

Ημερομηνία: 25 Φεβρουαρίου 2019

Προς: iCHEMAID I.K.E
Πλάτωνος 14, Χαλάνδρι Αττικής
ΤΚ 15233

Εργαστήριο SOL - GEL

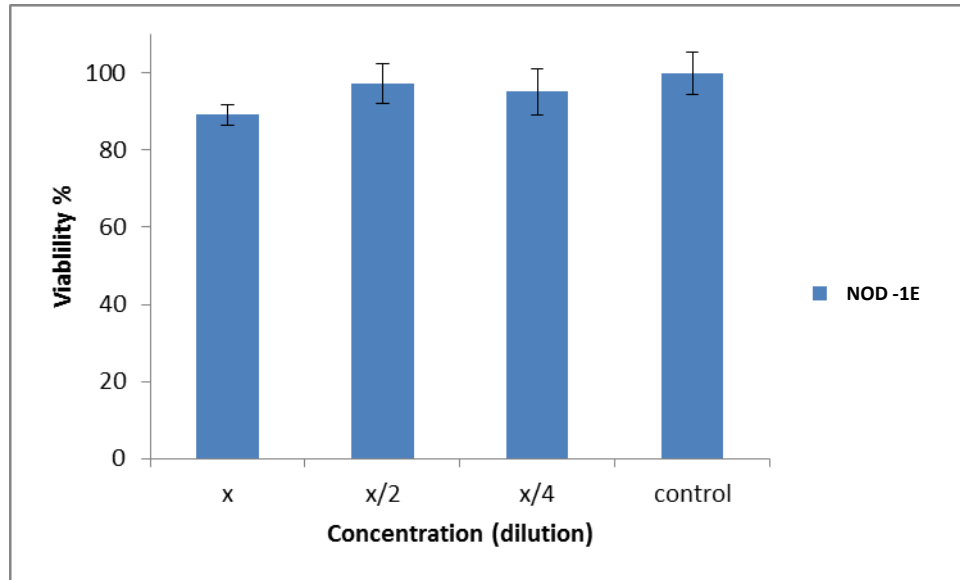
Αξιολόγηση τοξικότητας NOD – 1E

MTT Μέθοδος

Η μέθοδος MTT χρησιμοποιείται με σκοπό να αξιολογηθεί η κυτταρική τοξικότητα υλικών σε διαφορετικούς χρόνους επώασης όπως 24 ή 48 h (S. Patitungkho, S. Adsule, P. Dandawate, S. Padhye, A. Ahmad, F. H. Sarkar, Bioorg.Med.Chem.Lett. 21 (2011) 1802-1806., V. Uivarosi, Molecules. 18 (2013) 11153-11197.3. A.-E. Radi, The opened chemical and biomedical methods journal 3 (2010) 27-36.), για διαφορετικές συγκεντρώσεις επώασης. Είναι γνωστό ότι το MTT απορροφάτε στα μιτοχόνδρια των και μετατρέπεται σε φορμαζίνη από το ένζυμο υδρογεννάση. Αρχικά $1 \cdot 10^4$ κύτταρα τοποθετούνται σε φρεάτια πλακιδίων (96 φρεατίων πλακίδια) και αφήνονται προς ανάπτυξη για 24 h ώστε να φτάσουν τον κατάλληλο αριθμό. Στη συνέχεια τοποθετείται το προς εξέταση υλικό σε διαφορετικές αραιώσεις και το πλακίδιο τοποθετείται σε φούρνο στους 37 °C, 5% CO₂ Μετά από 24 h επώαση το καλλιεργητικό υλικό απομακρύνεται και τοποθετείται το MTT σε συγκέντρωση 0.5 mg/ml, και τα κύτταρα επωάζονται για επιπλέον 4 h στις ίδιες συνθήκες επώασης. Στο χρονικό διάστημα των 4 ωρών αναπτύσσονται μωβ κρύσταλλοι φορμαζίνης το οποίο χρώμα είναι ενδεικτικό των ζώντων κυττάρων. Οι κρύσταλλοι διαλύονται σε DMSO και μετράται η απρόρροφηση σε UV φασματοφωτόμετρο στα 520 nm (Reference wavelength 640 nm). Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται ως μέσος όρος 3 πειραμάτων στις διαφορετικές αραιώσεις του **NOD -1E** (x, x/2, x/4). (E. K. Efthimiadou, H. Thomadaki, Y. Sanakis, C. P. Raptopoulou, N. Katsaros, A. Scorilas, A. Psomas, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 64-73. , E. K. Efthimiadou, M.E. Katsarou, A. Karaliota, G. Psomas, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 910-920., M. E. Katsarou, E. K. Efthimiadou, G. Psomas, A. Karaliota, D. Vourloumis, J. Med. Chem. 51 (2008) 470)

Αποτελέσματα Κυτταρικής βιωσιμότητας

Το υλικό (**NOD -1E**) μετρήθηκε για την τοξικότητα του με την έμμεση μέθοδο MTT σε κύτταρα NCTC (Ceratinocytes cell line), υγιή δερματικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 1)



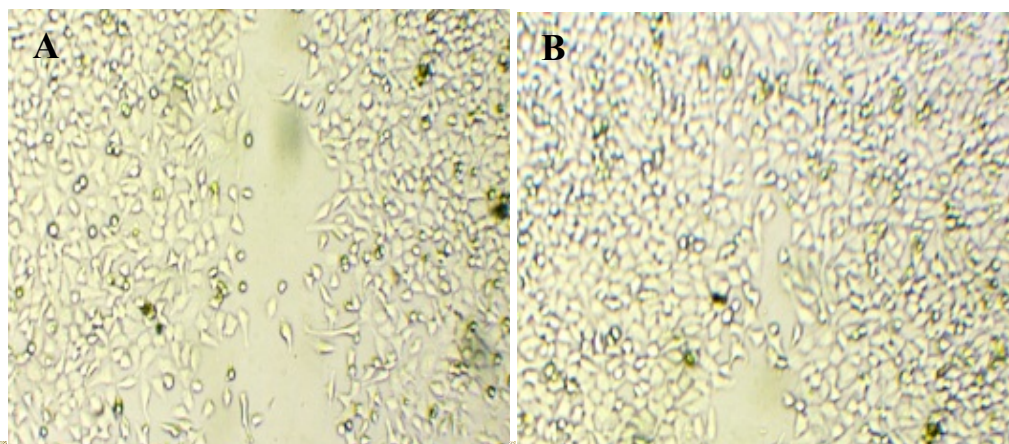
(εικόνα 1)

Μελέτη τοξικότητας του NOD -1E σε διαφορετικές αραιώσεις

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα **δεν παρατηρείται τοξική επίδραση** του υλικού στα κύτταρα κατά την επώαση των 24 ωρών. Δεν είναι προφανώς δυνατός ο υπολογισμός των IC 50 εξαιτίας της **μη ύπαρξης τοξικότητας**.

Δοκιμασία επούλωσης πληγών

Η δοκιμασία επούλωσης πληγών είναι πειραματική διαδικασία η οποία χρησιμοποιείται ευρέως και έχει τροποποιηθεί κατάλληλα για να μελετήσει τη μετανάστευση κυττάρων in vitro. Το διάκενο τραύματος σε κυτταρική μονοστιβάδα δημιουργείται με την αλλοίωση της μονόστοιβης κυτταρικής καλλιέργειας και το κενό μπορεί να επουλωθεί με μετανάστευση κυττάρων. Η παρακολούθηση του ρυθμού επούλωσης των κυττάρων παρουσία η απουσία οποιασδήποτε δραστικής ουσίας μας δίνει έμμεσες πληροφορίες σχετικά με την αναστολή πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, για να δημιουργηθεί η μονοστιβάδα, ένα τρυβλίο με 6 πηγάδια πλαστικού πυθμένα πληρώνεται με την επιθυμητή κυτταρική σειρά. Ένα εναιώρημα των κυττάρων με ειδική πυκνότητα σε μέσα καλλιέργειας θα δημιουργήσει μια μονοστιβάδα εντός μίας ημέρας από την έναρξη ($5 * 10^6$ κύτταρα). Μετά από αυτό, η πλάκα επώαζεται στους 37 °C κάτω από 5% CO₂ σε κατάλληλη υγρασία. Μετά την 24 ώρες ανάπτυξη των κυττάρων δημιουργείται μια τομή με τη βοήθεια ενός πλαστικού τιπ. Η χαραγμένη μονοστιβάδα πλένεται προς αποφυγή της επανακαθίζησης αιωρούμενων κυττάρων και στη συνέχεια τοποθετείται νέο θρεπτικό υλικό. Το υπό μελέτη υλικό, **NOD -1E**, σε υψηλή συγκέντρωση εισήχθη και παρακολούθηθηκε με οπτική μικροσκοπία προκειμένου να αξιολογηθεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό της πληγής επιβεβαιώνουμε ότι όταν επεξεργαζόμαστε τα κύτταρα με το υλικό για 24 ώρες η πληγή απουλώνεται σε μεγάλο ποσοστό (εικόνα 2).



(εικόνα 2)

Πρωτόκολλο επούλωσης πληγής έμμεσου προσδιορισμού τοξικότητας του NOD-1E σε υγιή κύτταρα

A: χρόνος t=0

B: χρόνος t=24 h

Συμπέρασμα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα δύο πειράματα το NOD -1E φαίνεται να μην προκαλεί τοξικότητα στα υγιή κύτταρα ακόμη και στην υψηλότερη συγκέντρωση.

Υπεύθυνη της μελέτης

Ευθυμιάδου Κ. Ελένη
Επ. Καθηγήτρια Χημείας ΕΚΠΑ
Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια ΕΚΕΦΕ «Δ»