



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 314. BIOLOGINIŲ TYRIMŲ METODOLOGIJA

Laboratorinis darbas

LĄSTELIŲ GYVYBINGUMO NUSTATYMAS

DARBO TIKSLAS:

Susipažinti su ląstelių gyvybingumo nustatymu klonogeninės analizės metodu.

DARBO UŽDUOTYS:

1. Nustatyti ląstelių gyvybingumą po poveikio elektriniu impulsu ir citotoksiniu vaistu bleomicinu.

TEORIJA:

Ląstelių gyvybingumui nustatyti yra daug būdų. Dažnai naudojami metodai, kuriais galima iškart nustatyti gyvas ir mirusias ląsteles. Tokie metodai remiasi dažų, ar fluorescencinių molekulių naudojimu. Tai palyginus grubūs ir netikslūs metodai. Nesidalijančiom ląstelėm jie yra vieninteliai. Tačiau tokiu būdu nustatomas gyvybingumas gali skirtis nuo tikrojo ląstelių

gyvybingumo. Tikrajį gyvybingumą galime nustatyti tik augindami dalintis gebančias ląsteles ir skaičiuodami klonus (kolonijas) formuojančią ląstelių dalį.

Klonogeninė analizė arba kolonijų formavimo analizė yra *in vitro* ląstelių gyvybingumo analizė, pagrįsta vienos ląstelės gebėjimu formuoti koloniją. Ląstelė identiškų ląstelių, t.y. klonų, koloniją formuoja dalindamasi. Šiuo metodu nustatoma ląstelių geba „neribotai“ dalintis. Viena ląstelė laikoma gyvybinga, jeigu geba pasidalinti bent penkis kartus. Tikra kolonija laikoma tokia, kuri susideda iš mažiausiai 50 ląstelių.

Ląstelė yra atvira sistema ir nuolat keičiasi medžiagomis su aplinka. Ląstelės turinį nuo išorės skiria plazminė membrana, atliekanti daugybę fiziologinių funkcijų. Viena iš jų yra barjerinė: membrana suformuoja barjerą apie ląstelę, trukdantį molekulėms ir jonams laisvai judėti į ląstelę ar iš jos. Stipraus elektrinio lauko poveikis padidina membranos pralaidumą jonams ir įvairioms molekulėms. Šis reiškinys vadinamas elektroporacija.

Šiuo metu elektroporacija yra plačiai naudojama ląstelės biologijoje, biotechnologijoje ir medicinoje įvedimui į arba išvedimui iš gyvų ląstelių įvairių pro membraną nepraeinančių medžiagų, tokių kaip vaistai, DNR, RNR, baltymai, fermentai, antikūnai ir net mažos organelės. Vienas iš svarbių ir šiuo metu intensyviai tyrinėjamų elektroporacijos taikymų yra navikų elektrochemoterapija, kuri apibrėžiama, kaip kombinuotas navikų gydymas, derinant citotoksinius vaistus su lokalia elektroporacija.

Dažniausiai elektrochemoterapijoje naudojamas citotoksinis vaistas bleomicinas. Bleomicinas yra tirpus vandenyje mažas (1450 Da) glikopeptidinis antibiotikas. Jį atrado ir iš grybų *Streptomyces verticillus* išskyrė japonų mokslininkas Umezawa su kolegomis 1966 metais. Bleomicinas nužudo ląstelę tik patekęs į jos vidų. Tačiau pro nepažeistą membraną į ląstelę patenka tik labai nežymūs jo kiekiai. Ženkliai paspartinti bleomicino patekimą į ląstelės vidų ir taip sustiprinant jo poveikį, gali pagelbėti ląstelių elektroporacija. Tokiu būdu reikia šimtus ar tūkstančius kartų mažesnių bleomicino dozių, tam, kad nužudyti ląstelę, negu nenaudojant elektroporacijos. Ir tuo pačiu sumažinti pašalinio nepageidaujamo poveikio neelektroporotoms sveikoms ląstelėms tikimybę.

Bleomicinas ląstelėje virsta taip vadinamu aktyvuotu bleomicinu, kurio citotoksinis veikimas pagrįstas DNR grandžių oksidaciniu skėlimu jam sąveikaujant su DNR ir generuojant laisvuosius radikalus. Manoma, kad kiekviena aktyvuoto bleomicino molekulė gali sąlygoti 8-10 DNR trūkių. Maždaug 6-10 viengrandžių trūkių tenka vienam dvigrandžiam trūkiui.

Dėl bleomicino poveikio žuvusių ląstelių kiekį galima nustatyti pagal ląstelių gyvybingumą. Ląstelių gyvybingumą galima apskaičiuoti procentais atžvilgiu kontrolinių, nepaveiktų elektriniu impulsu ir/arba bleomicinu, ląstelių.

DARBO PRIEMONĖS:

1. Vertikalaus srauto laminaras Aura Vertical S.D.4 (Bioair Instruments, S.r.l., Siziano, Italija);
2. Inkubatorius su vandens marškinėliais IR AutoFlow Water-Jacketed Incubator NU-2500E (NuAire, Inc., Plymouth, JAV);
3. Automatinės pipetės Eppendorf, 10 µl, 200 µl, 1 ml;
4. Sterilios vienkartinės priemonės: 25 cm² ploto (60-75 ml tūrio) flakonai (Greiner Bio-One, GmbH, Frickenhausen, Vokietija), centrifuginiai mėgintuvėliai (15 ml ir Eppendorf 1,5 ml) ir antgaliai automatinėms pipetėms;
5. Elektroporatorius su plokšteliniais nerūdijančio plieno elektrodais;
6. Oscilografas C8-13 (Rusija);
7. Binokuliaras MBC – 9 (Rusija)

MEDŽIAGOS, REAGENTAI, TIRPALAI:

1. Pelių hepatomos MH-22A arba Kinijos žiurkėno kiaušidžių ląstelės
2. Bleomicino hidrochloridas (Bleocin[®], Nippon Kayaku Co. Ltd., Tokyo, Japonija)
3. Fiziologinis tirpalas (0,9% NaCl) (Balkanpharma-Troyan AD, Troyan, Bulgarija)
4. Ląstelių augimo terpė (paruošta iš: Dulbecco's modifikuotos Eagle's terpės - DMEM (Produktas Nr. D5546, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija), 10% embrioninio jaučio serumo - FBS (F7524, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija), 1% L – Glutamino tirpalo (G7513, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija), 100 U/ml penicilino ir 100 µl streptomicino antibiotikų (P0781, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija).
5. Minimum essential medium Eagle (S-MEM) (M8167, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija)
6. Gram kristalo violeto tirpalas (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Vokietija)
7. Etanolis 96% (AB Stumbras, Kaunas, Lietuva)

DARBO EIGA:

1. Ląstelės pakeliamos, gautos ląstelių suspensijos koncentracija nustatoma ir norima koncentracija gaunama taip kaip aprašyta laboratorinio darbo „DARBO LAŠTELIŲ KULTŪRŲ LABORATORIJOJE PAGRINDAI“ apraše.

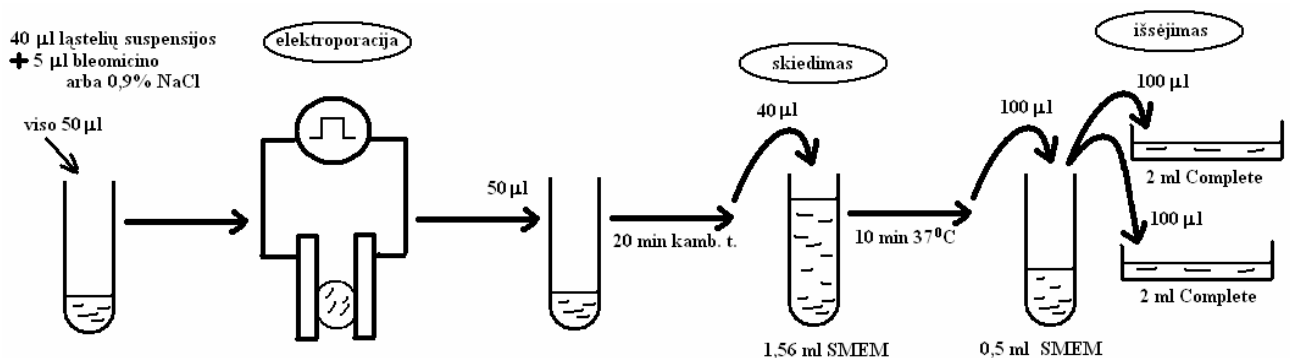
2. Prieš eksperimentą užrašomi užrašai ant mėgintuvėlių ir susipilstomos terpės. Kiekvienam eksperimento taškui turi būti paruošta: 2 tušti 1,5 ml tūrio mėgintuvėliai (iš jų viename bus paruoštas tirpalas elektroporacijai, o į kitą bus dedamas jau elektroporuotas tirpalas), 1 mėgintuvėlis (2 ml talpos) su 1,56 ml SMEM terpės (skiedimui), 1 mėgintuvėlis su 0,5 ml SMEM terpės ir 2 petri lėkštelės su 2 ml auginimo terpės (Complete) (išsėjimui).

3. Eksperimentas atliekamas pagal 1 pav. pateiktą schemą. Elektroporacija atliekama 24-26 °C temperatūroje laminare steriliomis sąlygomis. Į kiekvieną mėgintuvėlį skirtą paruošti tirpalą prieš elektroporaciją dedama po 45 μl ląstelių ir 5 μl 0,9% NaCl arba bleomicino Ląstelių suspensiją ir po to NaCl ar bleomiciną į kiekvieną iš šių mėgintuvėlių dėti tik prieš pat elektroporavimą. Viso susidaro 50 μl tirpalas. Tirpalas gerai išmaišomas, dedamas tarp elektrodų ir elektroporuojama. Elektrinio impulso parametrus nurodo dėstytojas arba laborantas.

4. Elektroporuotas tirpalas išimamas iš elektrodų, dedamas į naują ependorfinį mėgintuvėlį ir inkubuojamas 20 min kambario temperatūroje. Elektrodoai praplaunami 50 μl S-MEM terpe. Tuomet galima elektroporuoti kito eksperimentinio taško suspensiją ir t.t..

5. Po 20 min inkubacijos kambario temperatūroje tirpalas gerai išmaišomas ir 40 μl tirpalo dedama į sušildytą ependorfinį mėgintuvėlį su 1,56 ml S-MEM terpės ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 10 min.

6. Po inkubacijos šis tirpalas gerai išmaišomas, ir 100 μl šio tirpalo dedama į ependorfinį mėgintuvėlį su 0,5 ml 37 °C S-MEM tirpalu. Viskas gerai išmaišoma. Tuomet po 100 μl šio tirpalo išsėjama į 2 petri lėkšteles su 2 ml augimo terpės. Lėkštelės švelniai pajudinamos, kad ląstelės jose geriau pasiskirstytų.



1 pav. Eksperimento schema elektroporacijos ir bleomicino įtakos ląstelių gyvybingumui nustatyti.

7. Išsėtos pelių hepatomos MH-22A ląstelės auginamos inkubatoriuje 9-10 dienų, o Kinijos žiurkėno kiaušidžių ląstelės – 6-7 dienas.

8. Po 9-10 (MH-22A ląstelių atveju) ar 6-7 (Kinijos žiurkėno kiaušidžių ląstelių atveju) dienų susiformavusios kolonijos fiksuojamos. Prieš fiksavimą pašalinama augimo terpė iš Petri lėkštelių. Ląstelių kolonijos 15 min. fiksuojamos 96 % etanoliu, į Petri lėkštelę dedant 1 ml etanolio. Po to etanolis nupilamas, Petri lėkštelės nuplaunamos po šaltu tekančiu vandeniu ir dažomos Gram kristalo violeto tirpalu. Po to Petri lėkštelės vėl nuplaunamos po tekančiu vandeniu ir džiovinamos.

9. Ląstelių kolonijos skaičiuojamos binokuliario MBC – 9 pagalba, naudojant x16 didinimą. Ląstelių gyvybingumas apskaičiuojamas procentais atžvilgiu kontrolinių, nepaveiktų elektriniu impulsu ir/arba bleomicinu, ląstelių.

10. Nubraižomas ląstelių gyvybingumo priklausomybės nuo bleomicino koncentracijos grafikas.

11. Parašomos išvados.

KONTROLINIAI KLAUSIMAI:

1. Klonogeninė analizė.
2. Citotoksinio vaisto bleomicino veikimo mechanizmas.
3. Elektroporacijos reiškinys ir jo taikymai.

LITERATŪRA:

1. Cook J.A. and Mitchell J.B. Viability measurements in mammalian cell systems, *Anal. Biochem.*, 179 (1989) 1-7.
2. Franken N.A.P., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., and van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*, *Nat. Protocols*, 1 (2006) 2315-2319.
3. Neumann E. and Rosenheck K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes, *J. Membr. Biol.*, 10 (1972) 279-290.
4. Mir L.M., Orłowski S., Belehradek J., and Paoletti C. Electrochemotherapy: potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses, *Eur. J. Cancer*, 27 (1991) 68-72.
5. Mir L.M., Tounekti O., and Orłowski S. Bleomycin: revival of an old drug, *Gen Pharmacol*, 27 (1996) 745-748.