клетки открепляются от флакона, то нужно сразу переходить к пересеву. Один флакон с монослоем можно посеять минимум на 3 аналогичных флакона.

3.2.2. Пересев клеток

Для посева клеток необходимо:

- Новая полная среда из расчета минимум 5 мл на один новый флакон комнатной температуры
- Раствор Трипсина-Версена комнатной температуры
- Новые флаконы для клеток
- Одноразовые пипетки Пастера объемом 3 мл – 3–5 штук
- 15-мл стерильные пробирки
- Шпатель для клеток
- Емкость для слива
- Стерильные неопудренные перчатки
- Этанол 70%

- Салфетка для чистых помещений.

Трипсин хранится только в замороженном состоянии. Раствор Версена можно хранить в холодильнике, однако предпочтительно хранение в морозильнике. Раствор Трипсина-Версена готовится следующим образом. Трипсин достать из морозильника, поместить нижний край бутылки в емкость с теплой водой примерно на 3-4 минуты. Затем бутылку наклонить, с помощью стерильной пипетки Пастера забрать растаявший трипсин (2–3 мл). В 15-мл стерильной пробирке смешать трипсин с раствором Версена в соотношении 1:4. Хранить готовый раствор в холодильнике, после работы сразу убирать обратно. Раствор сохраняет свою ферментативную активность в течение, по крайней мере, 1 месяца.

Перед пересевом необходимо визуально оценить степень прикрепленности клеток к флакону. Для этого нужно аккуратно постучать ребром флакона о ладонь и посмотреть на состояние монослоя. Если клетки легко открепляются от флакона, нужно действовать следующим образом:

1. Дальнейшим более интенсивным постукиванием добиться максимального отделения клеток от флакона.

2. С помощью пипетки Пастера перелить всю среду вместе с клетками в заранее подготовленные 15-мл стерильные пробирки. Можно пропипетировать флакон, чтобы лучше снять клетки.

3. Если с одной клеточной культурой имеется много флаконов, во всех них произошло открепление клеток, все клетки одного возраста, ни в одном флаконе нет заражения или подозрения на заражение, то допускается слить среду с клетками из нескольких флаконов в одну пробирку.

4. Затем центрифугировать пробирки 2–5 минут при ускорении 50g на любой центрифуге, при возможности установить температуру 37°C. Если нет возможности воспользоваться центрифугой, можно поставить пробирки в вертикальном состоянии в инкубатор на 15–20 минут, и клетки осядут сами, однако в таком случае клеточный осадок будет очень подвижен.

5. Слить старую среду стерильной пипеткой и к клеточному осадку добавить 15 мл свежей среды. Разлить среду с клетками на три флакона по 5 мл в каждый.

При данном способе пересева во флаконе присутствует очень большое число мертвых клеток. Это происходит потому, что сам факт открепления клеток от флакона говорит о том, что с культурой не все в порядке. Самая распространенная причина – переполнение клеточного монослоя и истощение питательных элементов в среде, если её смена происходит редко. Однако возможными причинами также могут быть заражение, плохая или старая среда и старение культуры. Каждый из этих факторов необходимо проверить и, по возможности, устранить. Чтобы удалить мертвые клетки, можно поменять среду через несколько часов после пересева, когда на дне лунки появятся прикрепившиеся клетки.

Если клетки при постукивании не открепляются, действовать следующим образом:

1. Слить среду и промыть флакон от остатков старой среды с помощью 1–2 мл раствора Версена.

2. Залить в флакон 1 мл смеси Трипсина-Версена **строго** на 1 минуту. Периодически постукивать по флакону и контролировать сход клеток.

3. Вне зависимости от того, начали сходить клетки или нет, через 1 минуту добавить во флакон как минимум 5 мл свежей полной среды для инактивации трипсина, продолжая постукивать по флакону.

4. Если клетки не открепляются, можно воспользоваться специальным пластиковым шпателем, который перед применением нужно протереть этанолом и тщательно просушить. Снимать клетки нужно аккуратно, чуть надавливая на шпатель. После использования шпатель нужно протереть этанолом и упаковать.

5. После снятия клеток шпателем их необходимо интенсивно встряхнуть, поскольку клетки снимаются большими участками монослоя, которые нужно дезагрегировать. Если клетки открепились после использования раствора Трипсина-Версена, можно ограничиться легким постукиванием для равномерного распределения клеток. По 1–2 мл (в зависимости от количества клеток) из данного флакона перенести в новые флаконы, добавив затем в каждый еще по 3–4 мл полной среды.

6. Старый флакон можно выбросить, если в нем не осталось клеток (визуально дно на просвет прозрачное), или можно залить в него 5 мл среды, если какие-то клетки остались на дне, они продолжают делиться.

7. Сразу после смены среда приобретет фиолетовый оттенок, это нормально.

3.2.3. Смена среды

Смену среды для клеток необходимо проводить минимум раз в неделю, желательно два раза в неделю, с интервалом 3–4 дня (например, понедельник и четверг). При каждой смене среды необходимо контролировать состояние клеточного монослоя и цвет среды.

Для смены среды необходимо:

- Новая полная среда из расчета минимум 5 мл на один флакон комнатной температуры
- Одноразовые пипетки Пастера объемом 3 мл - 3-5 штук
- Стерильная емкость для слива старой среды
- Стерильные неопудренные перчатки
- Этанол 70%
- Салфетка для чистых помещений.

1. Визуально проверить состояние клеточного монослоя и цвет среды. Он должен быть примерно таким же, как у новой среды или немного желтее. Если среда желтая, клетки открепились от дна флакона – это может быть переполнение монослоя, заражение или гибель клеток. Установить точную причину можно с

помощью микроскопа. Типичный признак заражения – наличие большого количества бактерий в среде, которые выглядят как черные подвижные точки. Другой признак – длинные нитевидные образования. Это грибковая инфекция. Зараженный флакон спасать бесполезно и опасно, его необходимо отдать в автоклав, а затем выбросить. Если нет возможности обработать в автоклаве, можно залить флакон 6% перекисью водорода или 96% этанолом из расчета 1:1 к среде. После обнаружения заражения нужно проверить все остальные флаконы, используемую среду достать из холодильника и поставить в бокс на сутки, инкубатор, а также все рабочие поверхности тщательно продезинфицировать, всех работающих с клеточными культурами проинформировать о найденном заражении.

Если среда – цвета марганцовки, это говорит о том, что во флаконе очень мало клеток. Такое происходит сразу после посева или размораживания культуры. Такой флакон необходимо изучить под микроскопом, и если на дне флакона нет прикрепившихся клеток, а с момента посева прошло несколько суток, флакон можно выбросить.

2. Слить старую среду в подготовленную емкость, перевернув флакон горлышком вниз. Флакон можно легко встряхивать, чтобы слить остаток среды. Нужно по возможности избегать проливания капель старой среды на чистые поверхности. Их надо вытереть салфеткой, смоченной этанолом, по окончании работы. Среду также можно отобрать пипеткой Пастера, однако для каждого флакона даже одной клеточной культуры лучше использовать отдельную пипетку. Слить таким образом среду со всех флаконов.

3. После слива пустые флаконы удобно поставить вертикально в ряд, прикрыв каждый крышкой. Крышка должна легко сниматься.

4. Открыть пробирку с новой стерильной средой и пипетку Пастера.

5.левой рукой снять крышку с крайнего левого флакона. Держа пипетку в правой руке, набрать 3 мл среды (полная длина пипетки), опуская в среду только кончик пипетки. Не касаясь пипеткой краев флакона, вылить туда 3 мл среды. Повторить процедуру, набрав 2 мл среды (2/3 длины пипетки) и вылив её во флакон. Закрыть флакон крышкой до щелчка и отложить его в сторону.

6. Данную процедуру повторить по очереди для всех флаконов, продвигаясь от левого края ряда к правому. После того, как среда во всех флаконах сменена, следует закрыть пробирку со средой. После этого необходимо разместить флаконы в инкубаторе, следя, чтобы они стояли горизонтально и весь монослой клеток был покрыт средой.

3.3. Замораживание и размораживание клеток

Замораживание и размораживание клеточных культур – самый трудоемкий процесс, однако он позволяет сохранять клеточную культуру молодой и восстановить её в случае гибели. Культура, полученная из банка клеточных культур, может поставляться в замороженном виде. Клеточные культуры замораживаются в специальной среде и хранятся в жидком азоте, однако допускается хранение при температуре -70°C .

3.3.1. Замораживание культуры

Культуру необходимо замораживать на 1–2-м пересеве после получения из банка клеточных культур, а также по мере необходимости. Срок хранения культуры при температуре -70°C составляет около 1 года, однако нам удавалось разморозить культуру после 3 лет хранения. Для замораживания используется специальная среда, содержащая криодобавки, самая распространенная – ДМСО. Такую среду можно приготовить самостоятельно или купить готовую.

Итак, для замораживания клеточной культуры потребуется:

- Среда для замораживания
- Криобирки
- Коробка для медленного охлаждения (можно приобрести специальную коробку или взять коробку из пенопласта с толщиной стенок минимум 1 см)
- Остальные инструменты такие же, что и при пересеве клеток.

1. Для замораживания необходимо выбрать флакон с самыми здоровыми клетками, без признаков старения. Клетки необходимо снять с флакона стандартным образом.

2. Нужно произвести подсчет клеток с помощью счетчика клеток или камеры Горяева и определить их общее количество во флаконе для того, чтобы рассчитать количество необходимой среды.

Для подсчета клеток с помощью счетчика ТС20 используются специальные одноразовые слайды. С каждой стороны слайда находится камера объемом 10 мкл, которая заполняется клеточной суспензией. При заполнении камеры наконечник пипетки необходимо держать под углом и поместить его кончик в специальную выемку с края камеры, подождать около 5 минут, чтобы клетки осели на дно камеры. После установки слайда в счетчик процесс подсчета клеток начнется автоматически. На экране появляется информация о концентрации и возможности сохранения измерений.



Рисунок 13. Автоматический счетчик клеток TC20

3. Среда для замораживания имеет состав: 80% неполной среды DMEM, 10% сыворотки крови плодов коровы, 10% ДМСО. Среду готовят *ex tempore*.

4. Снятые клетки необходимо осадить центрифугированием при 50g 2–5 минут, затем удалить старую среду и добавить среду для замораживания из расчета финальной концентрации 10^6 мл⁻¹.

5. Перемешать и разлить аликвотами по 1 мл.

6. Поместить криопробирки в коробку из пенопласта и охладить при -4°C в течение 2 часов, перенести в морозильник -20°C минимум на 2 часа, затем перенести в морозильник -70°C . Медленное замораживание – главный критерий выживаемости клеток после размораживания.

3.3.2. Размораживание культуры

Размораживать культуру можно двумя способами: с отмывкой от криоагента или без неё. Для размораживания нужно приготовить инструменты, как и при пересеве клеток, и дополнительно стакан с водой температуры 37°C . Стакан можно подогреть в обычном инкубаторе (стакан должен быть стерильным для размещения в инкубаторе). **Все операции по переносу клеток производить максимально аккуратно, поскольку после размораживания они очень хрупкие.**

1. Криопробирки достать из морозильника и опустить в стакан с теплой водой до полного размораживания (примерно 1 минута). Если клетки были заморожены в криопробирке, можно опускать её в воду полностью, а если в обычной пробирке типа Eppendorf необходимо опускать только кончик, чтобы вода не попала внутрь.

2. Если требуется отмывка от криоагента, содержимое пробирки смешать с 5 мл полной культуральной среды и центрифугировать при ускорении 50g 3–5 минут при 37°C .

3. Осадок ресуспендировать в 5 мл полной среды и перенести во флакон. Если отмывка не требуется, содержимое криопробирки просто смешать с 5 мл среды и перенести во флакон.

Контролировать рост клеток необходимо каждый день. Сначала видны

только отдельные прикрепившиеся клетки, которые медленно делятся, среда при этом приобретает фиолетовый цвет. Клетки могут отличаться от незамороженных клеток, но через 2–3 дня вокруг них появятся новые. В случае, если клетки образуют островки и почти перестают делиться, можно снять их стандартным способом и пересеять на флакон меньшей площади.

4. Протоколы определения жизнеспособности

4.1. Протокол МТТ-теста

Для проведения МТТ-теста потребуются инструменты, как при пересеве клеток, и дополнительно:

- 50 мл полной среды
- 96-луночный культуральный планшет
- Автоматические пипетки объемом 1 мл, 200 мкл, 10 мкл, степпер с наконечниками 10 мл и 2.5 мл
- МТТ-реагент
- 50 мл фосфатно-солевого буфера
- 20 мл ДМСО

1. Используются клетки SPEV-2. Снять клетки с флакона стандартным образом с помощью шпателя, общий объем среды с клетками 6 мл. Для МТТ-теста следует брать культуры без признаков старения. Для МТТ-теста в 96-луночном планшете достаточно одного стандартного флакона с рабочей поверхностью 40 см².

2. С помощью степпера с 10-мл наконечником добавить в первые семь лунок первых шести рядов планшета 200 мкл среды. Затем с помощью 2.5-мл наконечника добавить в эти лунки 50 мкл среды с клетками. Флакон с клеточной суспензией необходимо периодически встряхивать, чтобы клетки были распределены равномерно и не агрегировали. Остаток среды с клетками во флаконе можно оставить для дальнейшего роста и контроля.

3. Планшет поставить в инкубатор на сутки. Некоторые клеточные культуры могут расти медленно, тогда срок инкубирования можно увеличить. МТТ-тест следует начинать при 70% заполненности поверхности дна лунок.

4. На следующий день нужно приготовить раствор наночастиц необходимой концентрации. Все вещества для МТТ-теста следует разводить культуральной средой. Если вещество в среде не растворяется, необходимо растворить его в небольшом объеме растворителя (этанол, ДМСО) и перерастворить в среде. Необходимо помнить, что сам растворитель может быть токсичным в больших концентрациях, а при добавлении в среду водорастворимых веществ их объем не должен превышать 1/10 объема среды во избежание изменения осмотичности и кислотности среды.

Для примера приводим определение токсичности коллоидного серебра со средним диаметром наночастиц 20 нм (КС-20). Для коллоидного серебра

концентрация по серебру свежеприготовленного раствора составляет 30 мг Ag/л [11]. Необходимая стартовая концентрация составляет 400 мг Ag/л. Для её получения 35 мл раствора КС-20 центрифугировать при ускорении 10000g 15 минут, осадок перерастворить в 2,62 мл среды. Стартовая концентрация выбрана из имеющихся в литературе данных о токсичности коллоидного серебра [12].

5. Слить среду из планшета, резким движением перевернув планшет, и несколькими встряхиваниями вылить среду. Делать это необходимо в боксе, выливая среду в специальный поднос. Во все лунки каждого ряда, кроме первой, добавить 200 мкл свежей среды степпером.

6. В первые лунки каждого ряда добавить 400 мкл тестируемой субстанции (наночастиц). Забрать 200 мкл из первой лунки и перенести во вторую, пипетировать 3 раза и перенести 200 мкл смеси в следующую. Повторить процедуру для всех лунок, кроме последней, которая останется для контроля. Остаток в наконечнике из предпоследней лунки вылить в специальную посуду для слива. Добавлять среду в лунку необходимо аккуратно, стараясь не смыть клетки со дна.

7. Поместить планшет в инкубатор на 24 часа.

8. Приготовить раствор МТТ 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере комнатной температуры. Общий объем раствора следует готовить из расчета 100 мкл на каждую лунку.

9. Отобрать среду с наночастицами из первых трех рядов планшета (оставшиеся ряды будут использованы для других тестов). Каждую лунку промыть не менее трех раз фосфатно-солевым буфером комнатной температуры, затем добавить 100 мкл раствора МТТ и поставить в инкубатор с температурой 37°C на один час.

В общем случае время инкубирования с МТТ-раствором подбирается эмпирически для каждой клеточной культуры и заполненности монослоя из принципа, что оптическая плотность контроля на длине волны 540 нм не превышает максимальную величину, которую может измерить спектрофотометр, через 24 часа инкубирования. В нашем случае это значение составляет 1.2–1.3.

10. Через 1 час МТТ-раствор слить. В каждой живой клетке образовались кристаллы формаза, которые необходимо растворить. Для этого в каждую лунку необходимо добавить 200 мкл ДМСО. С ДМСО работать в перчатках, стараться не вдыхать, при попадании на кожу смыть водой. Инкубировать с ДМСО 15 минут в инкубаторе.

11. Измеряется оптическая плотность на планшетном ридере при длинах волн 540 и 690 нм. Планшет предварительно необходимо встряхнуть на шейкере в течение 30 секунд для равномерного растворения формаза.

12. Полученные данные обрабатываются в программе Microsoft Excel. Из значений оптической плотности на длине волны 540 нм нужно вычесть значения на длине волны 690 нм. Затем необходимо найти среднее по каждой концентрации

(столбцу). Так как у нас всего три одинаковых ряда, говорят, что эксперимент был выполнен в трехкратной повторности. В случае необходимости можно делать больше повторностей. После нахождения среднего мы получим 7 значений, 6 из которых – это экспериментальные значения, и седьмое – контроль. Затем необходимо пересчитать оптическую плотность в проценты, приняв оптическую плотность контроля за 100% дыхательной активности. Остается только построить график из полученных значений.

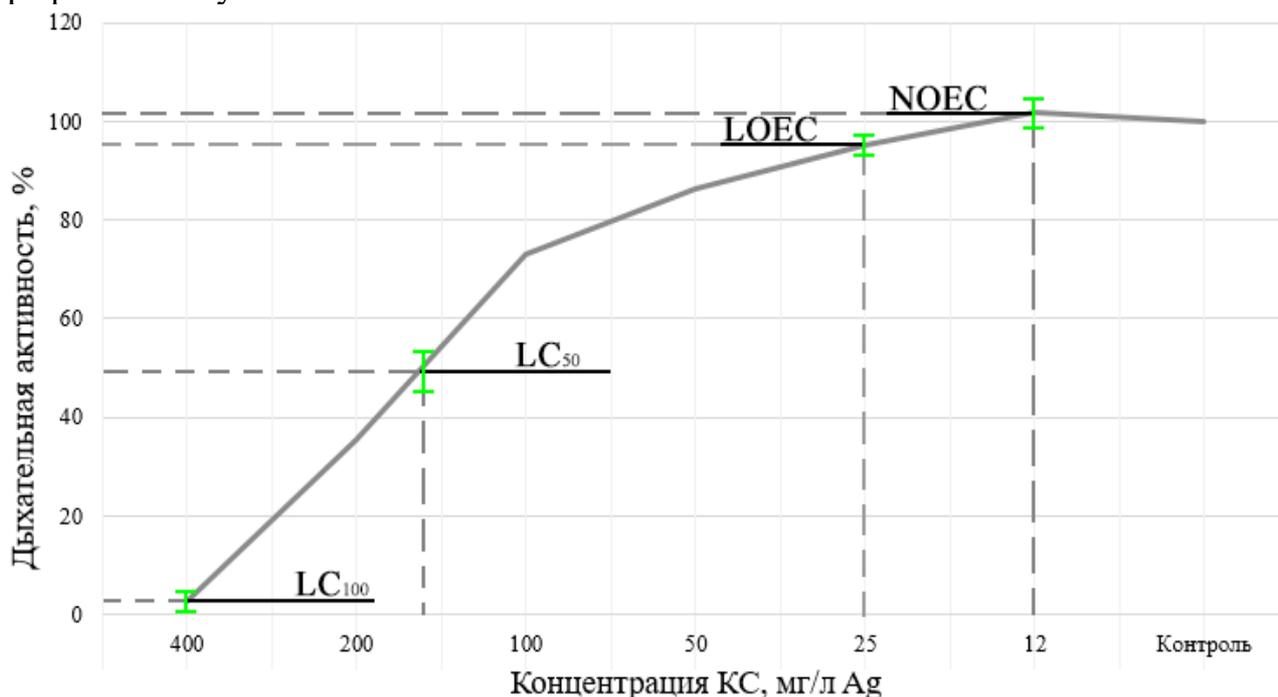


Рисунок 14. Дыхательная активность клеток SPEV-2 после инкубации с КС-20. На графике отмечены основные токсикометрические характеристики. Зеленым цветом указаны 3σ

LC_{100} – это концентрация, при которой дыхательная активность составляет 0% (абсолютная летальная концентрация). На практике такой результат не встречается, поскольку какая-то часть МТТ-реагента восстанавливается внеклеточными ферментами, поэтому дыхательную активность менее 10% можно условно принять за LC_{100} . LC_{50} определяется как концентрация, при которой график дыхательной активности пересекает отметку в 50%. $LOEC$ – это концентрация, при которой наблюдается минимальное достоверное отклонение дыхательной активности от уровня 100%. $NOEC$ – первое значение, когда значение дыхательной активности становится равным 100%. Небольшое превышение контрольных значений при малых концентрациях токсиканта – типичное явление и называется эффектом гормезиса.

Стоит сделать несколько замечаний по поводу контрольных лунок при исследовании веществ, растворенных в этаноле, ДМСО или других токсичных для клеток веществах. В этом случае в качестве контроля следует сделать разведения растворителя без токсиканта, аналогично разведениям с токсикантом. К примеру,

если вещество было растворено в 150 мкл ДМСО, а затем перерастворено в 15 мл полной среды, следует взять 15 мл среды и добавить в неё 150 ДМСО без токсиканта, а затем титровать аналогичным образом. При расчете процентного снижения дыхательной активности за 100% дыхательную активность (контроль) брать соответствующее разведение растворителя.

4.2. Окрашивание флуоресцентными красителями

Для окрашивания понадобятся:

- Акридиновый оранжевый (1 мг/мл или 3 мМ)
- DAPI (300 нМ или 100 нг/мл)
- Пропидий йодистый (1 мг/мл)
- FDA (5 мг/мл)
- Фосфатно-солевой буфер – 50 мл
- Пипетка с наконечниками на 10, 200 мкл.

Теперь перейдем к оставшимся трем рядам. Окрашивание будем проводить парой красителей: FDA+PI, PI+AO, PI+DAPI. DAPI окрашивает ядра клеток в синий цвет, AO окрашивает ядра живых клеток в зеленый цвет, мертвых клеток в оранжевый цвет, при этом лизосомы и рибосомы окрашиваются в красный, PI проникает только через мембраны мертвых клеток и красит ядра в красный цвет, FDA окрашивает живые клетки в зеленый цвет.

Таким образом, подсчитав общее число клеток и количество мертвых клеток, можно определить соотношение живые/мертвые клетки, которое коррелирует с дыхательной активностью, определенной в МТТ-тесте. Помимо этого, при окраске акридиновым оранжевым существует возможность изучить внутреннюю структуру клеток: наличие митотических клеток, целостность ядра и косвенно определить состояние рибосомального аппарата.

Перед окрашиванием среду из лунок необходимо слить и каждую лунку аккуратно промыть не менее трех раз фосфатно-солевым буфером комнатной температуры. Затем нужно добавить в каждую лунку 200 мкл фосфатно-солевого буфера. После этого клетки изучить в фазово-контрастном микроскопе. Данный шаг не является обязательным, но позволяет дополнительно подтвердить данные МТТ-теста. Корреляция между наблюдаемой картиной клеточного монослоя и данными МТТ-теста примерно следующая: при дыхательной активности от 100% до 70% монослой практически ничем не отличается от контроля (рис. 15), от 70% до 40% увеличивается количество округлых клеток в среде (рис. 16), от 40% до 0% – количество округлых клеток уменьшается, и в большом количестве появляются продукты клеточного распада, апоптозные пузырьки, гранулы (рис. 17). Данные микроскопического наблюдения необходимо записать.

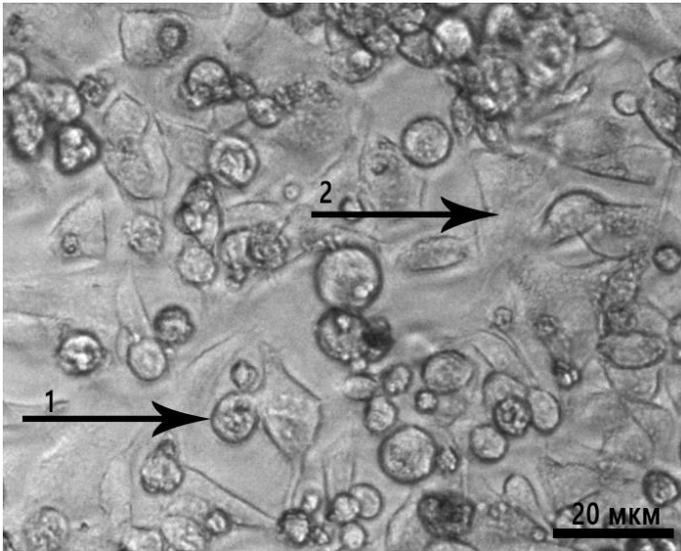


Рисунок 15. Вид клеточного монослоя контрольного образца клеток SPEV. Контрольные образцы при длительном эксперименте имеют тенденцию к росту в несколько слоев. В таком случае поверх веретенообразных клеток (обозначены цифрой 2) могут быть округлые клетки (обозначены цифрой 1), которые не обязательно являются погибшими

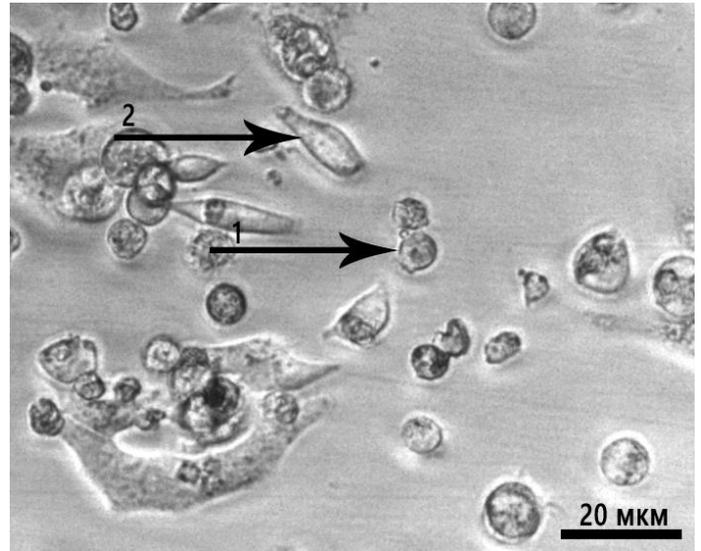


Рисунок 16. Вид клеточного монослоя клеток SPEV после инкубации с противоопухолевым препаратом проспидином в концентрации 8 мг/мл (данная концентрация соответствует LC_{50}). Видны как округлые, возможно, мертвые клетки (обозначены цифрой 1), так и веретенообразные (обозначены цифрой 2). У указанной округлой клетки можно заметить выпячивание цитоплазмы

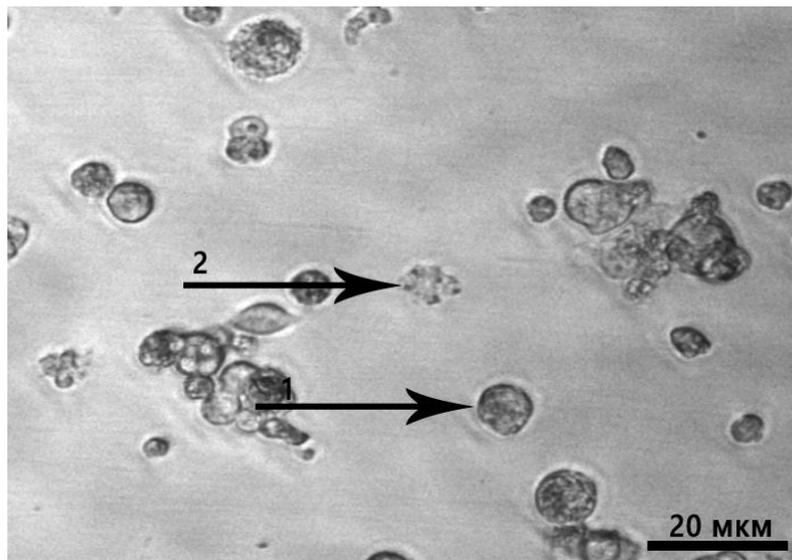


Рисунок 17. Вид клеточного монослоя клеток SPEV после инкубации с противоопухолевым препаратом проспидином в концентрации 16 мг/мл (данная концентрация соответствует LC_{100}). Видны как округлые, мертвые клетки (обозначены цифрой 1), так и остатки клеток (т.н. «клеточные тени») (обозначены цифрой 2)

Таблица 1

Данные по возбуждениям и эмиссии используемых флуоресцентных красителей

Название красителя	Объем добавляемого в лунку красителя (на 200 мкл среды), мкл	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны эмиссии, нм	Фильтр на микроскопе Leica DMI 3000B
DAPI	5	358	461	A, D
AO	3	460–502	525–650	D, I3
PI	8	485	610	I3, N21
FDA	1	495	527	I3

Затем необходимо окрасить клетки красителями. Используются попарно следующие красители: AO+PI, FDA+PI, DAPI+PI. Информация приведена в табл. 1. Окрашивание производить в инкубаторе или просто в темноте в течение 10–15 минут, каждую пару красителей можно добавлять одновременно. Затем лунки нужно отмыть подогретым до 37°C фосфатно-солевым буфером три раза и добавить в каждую 100 мкл фосфатно-солевого буфера.

4.3. Получение и обработка изображений на микроскопе Leica DMI 3000B

Далее описан процесс получения изображений с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа Leica DMI 3000B. Основные элементы управления микроскопом указаны на рис. 18 и 19. Захват изображений осуществляется камерой Leica DFC 450C, поэтому перед началом работы необходимо убедиться, что камера установлена в микроскоп. Работа с изображениями осуществляется программой Leica Application Suite v. 4.9 (LAS), её можно запустить в любой момент. Основные элементы управления программой показаны на рис. 20 и 21.

1. Планшет необходимо установить на предметный столик микроскопа 5, перемещения планшета осуществляются вручную. Крышку с планшета снимать не нужно.

2. Включить лампу накаливания 6 и открыть шторку 1 переводом её в нижнее положение.

3. На револьвере 14 выбрать цифру 5, на револьвере 12 выбрать объектив с увеличением 20x и соответствующую ему фазу 1 на конденсоре 17.

4. Отрегулировать расстояние между окулярами 10 и интенсивность лампы накаливания винтом 16.

5. С помощью винта 3 и диафрагмы 4 добиться равномерного освещения поля зрения, а с помощью микровинта 8 добиться четкого изображения образца. Данный режим работы микроскопа называется фазовым контрастом, а полученные изображения – фазово-контрастными.

6. Создать папку для полученных изображений (рис. 21). Во вкладке «Обзор» выбрать диск D 1, затем готовую папку или создать новую со своим именем 2, нажав кнопку 3. Создать необходимые подпапки с помощью кнопки 3. Папку, в которую происходит захват изображений, выбрать активной с помощью кнопки 4.

7. Для получения изображения нужно открыть затвор 7. На экране должно появиться изображение образца в реальном времени.

8. С помощью ползунка 1 (рис. 20) отрегулировать яркость изображения. Для фазового контраста обычно достаточно значений 10–20 мс, для флуоресценции – от 100 мс до 2 с в зависимости от красителя. Все значения подбираются эмпирически. Необходимо понимать, что при времени экспозиции, например, 2 с

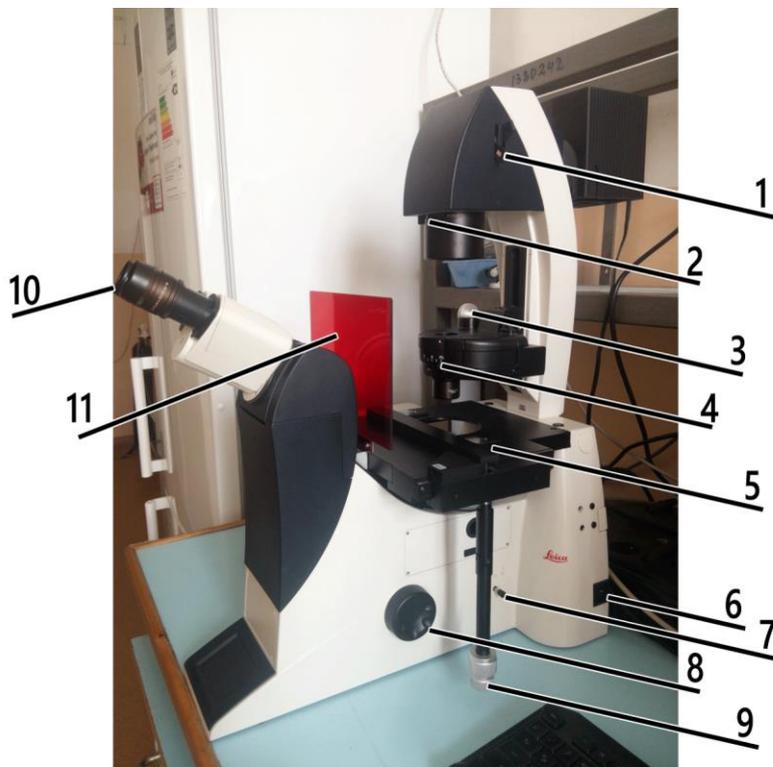


Рисунок 18. Основные элементы управления микроскопом Leica DMI 3000B (правая сторона): 1 – шторка лампы накаливания, 2 – полевая диафрагма, 3 – винт регулировки высоты конденсора, 4 – диафрагма конденсора, 5 – предметный столик, 6 – кнопка ВКЛ/ВЫКЛ лампы накаливания, 7 – затвор камера/окуляр, 8 – микровинт регулировки фокуса, 9 – препаратодержатель, 10 – окуляры, 11 – защитное стекло.

задержка между совершаемыми действиями (изменение фокуса или перемещение планшета) и изображением на экране, составляет 2 с. Можно уменьшить время экспозиции, но увеличить усиление ползунком 2 (рис. 20). Это добавит изображению цифрового шума, но позволит снимать движущиеся объекты. Захват изображения происходит нажатием кнопки 3 (рис. 20). Для добавления на изображение бара масштабной линейки необходимо нажать кнопку 4 (рис. 20).

9. Для получения флуоресцентного изображения необходимо включить блок питания 22 и выставить интенсивность ручкой 23 на максимум. Время разогрева лампы

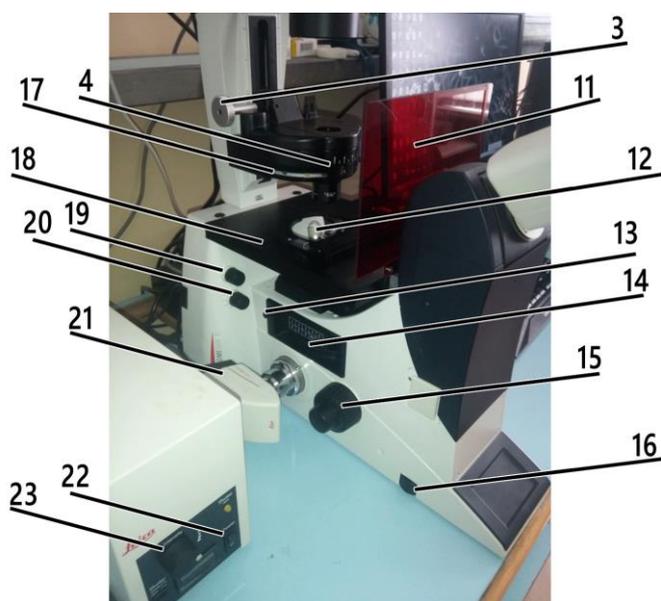


Рисунок 19. Основные элементы управления микроскопом Leica DM1 3000B (левая сторона): 3 – винт регулировки высоты конденсора, 11 – защитное стекло, 12 – револьвер объективов, 13 – затвор флуоресценции, 14 – револьвер светофильтров, 15 – макровинт регулировки фокуса, 16 – регулировка накала лампы, 17 – револьвер конденсора, 18 – предметный столик, 19 – переключатель диафрагм флуоресценции, 20 – переключатель интенсивности флуоресценции, 21 – цифровая камера, 22 – кнопка ВКЛ/ВЫКЛ блока флуоресценции, 23 – регулятор мощности блока флуоресценции.

составляет около двух минут. При работе с флуоресцентной приставкой обязательно должен быть установлен защитный экран 11. Запрещается заглядывать за защитный экран во время работы и смотреть на планшеты.

10. На револьвере 14 выбрать цифру, соответствующую необходимому светофильтру и использованному красителю (1 – А фильтр, 2 – D фильтр, 3 – I3 фильтр, 4 – N21 фильтр, 5 – без фильтра)

11. Перекрыть световой поток, подняв шторку 1 и закрыть затвор 7. Открыть затвор 13.

12. Ручкой 20 изменить интенсивность светового потока для получения оптимальной яркости изображения, ручкой 19 выбрать необходимую диафрагму, резкость отрегулировать ручкой 8.

13. Открыть затвор 7, настроить экспозицию и захватить изображение. Все действия при получении флуоресцентных изображений необходимо выполнять быстро.

14. Закрыть шторку 13, открыть затвор 7 и опустить шторку 1, выбрать другую лунку с такой же концентрацией и повторить процедуру захвата изображения.

15. Для количественной обработки достаточно получить изображение случайного поля зрения каждой лунки триплицированного ряда. Для более точного подсчета количество изображений можно увеличивать. Необходимо захватывать изображения как в режиме фазового контраста, так и флуоресценции.

16. После работы убрать планшет, выключить блок питания 22 и лампу накала 6, на револьвере 14 выбрать светофильтр 5, выбрать объектив 5x на револьвере 12. Микроскоп закрыть чехлом.

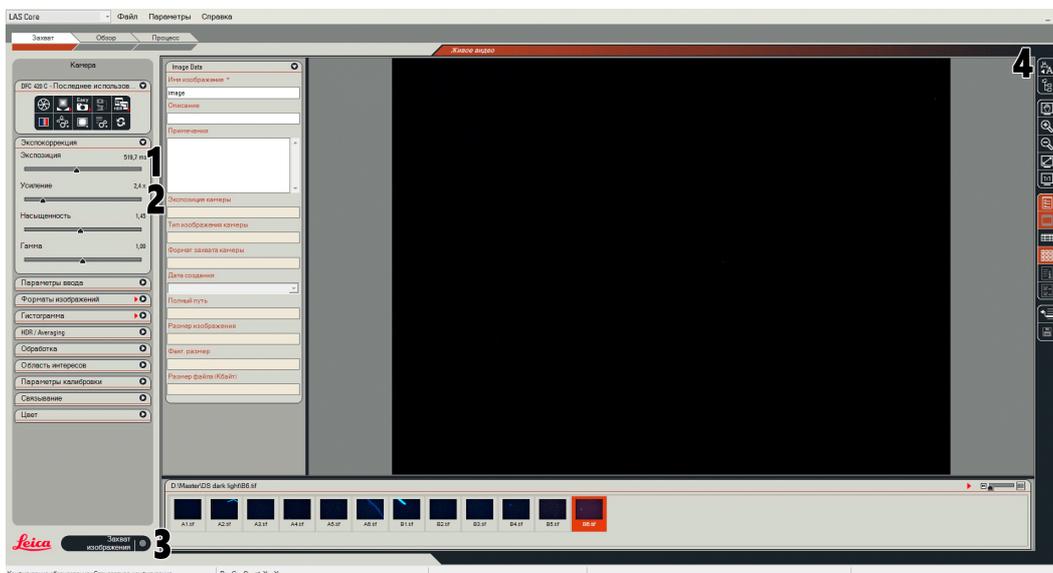


Рисунок 20. Интерфейс программы Leica Application Suite v. 4.5

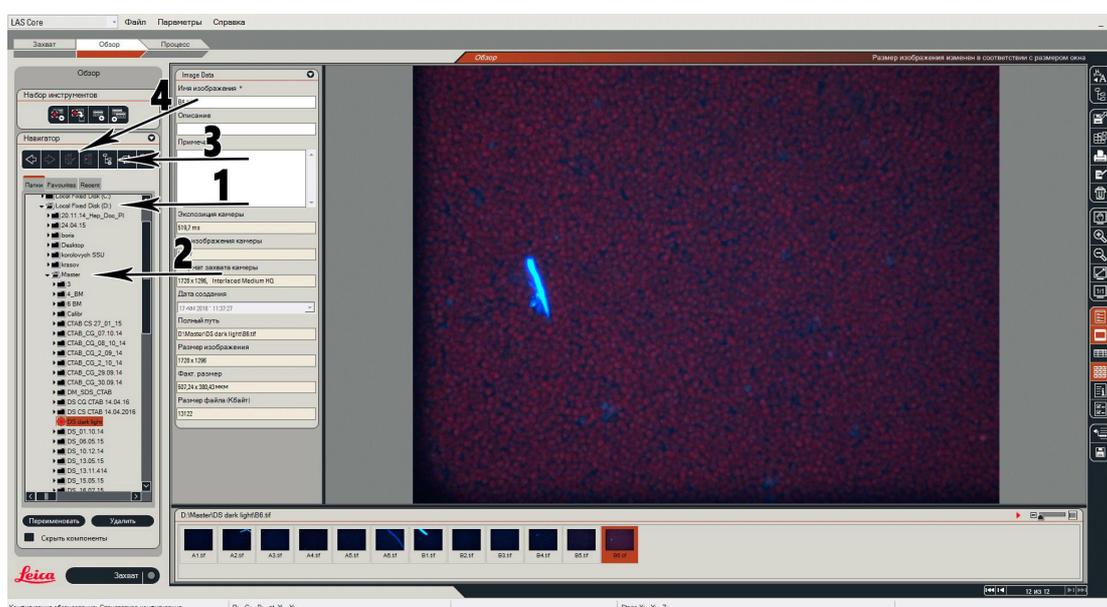


Рисунок 21. Интерфейс программы Leica Application Suite v. 4.5

Пример обработки изображения и подсчета числа клеток с помощью программы Picasa показан на рис. 22 и 23. В данном случае ядра клеток окрашены DAPI, фильтр А. Для упрощения подсчета клеток на изображение можно наложить сетку, которая появляется после выбора инструмента «Выравнивание» (рис. 22). Так как клетки в нашем случае распределены по полю зрения равномерно, можно поделить изображение на 4 части и подсчитать клетки только в одной из них, а затем умножить на 4 (рис. 23). При этом необходимо руководствоваться следующим правилом: клетки, попадающие на границу, считаются только в том случае, если большая их часть находится внутри выбранной области.

Характерные флуоресцентные изображения приведены на рисунке 24. К примеру, на рисунке 24 (В) общее число клеток составляет 70, из них с окрашенными ядрами (мертвые) – 20. Это означает, что процент мертвых клеток составляет $(20/70) \times 100\% \approx 29\%$, или, наоборот, жизнеспособность составляет 71%. После подсчета общего числа клеток и количества мертвых и живых клеток можно определить основные токсикометрические характеристики из тех же принципов, что и для дыхательной активности, однако при определении LC_{100} следует быть более аккуратным в оценках. LC_{50} определяется как концентрация, при которой число живых и мертвых клеток одинаково.

Рассмотрим подсчет клеток в нашем эксперименте. Возьмем третьи лунки каждого ряда, концентрация серебра в них составляет 100 мг/л Ag. Захватим три изображения случайных полей зрения, по одному с каждой лунки, и подсчитаем количество живых и мертвых клеток. Получим следующие данные:

Таблица 2

Пример подсчета клеток после воздействия токсиканта

Номер ряда	Живые	Мертвые	Общее количество	Соотношение живые/общее число x 100%
1	723	381	1104	65%
2	685	360	1045	65%
3	751	330	1081	69%

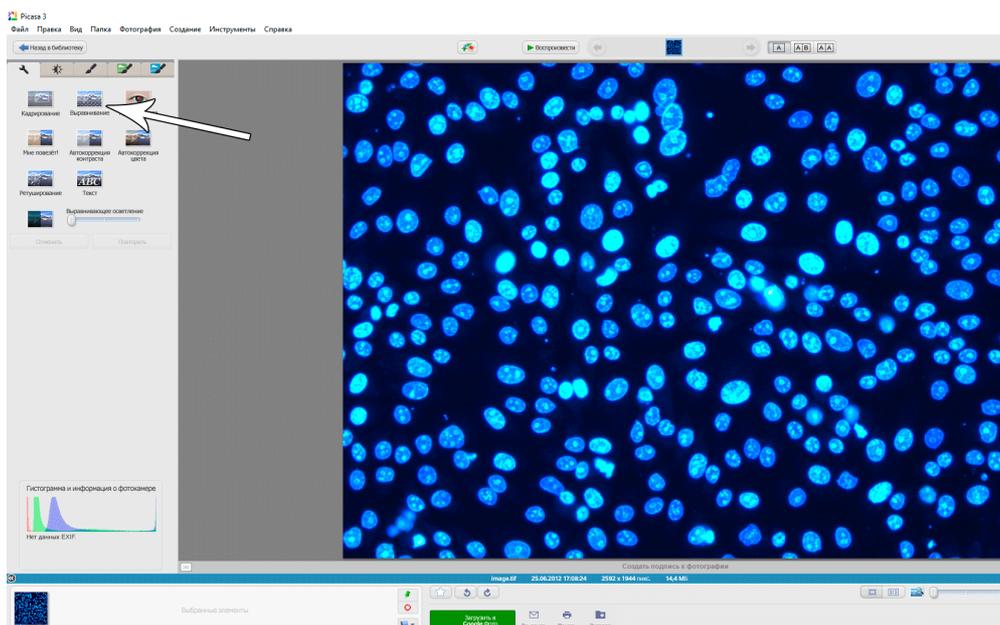


Рисунок 22. Инструмент Выравнивание в программе Picasa

Из полученных данных видим, что средний процент живых клеток в третьей лунке составляет 66%, а по данным МТТ-теста (см. рис. 14) это значение оставляет 73%. Значение, полученное в МТТ тесте, выше, поскольку наночастицы серебра неизбежно вносят вклад в оптическую плотность, поэтому истинное значение находится в районе 70%. В данном случае согласование между двумя типами измерений довольно высокое.

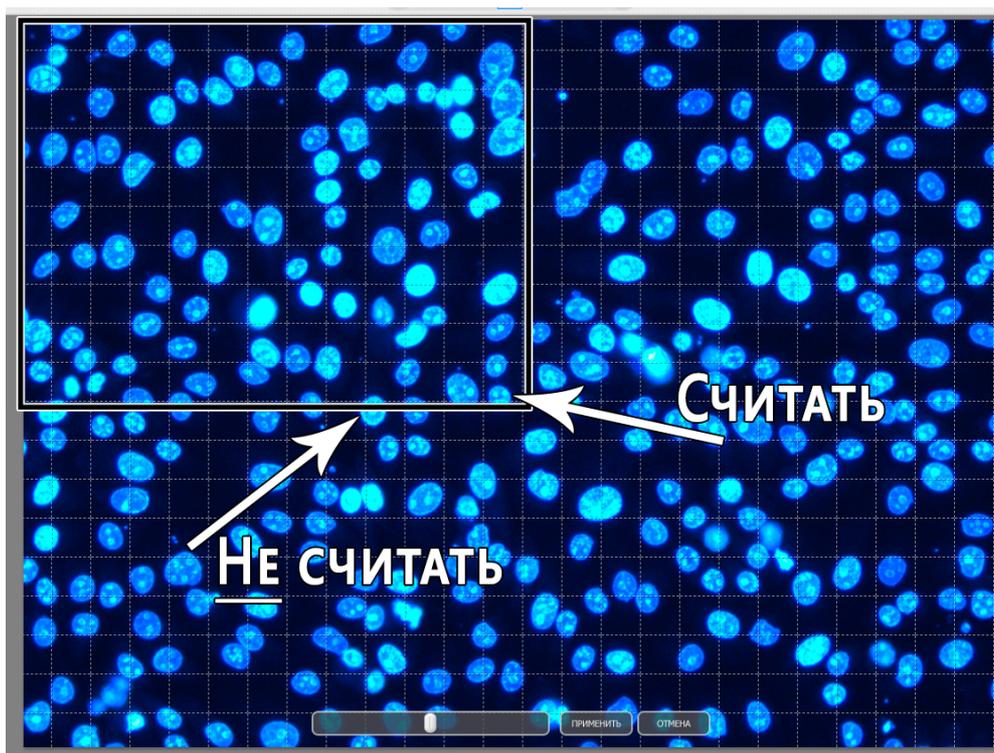


Рисунок 23. Подсчет клеток в программе Picasa. Изображение делится на четыре части, подсчитываются клетки в одной из них и затем умножаются на 4. Клетки, попавшие на границу, считаются только если большая их площадь лежит внутри выбранной области

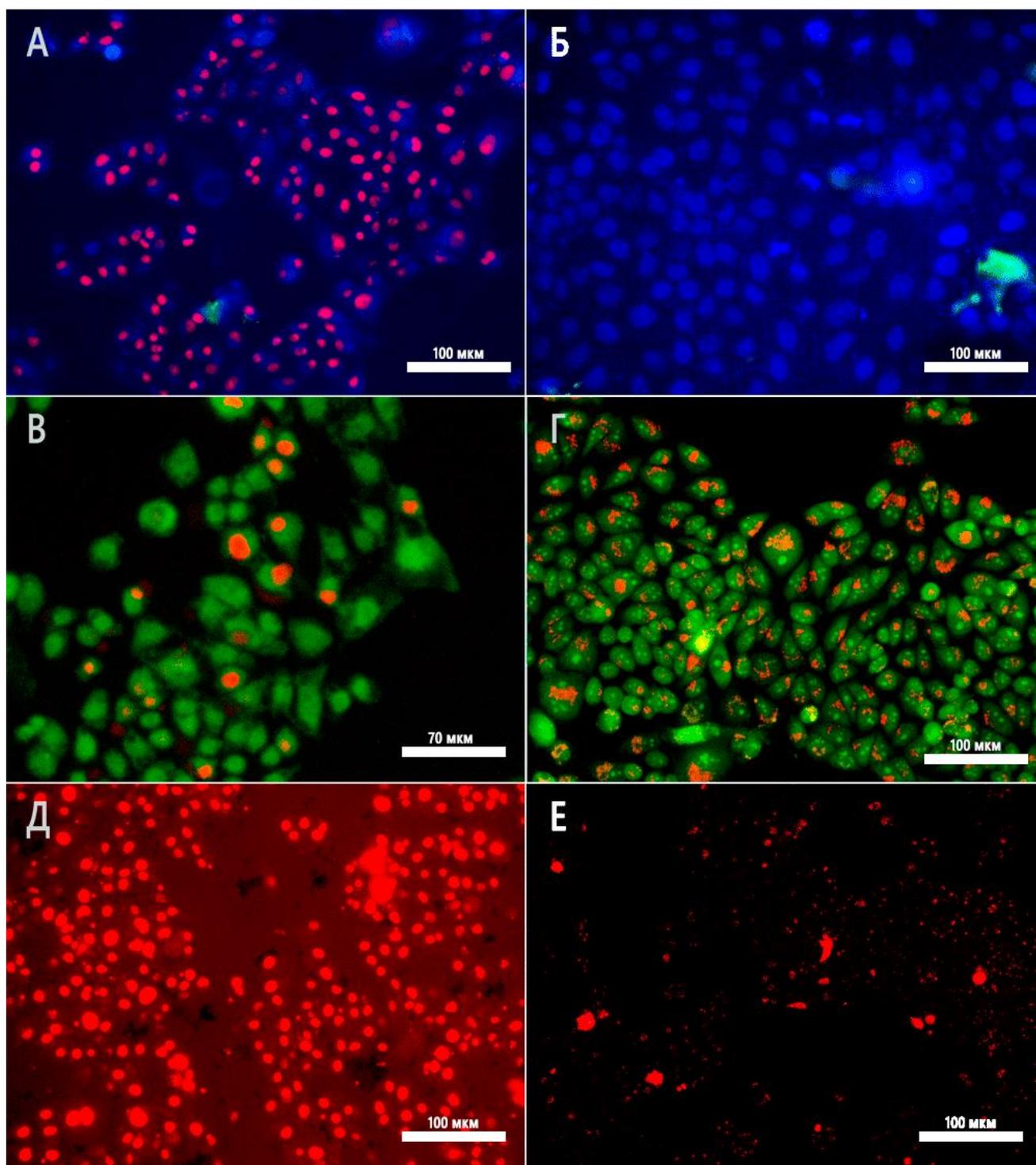


Рисунок 24. Флуоресцентные изображение клеток SPEV-2 при окраске различными красителями. А,В,Д – после воздействия токсикантов, Б,Г,Е – контроль. А, Б – окраска DAPI и PI, D фильтр. В, Г – окраска АО и PI, I3 фильтр. Д, Е – окраска PI, N21 фильтр. На изображении Г мелкие красные точки, расположенные вокруг ядра – рибосомы. На остальных изображениях красные точки – это окрашенные пропидием йодистым ядра

4.4. Окрасивание трипановым синим

Для подсчета жизнеспособных клеток понадобятся:

- Раствор Трипсина-Версена
- Пипетки 10 и 200 мкл
- Раствор трипанового синего в физ. растворе (0,4%)
- Слайды для счетчика клеток

При окраске трипановым синим необходимо строго выдерживать время окрашивания, поскольку он может неспецифически окрасить живые клетки в синий цвет при продолжительном времени инкубации. Подсчет клеток осуществляется автоматически с помощью счетчика клеток Bio-Rad TC-20 в специальных пластиковых одноразовых слайдах. В каждом из них имеется две камеры, по одной с каждой стороны, объем одной камеры 10 мкл. Прибор производит подсчет клеток автоматически при установке слайда в гнездо на передней стороне прибора.

В отличие от метода окраски флуоресцентными красителями в лунке в данном методе клетки необходимо снять с планшета. В этом смысле удобнее культивировать клетки не в 96-луночных планшетах, а в 6-луночных. Разница в методике посева клеток на данный планшет заключается в том, что в каждую лунку необходимо добавить 200 мкл суспензии клеток на 1 мл среды. Лунку перед снятием клеток надо трижды промыть фосфатно-солевым буфером. Снимать клетки с планшета можно шпателем, кончиком пипетки Пастера или раствором Трипсина-Версена. После снятия клетки необходимо центрифугировать на минимальных оборотах 3–5 минут и осадок перерастворить в 1 мл фосфатно-солевого буфера. Прибор позволяет определить концентрацию клеток, если их количество 10^5 – 5×10^6 мл⁻¹, поэтому сначала необходимо правильно развести клеточную суспензию. Для этого нужно залить 10 мкл суспензии в одну из камер слайда, чтобы определить концентрацию, и затем произвести соответствующее разведение. Например, при измерении прибор выдал значение количества клеток 10^7 , это значит, что суспензию необходимо развести минимум в 10 раз. После того, как подобрана нужная концентрация клеток, надо смешать 10 мкл клеточной суспензии с 10 мкл трипанового синего и подождать 5 минут. Затем внести 10 мкл окрашенной суспензии во вторую камеру слайда. Прибор автоматически подсчитает количество живых клеток и выведет их процентное содержание. Полученное число аналогично результату подсчета соотношения живых клеток к общему числу в табл. 2.

5. Статистика

5.1. Критерий Стьюдента

Заключительным этапом оценки жизнеспособности и определения ключевых токсикометрических характеристик является анализ полученных данных. Это необходимо для того, чтобы с уверенностью сказать, что полученные данные статистически достоверны и им можно доверять. Мы будем использовать самый распространенный метод, называемый t-критерием Стьюдента.

Рассмотрим пример анализа данных, полученных в МТТ-тесте.

Таблица 3

Данные, полученные при измерении оптической плотности в МТТ-тесте

Номер ряда	Лунка 1	Лунка 2	Лунка 3	Лунка 4	Лунка 5	Лунка 6	Контроль
1	0,097	0,166	0,14	0,158	0,239	0,258	0,32
2	0,186	0,211	0,229	0,275	0,225	0,263	0,369
3	0,164	0,143	0,208	0,231	0,182	0,252	0,359

В табл. 3 представлены примерные данные, которые можно получить при измерении оптической плотности в лунке 96-луночного планшета. Данная таблица получена вычитанием значений оптической плотности на длине волны 690 нм из значений на длине волны 540 нм согласно протоколу, описанному в разделе проведения МТТ-теста. Лунки 1–6 соответствуют двойным разведениям токсиканта, при этом в лунке 1 концентрация максимальна, а в лунке 6 минимальна. Ряды триплицированные. Нам необходимо найти среднее значение по каждой лунке. Для этого можно воспользоваться стандартной функцией AVERAGE в Microsoft Excel или подсчитать вручную.

Таблица 4

Средние значения дыхательной активности, подсчитанные на основе табл. 3

	Лунка 1	Лунка 2	Лунка 3	Лунка 4	Лунка 5	Лунка 6	Контроль
Средние значения	0,149	0,173	0,192	0,221	0,215	0,257	0,349

Каждый проведенный МТТ-тест необходимо повторить несколько раз, обычно достаточно 3–5 повторений. В результате получается следующий набор данных, представленный в таблице 5.

Таблица 5

Средние значения дыхательной активности, полученные за три эксперимента

Средние значения	Лунка 1	Лунка 2	Лунка 3	Лунка 4	Лунка 5	Лунка 6	Контроль
1-й эксперимент	0,149	0,173	0,192	0,221	0,215	0,257	0,349
2-й эксперимент	0,134	0,181	0,198	0,191	0,225	0,277	0,370
3-й эксперимент	0,159	0,175	0,189	0,211	0,200	0,259	0,365

При статистическом анализе данных график дыхательной активности строить не обязательно. Нашей задачей является попарное сравнение полученных данных, а точнее, нам необходимо установить, достоверно ли отличаются значения оптической плотности между лунками 1 и 2, 2 и 3 и т.д. Если значения отличаются достоверно, то это значит, что концентрации в лунках, например 1 и 2, оказывают разное влияние на клетки.

Сначала нужно рассчитать три значения: среднее арифметическое M , стандартное отклонение σ и количество проведенных экспериментов N (в нашем случае $N=3$).

Среднее арифметическое, оно же математическое ожидание, есть сумма значений, деленная на их количество:

$$M_x = \frac{\sum x_i}{n}$$

В нашем случае мы должны сложить три значения для лунки 1 и три для лунки 2 и поделить каждое полученное число на 3. Для лунки 1 $M_1=0,147$, для лунки 2 $M_2=0,176$.

Теперь посчитаем стандартное отклонение. Это оценка среднеквадратического отклонения случайной величины x_i относительно её математического ожидания M_x на основе несмещённой оценки её дисперсии D_x :

$$\sigma_x = \sqrt{D_x} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M_x)^2}{n - 1}}$$

Например, для лунки 1 будем иметь:

$$\sigma_1 = \sqrt{\frac{(0,149 - 0,147)^2 + (0,134 - 0,147)^2 + (0,159 - 0,147)^2}{3 - 1}} = 0,0125$$

Для лунки 2 $\sigma_2=0,0041$.

Формула расчета t -критерия Стьюдента:

$$t_e = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{N_1} + \frac{\sigma_2^2}{N_2}}}$$

$$t = \frac{|0.147 - 0.176|}{\sqrt{\frac{0.0125^2}{3} + \frac{0.0041^2}{3}}} = \frac{0.029}{0.0076} = 3.81$$

Вычисляем степени свободы df . Степени свободы df – это количество значений, которые могут свободно изменяться после того, как по выборке было вычислено значение статистики.

$$df = (3-1) + (3-1) = 4$$

Теперь необходимо обратиться к таблице критических значений t -критерия Стьюдента, которую можно найти в интернете или литературе. Для степени свободы 4 получаем, что наше значение 3.81 больше, чем 2.776, следовательно, уровень значимости меньше 0.05. Это означает, что между значениями есть статистическая разница, и концентрации токсикантов в лунках 1 и 2 оказывают разное действие на клетки. Аналогичным образом необходимо подсчитать критерий для каждой пары лунок последовательно. Чем меньше уровень значимости, тем лучше.

При анализе количества живых и мертвых клеток нужно действовать аналогичным образом. Предположим, что есть лунки с разными концентрациями токсикантов. С каждой лунки получаем 3 изображения и находим среднее арифметическое. Полученные данные соответствуют данным в табл. 4. Затем повторяем эксперименты и получаем набор данных из трех экспериментов, аналогичный табл. 5. Последующий анализ не представляет сложности и проводится по аналогии.

На основе полученных данных можно сделать разные выводы. Рассмотрим пример. По графику дыхательной активности мы установили, что он пересекает отметку в 50% при значении OD=0.192 в лунке 3. Однако значение в следующей лунке 4 OD=0.221 достоверно не отличается от значения в лунке 3. Таким образом, мы не можем сказать, в какой из этих лунок достигнута половинная гибель популяции. Иногда случается, что значения, например, между лунками 1 и 2, 2 и 3 попарно не отличаются достоверно друг от друга. Это, однако, не значит, что лунка 1 не отличается от лунки 3; в данном случае необходимо провести дополнительный расчет и сравнить попарно лунки 1 и 3.

5.2. Правило трех сигм

Стоит также остановиться еще на одном способе оценки различий между двумя концентрациями токсикантов. Этот способ связан с расчетом среднеквадратического отклонения, обозначаемого буквой σ (*сигма*), и называется

правилом трех сигм. Оно гласит, что практически все значения нормально распределённой случайной величины x_i лежат в интервале $(x_i - 3\sigma; x_i + 3\sigma)$. Более строго – приблизительно с вероятностью 0,9973 значение нормально распределённой случайной величины x_i лежит в указанном интервале. Рассмотрим график дыхательной активности рис. 14. На нем зеленым цветом указаны отрезки $(x_i - 3\sigma; x_i + 3\sigma)$ для значений всех основных токсикометрических характеристик. Если данные отрезки для двух соседних измеренных значений не перекрываются, то это означает, что значения отличаются достоверно. Если отрезки перекрываются, то нельзя с уверенностью сказать, что концентрации токсикантов оказывают различное воздействие на клетки. Чтобы установить различия между концентрациями токсикантов, можно увеличить число экспериментов для уменьшения значения σ (т.е. для уточнения значения дыхательной активности при данной концентрации токсиканта) или увеличить время инкубирования, чтобы действие токсиканта было более выраженным.

Список терминов

Апоптоз – активная форма клеточной смерти, являющаяся результатом реализации ее генетической программы или ответом на внешние сигналы, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду.

LC₅₀ (англ. Lethal Concentration) – концентрация токсического вещества, вызывающая гибель половины популяции (клеток, животных).

ЛОЕС (англ. Lowest Observed Effect Concentration) – минимальная концентрация токсического вещества, при которой наблюдаются отличия между клетками, подверженными его воздействию, и контрольным образцом.

НОЕС (англ. No Observed Effect Concentration) – концентрация токсического вещества, при которой не наблюдается отличий между клетками, подверженными его воздействию, и контрольным образцом.

Цитотоксичность – это способность химических веществ (включая медикаменты, вирусы и антитела) повреждать клетки тканей.

ДМСО – диметилсульфоксид, химическое вещество с формулой $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, биполярный апротонный растворитель, часто используется как растворитель в химических реакциях с участием неорганических солей.

Фосфатно-солевой буфер – буферный раствор, представляющий собой водный раствор солей, содержащий хлорид натрия, гидрофосфат натрия, хлорид калия и дигидрофосфат калия. Осмолярность и концентрации ионов в растворе обычно соответствуют концентрациям в теле человека (то есть данный буферный раствор является изотоническим).

Первичная клеточная культура – это клетки, получаемые от животного и поддерживаемые в культуре до первого пересева.

Вторичная клеточная культура – это клетки, полученные после первого пересева первичной клеточной культуры. Все широко применяемые клеточные культуры, таким образом, являются вторичными.

Культуральная среда – питательный материал в твердой или жидкой форме, который используют для выращивания клеток микроорганизмов, растений и животных *in vitro*. Бывает полной, если в ней содержатся все питательные вещества, или неполной, когда для её использования необходимы дополнительные компоненты.

Сыворотка – плазма крови, лишённая фибриногена, содержит растворенные белки и другие органические и минеральные соединения, является важным компонентом среды, обеспечивающим рост клеток.

Трипсин – фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки, применяется для разрушения связей между клетками, а также между клетками и ростовой поверхностью.

Раствор Версена – раствор натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и неорганических солей. ЭДТА связывается с ионами кальция, необходимыми для адгезии клеток, таким образом облегчая открепление клеток от ростовой поверхности.

Трипановый синий – краситель, используемый для селективного окрашивания мертвых клеток и тканей. Живые клетки с неповрежденной клеточной мембраной не окрашиваются этим красителем.

Коллоидный раствор – дисперсные системы, промежуточные между истинными растворами и грубодисперсными системами, в которых дискретные частицы, капли или пузырьки дисперсной фазы, имеющие размер хотя бы в одном из измерений от 1 до 100 нм, распределены в дисперсионной среде, обычно непрерывной, отличающейся от первой по составу или агрегатному состоянию.

Пролиферация – новообразование клеток и внутриклеточных структур (митохондрий, эндоплазматической сети, рибосом и др.).

In vitro (лат. «в стекле») – это технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся «в пробирке» — вне живого организма, на культуре живых клеток или в бесклеточной модели.

In vivo (лат. «в (на) живом») – в науке обозначает проведение экспериментов на (или внутри) живой ткани при живом организме.

Наночастица – изолированный твёрдофазный объект, имеющий отчётливо выраженную границу с окружающей средой, размеры которого во всех трёх измерениях составляют от 1 до 100 нм.

Список литературы

1. Скибо, Ю.В. Методы исследования программируемой клеточной гибели: учеб.-метод. пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза» / Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова. – Казань: Изд-во ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. – 61 с.; ил.
2. Klionsky, J.D. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy / D. J. Klionsky et al. // *Autophagy*. – 2012. – Vol. 8, No 4. – P. 445–544.
3. Johnston, H.J. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity / H.J. Johnston, G. Hutchison, F.M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, V. Stone // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2010. – Vol. 40, No 4. – P. 328–346.
4. URL: <http://rosmedbio.ru/>.
5. URL: http://www.biolot.ru/catalogue/Cell_lines/.
6. URL: <http://www.cytspb.rssi.ru/>.
7. URL: <http://www.ronc.ru/node/1084>.
8. Niks, M. Towards an optimized MTT-assay / M. Niks , M. Otto // *J. Immunol. Meth.* – 1990. – Vol. 130, No 1. – P. 149-151.
9. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C7025>.
10. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4083?lang=en®ion=RU>.
11. Fabrikanos, V.A. Stabiler Hydrosol von Gold 22 und Silber durch Reduktion mit Äthylendiamintetraessigsäure / V. A. Fabrikanos, S. Athanassio, K. H. Darstellung // *Z. Naturforschg.* – 1963. – Vol. 18b. – P. 612–617.
12. Austin, L.A. Cytotoxic effects of cytoplasmic-targeted and nuclear-targeted gold and silver nanoparticles in HSC-3 cells – a mechanistic study / L. A. Austin, S. Ahmad, B. Kang, K. R. Rommel, M. Mahmoud, M. E. Peek, M. A. El-Sayed // *Toxicol. In Vitro.* – 2015. – Vol. 29, No 4. – P. 694-705.

Прилепский Артур Юрьевич
Дроздов Андрей Сергеевич
Богатырев Владимир Александрович
Староверов Сергей Александрович

Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности
наноматериалов
учебно-методическое пособие

В авторской редакции
Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО
Зав. РИО Н. Ф. Гусарова
Подписано к печати
Заказ №
Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49