

Отчет о проведенном исследовании

Киселевский М.В., Халтурина Е.О.

Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина
РАМН

Ход исследования: Исследование проводилось на лимфоцитах здоровых доноров. Кровь получена из донорского пункта РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли по стандартной методике в градиенте плотности фикола-урографина $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$. Полученные мононуклеарные клетки вносили в лунки 96-луночного микропланшета ("Costar") в количестве 60 тыс. клеток на одну лунку в 100 мкл культуральной среды. Затем в лунки добавляли тестируемые вещества (I, A, B, G, J), при этом конечные концентрации этих веществ составили 1мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,01 мг/мл, 0,001 мг/мл, 0,0001 мг/мл, 0,00001 мг/мл. Инкубацию в условиях CO_2 -инкубатора в атмосфере 5% CO_2 , 100% влажности и при температуре 37⁰С проводили в течение 24 и 48 часов. По окончании инкубации в лунки вносили опухолевые клетки линии K-562 (эритробластный лейкоз человека) в количестве 30 тыс. клеток на лунку. Таким образом, соотношение клеток-эффекторов и клеток-мишеней составило 2:1. Варианты исследования тестированы в триплетах.

Цитотоксический тест

МТТ-метод определения жизнеспособности клеточных культур заключается в способности живых клеток превращать растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза (МТТ-ф). Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. Интенсивность превращения МТТ в МТТ-ф отражает общий уровень дегидрогеназной активности исследуемых клеток и модулируется активностью сопряженных ферментных систем, например, дыхательной цепи переноса электронов и т.д.

Раствор МТТ приготовлен в концентрации 5 мг/мл на основе солевого раствора Хенкса.

После окончания совместной инкубации клеток-эффекторов и клеток-мишеней (через 18-24 час. в атмосфере 5% CO_2 , 100% влажности и при температуре 37⁰С) во все лунки планшета было добавлено по 20 мкл рабочего раствора МТТ. После 3-4 часовой инкубации в CO_2 -инкубаторе (условия те же) планшеты центрифугированы при 1500 об/мин в течение 5 минут, удалили супернатант и в каждую лунку добавили по 150 мкл ДМСО (диметилсульфоксид, "Serva"). Через 30 минут инкубации при комнатной температуре, после полного растворения кристаллов формаза измерена оптическая плотность содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре ("MultiScan MCC 340", Labsystems) при длине волны 540

нм. Цитотоксичность выражена цитотоксическим индексом (ЦИ) в процентах.

Расчет ЦИ проводился по стандартной формуле:

$$\text{ЦИ (\%)} = [1 - (\text{ОП}_{\text{э+м}} - \text{ОП}_{\text{э}}) / \text{ОП}_{\text{м}}] * 100$$

Где: $\text{ОП}_{\text{э+м}}$ – значение оптической плотности в опытных сериях;

$\text{ОП}_{\text{э}}$ – значение оптической плотности в лунках с эффекторами;

$\text{ОП}_{\text{м}}$ – значение оптической плотности в лунках с мишенями.

Результаты:

Таблица №1

Цитотоксический индекс (%)

	1 мг/мл		0,1 мг/мл		0,01 мг/мл		0,001 мг/мл		0,0001 мг/мл		0,00001 мг/мл
	24 ч.	48 ч.	24 ч.	48 ч.	24 ч.	48 ч.	24 ч.	48 ч.	24 ч.	48 ч.	24 ч.
I	35	19.3	17	50	29	54.7	18	15.3	18	40.7	15
A	13.5	23.3	20.3	12	35	17	28.5	42	10	48	20.3
B	13.3	48	10.6	82.7	29	96.7	30	69.4	21.6	54	76
G	80	97	47	94	24	99	12	90	30	96	26.3
J	16	68	37	49	47	45	47	35	16.1	58	34.3

Как следует из данных, представленных в таблице №1, все тестируемые вещества обладают стимулирующим действием на противоопухолевую и цитотоксическую активность лимфоцитов здоровых доноров при испытании на НК-чувствительной линии опухолевых клеток К-562.

Наибольший стимулирующий эффект отмечается через 48 часов. Наиболее эффективный диапазон воздействующих концентраций от 0,1 до 0,0001 мг/мл. Наиболее эффективными в данных условиях эксперимента оказались тестируемые вещества В и G, которые через 48 часов инкубации значительно повысили киллерную активность мононуклеарных клеток, что привело к лизису 80-99% опухолевых клеток.

В контрольной серии экспериментов прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки в исследуемом диапазоне концентраций для тестируемых веществ не обнаружено.

Спонтанная цитотоксическая активность не стимулированных мононуклеаров составила $18\pm 6\%$.

Заключение:

Таким образом, тестируемые вещества обладают стимулирующим действием на противоопухолевую и цитотоксическую активность мононуклеарных клеток крови здоровых доноров, при этом наибольший эффект наблюдается через 48 часов инкубации мононуклеаров с различными концентрациями тестируемых веществ. Оптимальным уровнем воздействующих концентраций следует считать от 0,1 до 0,0001 мг/мл. Среди тестируемых веществ наибольшим стимулирующим действием обладают соединения В и G, инкубация с которыми приводит к увеличению цитотоксичности мононуклеарных клеток в среднем с $18\pm 6\%$ до 80-99%.

Замечательные результаты!

Следует продолжить для набора фактов.

подпись /Воробьев А.А./