

ВЛИЯНИЕ СИНХРОНИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ VERO НА РЕЗУЛЬТАТЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

О.В. Верле, Е.В. Зыкова, О.В. Островский, В.Е. Веровский

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кафедра теоретической биохимии с курсом клинической биохимии*

В работе использовался метод сывороточного голодания для синхронизации культуры клеток Vero на границе фаз G₀/G₁. Эффективность синхронизации составила 40 %, коэффициент элонгации – 1,657 ± 0,26, коэффициент расплывания – 1,399 ± 0,123. Синхронизация клеток позволяет получить популяцию клеток, реагирующих одинаково в узком диапазоне доз и более устойчивых к токсическому воздействию.

Ключевые слова: синхронизация, клеточный цикл, клеточная культура, цитотоксичность.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-34-37

INFLUENCE OF VERO CELL CULTURE SYNCHRONIZATION ON THE RESULTS OF CYTOTOXIC TESTS IN THE STUDY OF NEW MEDICINES

O.V. Verle, E.V. Zyкова, O.V. Ostrovskii, V.E. Verovskii

*FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation,
Department of theoretical biochemistry with a course of clinical biochemistry*

In this investigation used the method of serum starvation to synchronize the culture of Vero cells at the G₀/G₁. The synchronization efficiency was 40 %, the elongation coefficient was 1,657 ± 0,26, and the flattening coefficient was 1,399 ± 0,123. Cell synchronization provides to get a population of cells that respond identically in a narrow dose range and are more resistant to toxic effects.

Key words: synchronization, cell cycle, cell culture, cytotoxicity.

Изучение биологической активности новых химических веществ, независимо от последующей цели их использования, на первом этапе предполагает оценку их токсичности, чаще всего с использованием культур клеток.

При выборе культуры клеток для исследований, не последнюю роль играет возможность синхронизовать культуру в определенной фазе клеточного цикла, так как синхронизация клеточных популяций представляет возможность изучить молекулярные и функциональные изменения, происходящие как при перемещении клеток через клеточный цикл, так и в строго определенной его фазе.

В растущей культуре можно обнаружить клетки во всех стадиях клеточного цикла, и ответ, полученный от такой гетерогенной системы, будет характеризоваться очень высокой вариабельностью. Поэтому процедура синхронизации может решить эту проблему.

В настоящее время известно большое количество эффективных методов, позволяющих синхронизовать культуру в определенной фазе клеточного цикла, однако идеального метода синхронизации нет. Одни методы характеризуются низким выходом синхронизированных клеток, другие – нарушают физиологическую активность, третьи – токсичны для самих клеток или могут исказить результаты ответа клеток в цитологических тестах. Кроме того, для нормальных или опухолевых клеток методы синхронизации различны.

В настоящем исследовании использовался метод сывороточного голодания, который синхронизирует клетки на границе фаз G₀/G₁ [3]. Удаление

сыворотки из среды выращивания культуры клеток в течение 24 ч приводит к накоплению клеток в фазе G₁. Этот блок легко снимается и, после добавления сыворотки, клетки могут вступить в S-фазу. С высокой степенью эффективности этот метод можно применять для нетрансформированных клеток, поскольку в раковых клетках пролиферация слабо зависит от наличия в среде сыворотки и факторов роста.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить влияние синхронизации клеточной линии Vero на результаты цитотоксических тестов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнялось на монослойной клеточной культуре Vero. Культивирование клеток проводилось в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением 10%-й фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (ПанЭко), L-глутамин и смеси антибиотиков пенициллин-стрептомицин (ПанЭко).

Культуральные флаконы с клетками инкубировали в CO₂-инкубаторе в условиях относительной влажности 90 % и выше, температуре 37 °C и концентрации CO₂ 5 %. Пересев клеток осуществлялся при достижении ими конфлюэнтного состояния (90–95 %). Снятие клеток со дна культурального флакона производили раствором трипсин (0,25 %) – версен (0,02 %) в соотношении 1:2 с последующим разведением в полной питательной среде DMEM при плотности посева 1,0-3,0*10⁴.

Для синхронизации клеточной культуры суспензию клеток рассеивали на два культуральных флакона (75 см³), 96-луночные планшеты и на пластиковые чашки Петри для культивирования в полную среду с концентрацией ФБС 10 %. Клетки культивируются до достижения плотного монослоя, после чего в одном из флаконов производится замена культуральной среды на обедненную с концентрацией ФБС 0,1 %. Культивирование в обедненной среде проводится в течение 18–24 часов для достижения синхронизации клеток *Vero* на границе фаз G₀/G₁.

Оценка эффективности синхронизации производилась с помощью проточного цитофлуориметра Guava Muse, LumineX с использованием стандартного набора для изучения клеточного цикла Muse Cell Cycle assay. Анализ основан на дифференциальном окрашивании клеток флуоресцентным интеркалирующим ядерным красителем пропидий йодит (PI) на основе содержания ДНК в клетке.

Морфологическая оценка состояния синхронизированных и не синхронизированных клеток проводилась путем микроскопирования нативных образцов и образцов, окрашенных по Романовскому – Гимзе.

Для оценки цитотоксичности фармацевтической субстанции РУ-185 использовали тест с поглощением нейтрального красного (НК-тест). Исследуемое соединение изучали в диапазоне доз от 1*10⁻³ до 1*10⁻⁵ М. В качестве отрицательного контроля использовался физиологический раствор в эквивалентных количествах. Инкубация с веществом проводилась на протяжении 2 часов в условиях культурального инкубатора. Затем среду с веществом отбирали, клетки промывали раствором Хэнкса и заливали в каждую лунку 96-луночного планшета по 250 мкл полной среды с добавлением красителя нейтральный красный (НК) в конечной концентрации 25 мкг/мл. Инкубировали с красителем в течение (3 ± 0,1) ч (t = 37 °С, СО₂ = 5 %, влажность 95 %). На протяжении всего периода инкубации наблюдали кристаллообразование нейтрального красного в клетках. После инкубации среду с красителем отбирали и клетки промывали с 250 мкл раствора Хэнкса. Затем добавляли в каждую лунку по 100 мкл десорбирующего раствора (1%-я ледяная уксусная кислота и 50%-й этанол в дистиллированной воде). Планшет с десорбирующим раствором встряхивали на защищенном от света шейкере в течение 20–45 минут для полной экстракции нейтрального красного из клеток и образования гомогенного раствора. Адсорбция измерялась при λ = (540 ± 1) нм, используя в качестве референса лунки с десорбирующим раствором.

Площадь проекции клеток на подложку (площадь клетки), коэффициент расплывания Rp/Ra, дисперсию, элонгацию и степень поляризации анализировали в цифровом виде с помощью программы Image J 1.51k [2]. Так как для анализа

вышеописанных параметров клеток использовались относительные величины, то значения их оставляли в пикселях.

Все эксперименты с культурами клеток проводились в трехкратных повторах.

Статистическую обработку проводили с помощью следующих пакетов программ и программных продуктов: Excel из пакета Office XP («Microsoft», США), Statistica 6.0 (США), OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя полученные гистограммы после обработки клеток PI (рис. 1), наблюдали блок клеточного цикла на границе G₀/G₁ в образцах, растущих в обедненной клеточной среде (0,1 % ФБС) (рис. 1 в, г) по сравнению с клетками, растущими в стандартных условиях (10 % ФБС) (рис. 1 а, б). После проведенного гейтирования в пробе без синхронизации 53,7 % клеток находятся в стадии клеточного цикла на границе G₀/G₁, 6,6 % – в S-фазе и 39,7 % – на границе фаз G₂/M. После синхронизации картина распределения выглядела следующим образом: 93,8 % – граница фаз G₀/G₁, 5,3 % – S-фаза и 0,9 % – граница фаз G₂/M. Таким образом, применяя методику сывороточного голодания, можно добиться синхронизации клеточного цикла клеток линии *Vero* на границе G₀/G₁ с эффективностью 40 %.

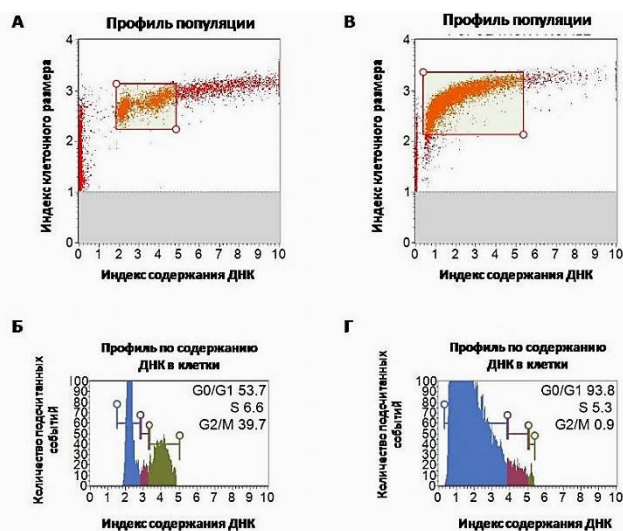


Рис. 1. Результаты синхронизации клеток *Vero* методом сывороточного голодания, полученные с прибора Guava Muse. Окраска стандартным набором Muse Cell Cycle assay.

А, Б – без синхронизации; В, Г – после синхронизации

При визуальном анализе нативных и окрашенных препаратов (рис. 2, 3) клеток, культивируемых как в полной среде, так и в условиях сывороточного голодания, изменения фибробластоподобной формы не происходит. В образцах без

синхронизации наблюдается активное деление, форма клеток стремится к мультиполярности, в отличие от синхронизированных образцов, где клетки имеют в большей степени биполярную морфологию (рис. 2, 3).

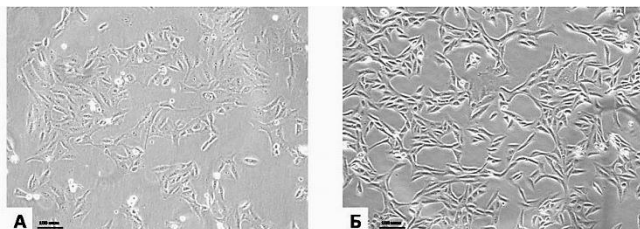


Рис. 2. Клетки Vero: а – без синхронизации, б – после синхронизации, фазово-контрастная микроскопия, ув. $\times 400$

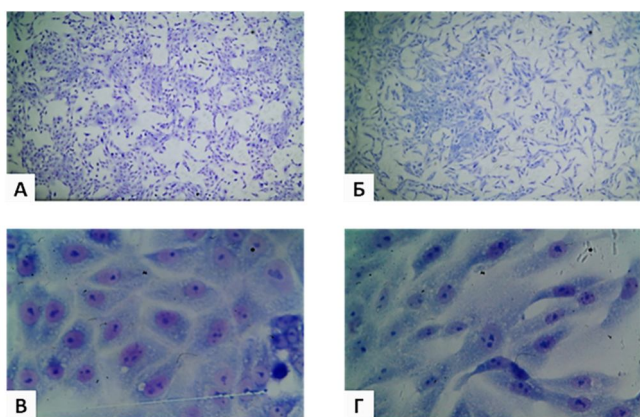


Рис. 3. Клетки Vero: а, в – без синхронизации, б, г – после синхронизации, окраска по Романовскому – Гимзе, (а, б – ув. $\times 200$, в, г – ув. $\times 1000$)

Отношение средней площади клеток из образцов с содержанием 10 % ФБС в среде к средней площади синхронизированных клеток равно 1,122, что свидетельствует об уменьшении площади клеток.

Коэффициент распластывания Rp/Ra для обоих образцов больше единицы (табл.), но для клеток, культивируемых в условиях сывороточного голодания, наблюдается тенденция к его увеличению, хотя статистически значимых различий между значениями обнаружено не было ($p = 0,173$). $\ln(Rp/Ra)$ также увеличивается недостоверно ($p = 0,155$). Коэффициент распластывания Rp/Ra был предложен в работе Кузьминых Е.В. и др. [1, 4]. Этот показатель равен отношению радиуса (Rp), рассчитанного из величины периметра клетки, взятого как длина окружности, и радиуса (Ra), рассчитанного из величины площади клетки, принятой за площадь круга [1, 4]. Чем выше величина этого коэффициента, тем сильнее клетка распластана на подложке. Кроме того, в работе оценивали величину натурального логарифма этого коэффициента – $\ln(Rp/Ra)$, поскольку шкала для оценивания после подобных математических преобразований становится более равномерной.

Значение элонгации в образцах синхронизированных клеток увеличивается не достоверно ($p = 0,08$), но рост этого параметра свидетельствует об увеличении степени вытянутости клеток и стремлении их приобрести биполярную морфологию (табл.). Элонгация является величиной, характеризующей степень вытянутости клеток (биполярность), и равна нулю у радиально симметричных фигур. Данная величина определяется как \log_2 от отношения длинной оси эквимоментного эллипса фигуры к его короткой оси (Brown et al., 1989).

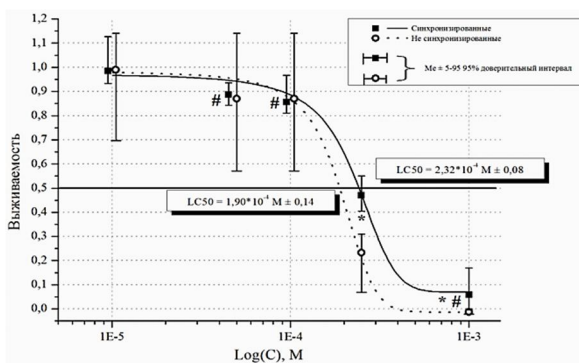
Степень дисперсии уменьшается в 1,27 раз при синхронизации, но данное изменение также не несет достоверного характера ($p = 0,868$) (табл.). Дисперсия – это величина, отражающая степень «изрезанности» края клетки (мультиполярность), и равна нулю для любого эллипса. Она определяется как \log_2 от отношения площади равномоментного эллипса контура к площади этого контура. Полученные результаты вполне закономерны, поскольку с увеличением степени элонгации значение дисперсии неминуемо уменьшается.

Поляризация клеток увеличивается недостоверно ($p = 0,768$) (табл.), но наблюдается стойкая тенденция к увеличению этого параметра, в большей степени за счет увеличения элонгации. Степень поляризации оценивается как сумма двух компонентов: дисперсии и элонгации. Таким образом, при синхронизации клеточной культуры Vero наблюдается основной пул клеток в стадии поляризации, что как раз характерно для фибробластоподобных культур.

Морфометрические параметры клеток Vero

Клетки	Rp/Ra	$\ln(Rp/Ra)$	Элонгация	Дисперсия	Поляризация
Несинхронизированные	$1,189 \pm 0,080$	$0,171 \pm 0,071$	$0,879 \pm 0,344$	$-0,388 \pm 0,187$	$0,492 \pm 0,897$
Синхронизированные	$1,399 \pm 0,123$	$0,332 \pm 0,860$	$1,657 \pm 0,260$	$-0,493 \pm 0,599$	$1,164 \pm 1,519$

Поскольку основная цель работы заключалась в оценке влияния синхронизации клеточной линии Vero на результаты цитотоксических тестов, нами было проведено исследование фармацевтической субстанции (ФС) РУ-185 в тесте с поглощением нейтрального красного. Обнаружено, что при воздействии ФС РУ-185 в концентрациях $0,25 \cdot 10^{-3} M$ и $1 \cdot 10^{-3} M$ наблюдается выраженный цитотоксический эффект. При этом, в результатах, полученных для данных экспериментальных точек, наблюдаются статистически значимые отличия между синхронизированными и не синхронизированными клетками ($p < 0,05$, критерий Манна – Уитни) (рис. 4). Для ФС РУ-185 в дозах, не входящих в цитотоксический диапазон, данный эффект не наблюдался.



РУ-185	σ несинхр	σ синхр	Bartlett	p
Контроль	0,08	0,05	1,55	0,21
$1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	0,16	0,09	2,23	0,14
$0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	0,21	0,04	<u>7,96</u>	<u>0,005</u>
$1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	0,20	0,07	<u>3,91</u>	<u>0,048</u>
$0,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	0,09	0,06	0,91	0,34
$1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	0,008	0,07	<u>14,59</u>	<u>0,0001</u>

* $p < 0,05$ по критерию Манна – Уитни, # $p < 0,05$ по критерию Бартлетта.

Рис. 4. Выживаемость клеток линии Vero при воздействии фармацевтической субстанции РУ-185. Метод поглощения нейтрального красного. Статистически значимые различия между синхронизированными и несинхронизированными клетками

Основной задачей, стоящей перед цитотоксическими тестами, является расчет LC_{50} – полулетальной концентрации для клеточной популяции. Данный показатель необходим для выбора условий проведения последующих экспериментов по изучению токсических свойств новых химических соединений. После построения дозозависимых кривых при исследовании цитотоксичности ФС РУ-185 на синхронизированных и не синхронизированных клетках линии Vero, было выявлено, что для первых $LC_{50} = 2,32 \cdot 10^{-4} \text{ M} \pm 0,08$, а для вторых $LC_{50} = 1,90 \cdot 10^{-4} \text{ M} \pm 0,09$ [$\bar{x} \pm \sigma$]. Разница между этими значениями несет достоверный характер ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента). LC_{50} рассчитывался графически по дозозависимой кривой с помощью программного обеспечения OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation).

Значение функции вычисляли по формуле:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log Cx_0 - x)p}}, \text{ а значение } LC_{50} \text{ по формуле: } LC_{50} = 10^{\log x_0}.$$

Крутизна наклона кривой (рис. 4) больше для синхронизированных клеток (-6468,14), что указывает на то, что большая часть клеточной популяции будет реагировать на действие повреждающего агента приблизительно одинаково в узком диапазоне доз. При этом пологий наклон графика (-9245,77), полученный для несинхронизированных клеток, свидетельствует о существенных различиях внутри клеточной популяции в чувствительности к ФС РУ-185.

В пользу данного факта свидетельствуют и результаты, полученные в тесте Бартлетта (рис. 4), при проверке равенства дисперсий для синхронизированных и не синхронизированных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метод сывороточного голодания позволяет добиться синхронизации клеточного цикла клеток линии Vero на границе фаз G_0/G_1 , при этом клетки приобретают удлиненную поляризованную форму (коэффициент элонгации равен $1,657 \pm 0,260$) с коэффициентом распластывания $1,399 \pm 0,123$.

Процедура синхронизации клеточной линии Vero позволяет получить популяцию клеток, реагирующих одинаково в узком диапазоне доз и более устойчивых к воздействию ФС РУ-185 (LC_{50} достоверно больше, чем для несинхронизированных клеток). Вариабельность данных при этом меньше, чем в популяции несинхронизированных клеток линии Vero.

ЛИТЕРАТУРА

- Петров Ю.П., Терюкова Н.П., Снопов С.А. Поведение клеток монослойной линии гепатомы Зайдела в области экспериментальной раны // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 4.
- Шутова М.С., Александрова А.Ю. Сравнительное исследование распластывания нормальных и трансформированных фибробластов. Роль полимеризации микрофиламентов и актин-миозинового сокращения // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 1. – С. 41–51.
- Banfalvi G., et al. Cell culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells // Apoptosis. – 2007. – Vol. 12, № 7. – P. 1219–1228.
- Kuz'minykh E.V., Petrov Y.P. A simple model for the study of effects of the extracellular matrix on the cell morphology *in vitro* // Biochim. biophys. acta. – 2004. – № 1671. – P. 18–25.

REFERENCES

- Petrov Yu.P., Teryukova N.P., Snopov S.A. Povedenie kletok monoslojnoj linii gepatomy Zajdela v oblasti eksperimental'noj rany [Behavior of cells of the monolayer line of Zaydela hepatoma in the area of the experimental wound]. Citologiya [Cytology], 2018, Vol. 60, no. 4. (In Russ.; abstr. in Engl.).
- Shutova M.S., Aleksandrova A.Yu. Sravnitel'noe issledovanie rasplastyvaniya normal'nyh i transformirovannyh fibroblastov. Rol' polimerizacii mikrofilamentov i aktin-miozinovogo sokrashcheniya [A comparative study of the spreading of normal and transformed fibroblasts. The role of microfilament polymerization and actin-myosin contraction]. Citologiya [Cytology], 2010, Vol. 52, no. 1, pp. 41–51. (In Russ.; abstr. in Engl.).
- Banfalvi G., et al. Cell culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells. Apoptosis, 2007, Vol. 12, no. 7, pp. 1219–1228.
- Kuz'minykh E.V., Petrov Y.P. A simple model for the study of effects of the extracellular matrix on the cell morphology *in vitro*. Biochim. biophys. acta., 2004, no. 1671, pp. 18–25.

Контактная информация

Верле Ольга Владимировна – ассистент кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: Verle_olga@mail.ru