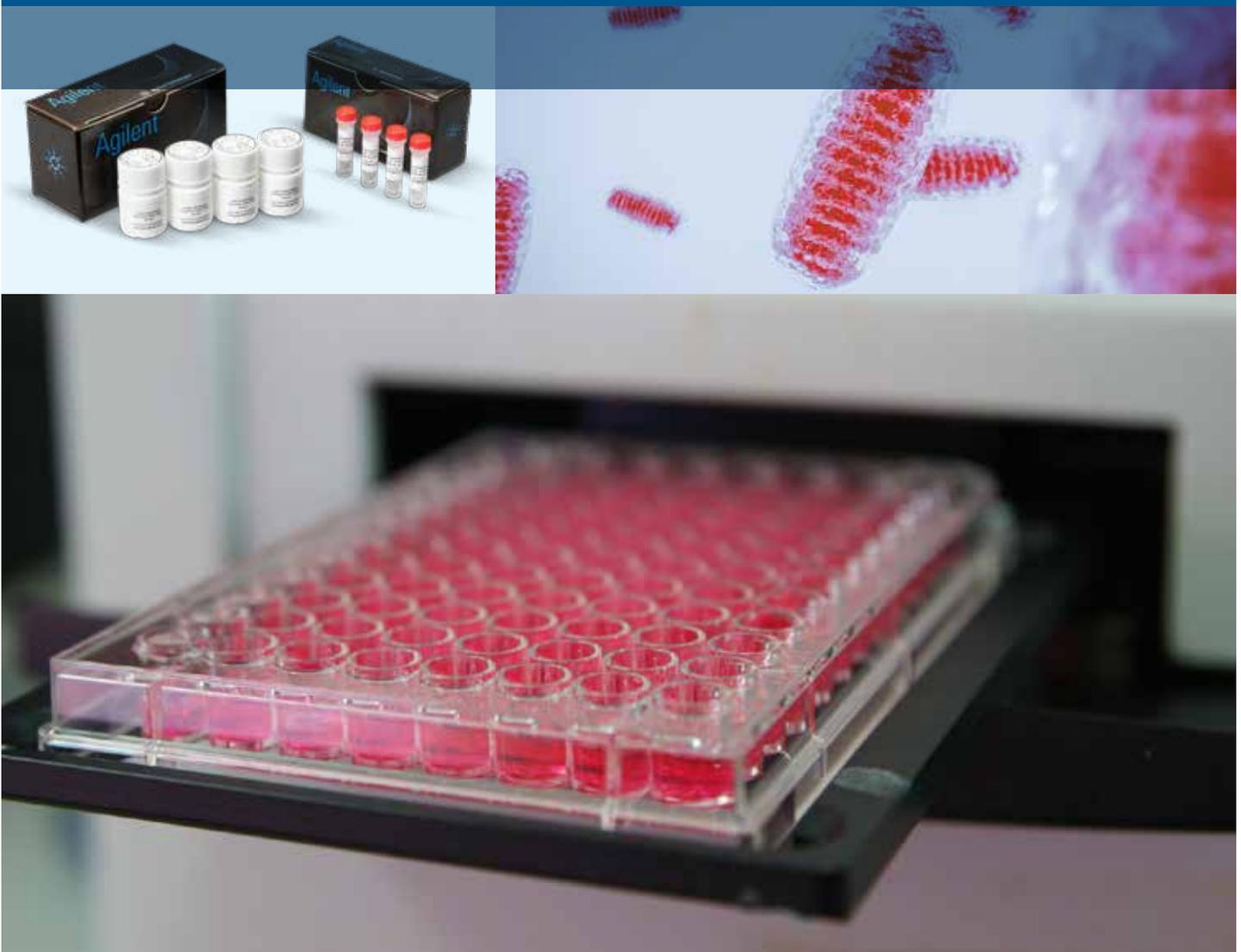


Решения Agilent для измерения метаболизма клетки с помощью сканера планшетов



Раскройте все возможности своего сканера планшетов



Узнайте, как тест на скорость потребления кислорода Agilent MitoXpress Xtra, тест на скорость гликолиза Agilent pH Xtra и тест на измерение внутриклеточного кислорода Agilent MitoXpress Intra могут помочь вам:

- измерить активность митохондрий и скорость гликолиза живых клеток;
- перейти от непрямых клеточных анализов, измеряющих количество израсходованного реагента, к прямому, быстрому и информативному определению функции митохондрий, активности гликолиза и клеточной оксигенации;
- совместить измерение с другими подходящими анализами;
- исследовать не только монослои, но и свободные клетки, бактериальные и специфичные трехмерные культуры;
- повысить производительность лаборатории с помощью быстрого и простого анализа метаболизма в стандартных микропланшетах;
- удобно и быстро исследовать изолированные митохондрии;
- проверить связь между доступностью кислорода и изменением клеточного метаболизма.

Тест MitoXpress Xtra на скорость потребления кислорода

Измерения потребления кислорода клеткой



Потребление кислорода — это одна из ключевых характеристик клеточного метаболизма и в особенности функции митохондрий. Исследование метаболизма живых клеток этими методами дает важную информацию о механизме клеточной функции и о роли нарушения метаболизма в развитии заболеваний.

Тест MitoXpress Xtra на скорость потребления кислорода — это ценный инструмент для изучения метаболизма. Он обеспечивает простое кинетическое измерение скорости аэробного метаболизма и может быть проведен на стандартном микропланшете с помощью флуоресцентного сканера планшетов. По мере того как в процессе дыхания в образце снижается содержание кислорода, сигнал MitoXpress Xtra увеличивается, что позволяет измерить скорость потребления кислорода.

Рис. 1 иллюстрирует исследование потребления кислорода полученными из ИПСК кардиомиоцитами человека (Cor.4U, NCardia) с помощью теста MitoXpress Xtra. Культура, обработанная разобщающим агентом FCCP (карбонилцианид-*p*-трифторметоксифенилгидразон), демонстрирует увеличение скорости нарастания сигнала из-за увеличения интенсивности дыхания. И наоборот, обработка антимицином А, который ингибирует митохондриальное дыхание, имеет противоположный эффект и скорость нарастания сигнала падает из-за сниженного потребления кислорода. Эти измерения можно проводить в самых разных средах, что облегчает планирование эксперимента.

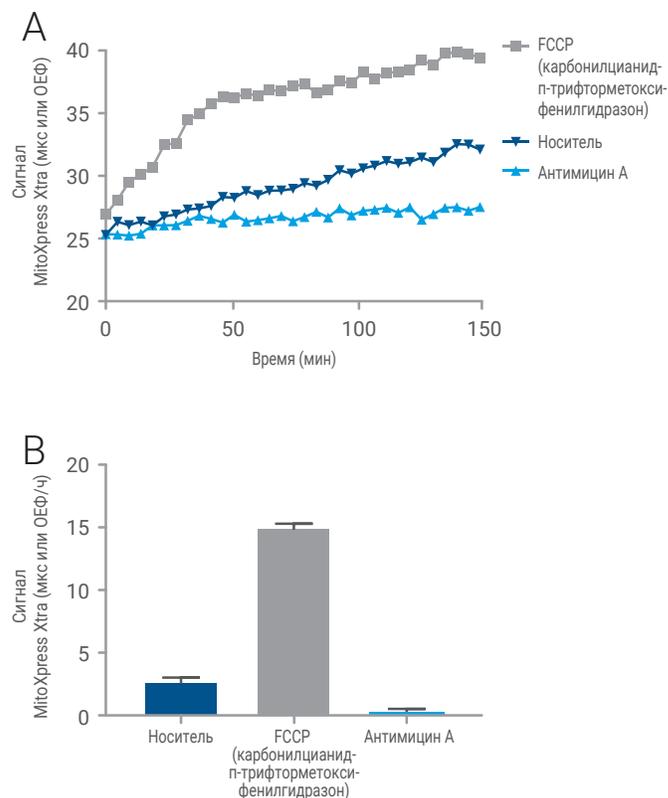


Рис. 1. (А) Исследование потребления кислорода культурой клеток Cor.4U (NCardia) с помощью теста Agilent MitoXpress Xtra. По мере дыхания клетки поглощают растворенный кислород, что приводит к увеличению сигнала MitoXpress Xtra. Обработка антимицином А (ингибитор митохондриального дыхания) снижает потребление кислорода, что, в свою очередь, снижает скорость нарастания интенсивности сигнала. Обработка FCCP (разобщающий агент) увеличивает потребление кислорода, что увеличивает скорость нарастания интенсивности сигнала. (В) Такое изменение скорости нарастания интенсивности сигнала MitoXpress Xtra позволяет оценить влияние этих соединений на метаболизм, при этом сниженная скорость нарастания сигнала указывает на сниженную активность аэробного метаболизма.

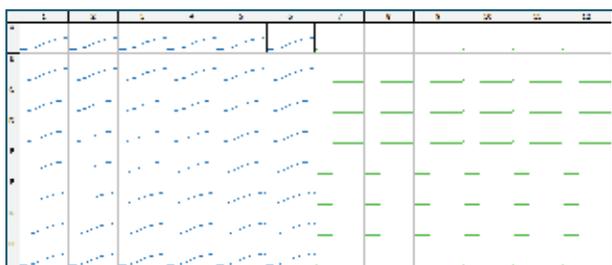
Решения MitoXpress Xtra для токсикологии

Скрининг на медикаментозную токсичность

Медикаментозная дисфункция митохондрий связана с несколькими классами лекарственных препаратов и вносит заметный вклад в их токсический эффект для печени, сердца, почек, мышц и центральной нервной системы.

Тест MitoXpress Xtra, благодаря своей производительности и тому, что он выполняется непосредственно на микропланшетах, позволяет легко проводить ранний скрининг на чувствительность митохондрий к лекарственным препаратам и строить кривые влияния дозировки (рис. 2). Эти исследования могут проводиться на ряде подходящих модельных клеточных культур *in vitro*, включая первичные гепатоциты, а также полученные из ИПСК человека кардиомиоциты и гепатоциты.

А



В

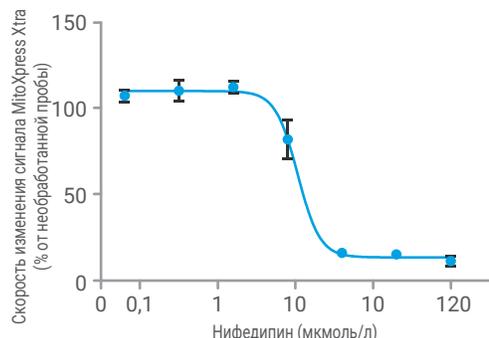
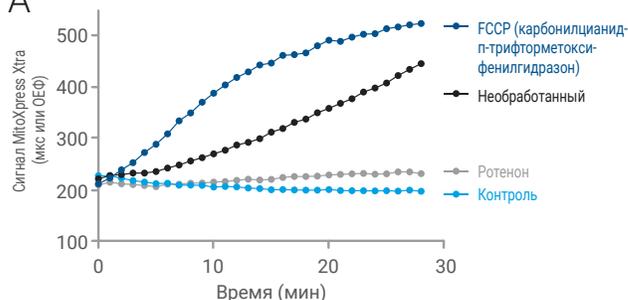


Рис. 2. (А) Измерение скорости потребления кислорода клетками, полученными из ИПСК человека (Clontech), с помощью теста Agilent MitoXpress Xtra, демонстрирующее Z'-оценку порядка 0,7. (В) Кривая влияния дозировки нифедипина (ингибитор кальциевых каналов) на митохондриальное дыхание кардиомиоцитов Cos.4U. Наклон всех кривых был нормализован относительно контрольного эксперимента с растворителем.

Измерение интенсивности дыхания изолированных митохондрий

Тест MitoXpress Xtra сделал измерение интенсивности дыхания изолированных митохондрий доступным как никогда. Тест позволяет быстро, удобно и напрямую изучать активность цепочки транспорта электронов (ЕТС) на микропланшетах с помощью обычного флуоресцентного сканера планшетов (рис. 3А). Это упрощает скрининг и исследование влияния дозировки соединений (рис. 3В). Кроме того, специальные сочетания субстрата и ингибитора позволяют подробно изучать механизм работы отдельных комплексов ЕТС и связанных с ними митохондриальных белков. По сравнению с традиционной полярографией тест MitoXpress Xtra требует для анализа сравнительно немного образца, что позволяет сделать больше параллельных экспериментов для каждой партии изолята. Это позволяет получить из каждой партии готовых митохондрий значительно больше данных, особенно если использовать для анализа 384-луночные планшеты.

А



В

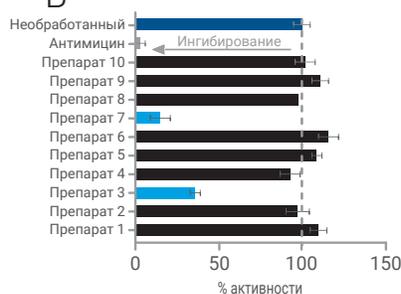


Рис. 3. Анализ дыхания изолированных митохондрий (крысиная печень) с помощью теста Agilent MitoXpress Xtra (А), демонстрирующего ингибирование и разобщение после обработки классическими модуляторами функции митохондрий. (В) Скрининг ряда неизвестных лекарственных препаратов с помощью митохондриальных клеток крысиной печени для поиска соединений, вызывающих дисфункцию митохондрий (препараты 3 и 7).

Решения MitoXpress Xtra для совместного анализа

Совместное определение множества параметров функции митохондрий

Еще больше данных о клеточной реакции можно получить, совместив анализы MitoXpress Xtra или pH Xtra с другими параметрами, которые можно измерить с помощью сканера планшетов, такими как мембранный потенциал митохондрий (MMP), содержание активных форм кислорода (ROS) или содержание АТФ в клетке. Это дает возможность лучше охарактеризовать влияние обработки или изменения условий на клеточную функцию. Это также позволяет наблюдать за нарушением метаболизма в контексте без необходимости проводить параллельные эксперименты или использовать другую технологическую платформу.

Одним из примеров совместного анализа является одновременное определение жизнеспособности клеток (с помощью кальцеина АМ) и интенсивности митохондриального дыхания (с помощью теста MitoXpress Xtra) для того, чтобы лучше понять побочные эффекты лекарственного препарата на клеточную функцию (рис. 4).

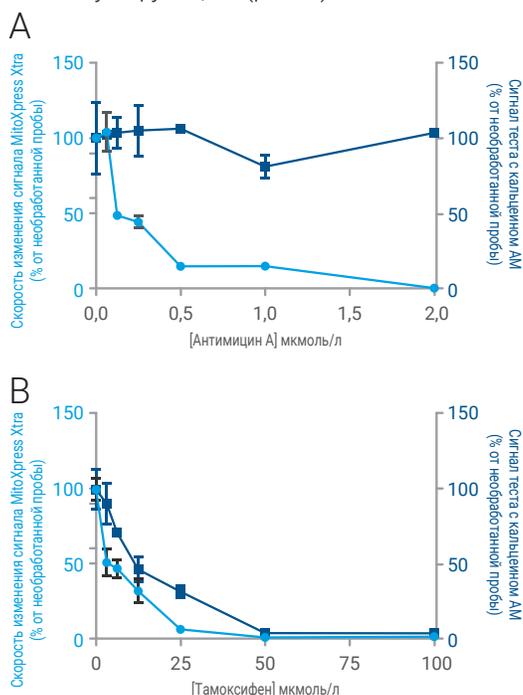


Рис. 4. Совместное исследование в течение 24 часов с помощью теста Agilent MitoXpress Xtra и кальцеина АМ клеточной культуры линии HepG2, обработанной (А) антимицином А и (В) тамоксифеном. Оба препарата ингибируют митохондриальное дыхание (голубые кривые). Тамоксифен показал значительное влияние на жизнеспособность клеток, в то время как антимицин А такого эффекта не продемонстрировал (синие кривые). Это позволяет предположить, что антимицин А влияет на дыхание по более прямому митохондриальному механизму.

Индикаторы митохондриальной функции, такие как MMP и накопление ROS, можно изучать параллельно с измерением потребления кислорода. Эти параметры особенно важны в исследовании роли митохондрий в физиологии клетки.

На рис. 5 показано совместное измерение MitoXpress Xtra и MMP (JC-1) в клеточной культуре линии HepG2, обработанной модуляторами метаболизма, FCCP и антимицином А. Оба соединения снижают мембранный потенциал, однако по-разному влияют на скорость потребления кислорода, что демонстрирует, как совместное измерение некоторых параметров может дополнить исследование ценными данными.

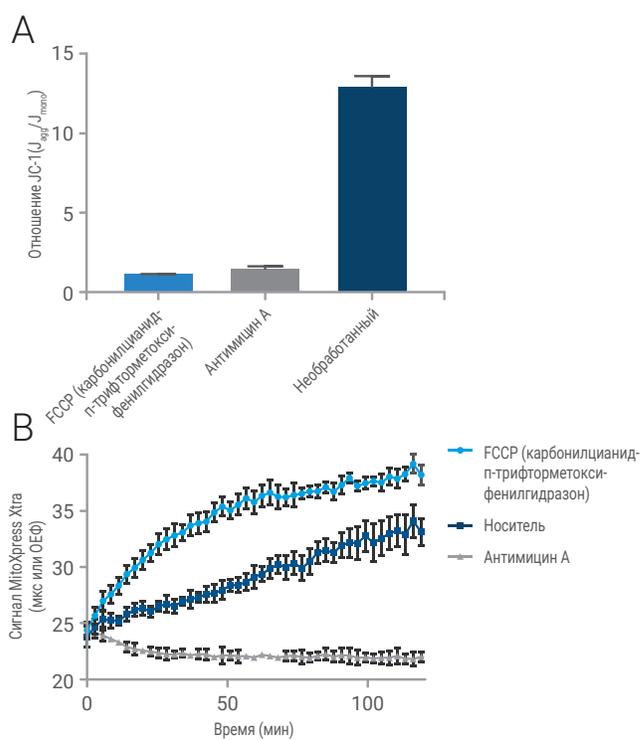


Рис. 5. Измерение с помощью теста Agilent MitoXpress Xtra и JC-1 в одной лунке. Клеточная культура HepG2 обрабатывалась антимицином А или FCCP. Оба соединения приводили к снижению мембранного потенциала MMP (А), при этом FCCP вызывал характерное увеличение потребления кислорода, в то время как антимицин А ингибировал клеточное дыхание (В).

Решения MitoXpress Xtra для исследования бактериального метаболизма

Измерение скорости роста и метаболической активности микроорганизмов, а также их отклика на антибиотики

Тест MitoXpress Xtra позволяет быстро, с хорошей чувствительностью и с помощью обычного сканера планшетов измерить скорость роста прокариотических клеток или провести скрининг на антибактериальную активность без того, чтобы выполнять множественные разведения проб или продолжительные исследования роста колоний на агаре. Этот же тест позволяет исследовать бактериальный метаболизм.

Формат сканера планшетов обеспечивает необходимые для скрининга и удобного сбора данных IC_{50} или MIC производительность и разрешение. На рис. 6 показано применение этого метода для оценки скорости размножения микроорганизмов и получения данных о влиянии дозировки и о специфическом влиянии на метаболизм двух соединений, полученных из дрожжей.

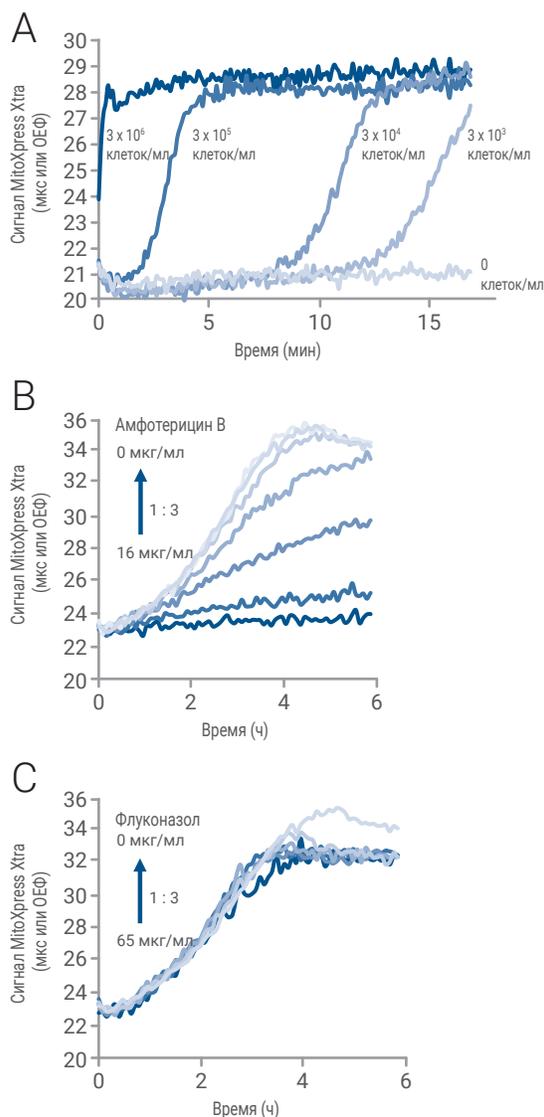


Рис. 6. Профили поглощения кислорода культурой *C. albicans*, полученные для посевов с уменьшающимися концентрациями. (А) Культура *C. albicans* была обработана растворами с увеличивающейся концентрацией (В) амфотерицина В и флуконазола. (С) Амфотерицин В привел к зависящему от дозы снижению потребления кислорода, в то время как флуконазол снижения потребления кислорода не вызвал. Это наблюдение соответствует механизму действия препарата.

Тест на скорость гликолиза pH Xtra

Измерение гликолитической активности



Измерение закисления внеклеточной среды — это высокоинформативный метод исследования гликолитической активности, который легко выполняется на сканере планшетов с поддержкой флуоресцентного анализа с временным разрешением (TRF) с помощью теста на скорость гликолиза pH Xtra. Закисление внеклеточной среды в основном вызывается превращением пирувата в лактат, что приводит к снижению значения pH тестового буферного раствора. Это снижение значения pH приводит к увеличению сигнала чувствительного датчика теста pH Xtra.

Такое измерение значения pH дает важную информацию о центральной роли, которую играет изменение гликолитической активности в самых разных физиологических и патофизиологических процессах, включая злокачественные опухоли и адаптацию тканей к гипоксии.

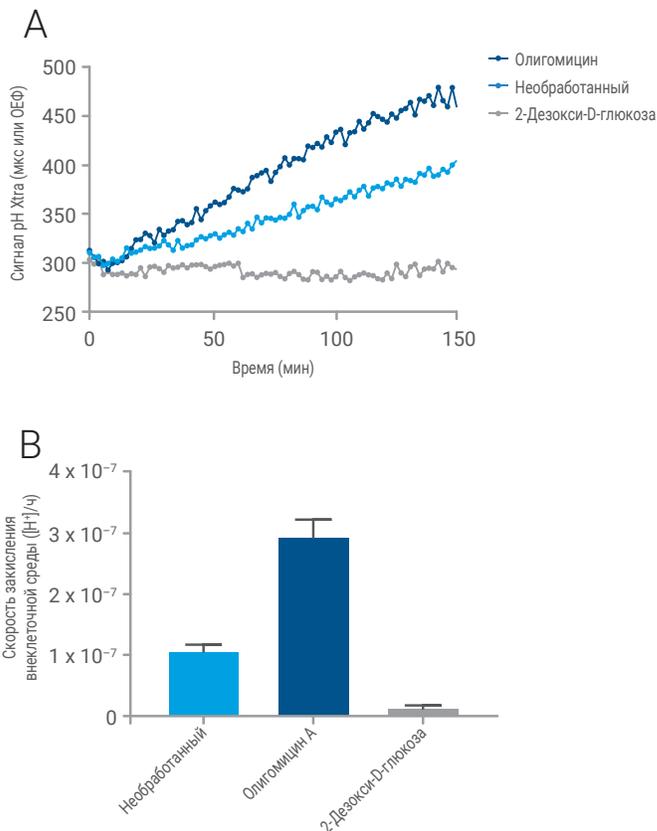


Рис. 7. (А) Исследование гликолитической активности клеточной культуры линии A549 с помощью теста на скорость гликолиза Agilent pH Xtra. Обработка ингибитором гексакиназы (2-дезоксид-глюкоза, 2-DG) ингибирует закисление внеклеточной среды, что обнаруживается как снижение скорости изменения сигнала датчика. Обработка олигомицином А, ингибитором образования митохондриального АТФ, приводит к увеличению скорости образования гликолитического АТФ для поддержания энергетического гомеостаза клетки. (Б) Изменение кислотности внеклеточной среды можно выразить в виде графика изменения либо значения pH, либо концентрации ионов водорода [H⁺] по времени.

Решения MitoXpress Xtra и pH Xtra

Измерение метаболической активности в трехмерной культуре

Сканер планшетов также позволяет измерять интенсивность клеточного метаболизма в культурах свободных клеток и в специальных трехмерных культурах (например, RAFT, Mimetix или Alvetex). Культивирование клеточной культуры в трех измерениях позволяет формировать сложные межклеточные взаимодействия, что приближает систему *in vitro* к системе *in vivo*. На рис. 8 приведен пример использования тестов MitoXpress Xtra и pH Xtra для измерения метаболической активности в трехмерных матрицах (RAFT, Lonza) без нарушения их пространственной структуры.

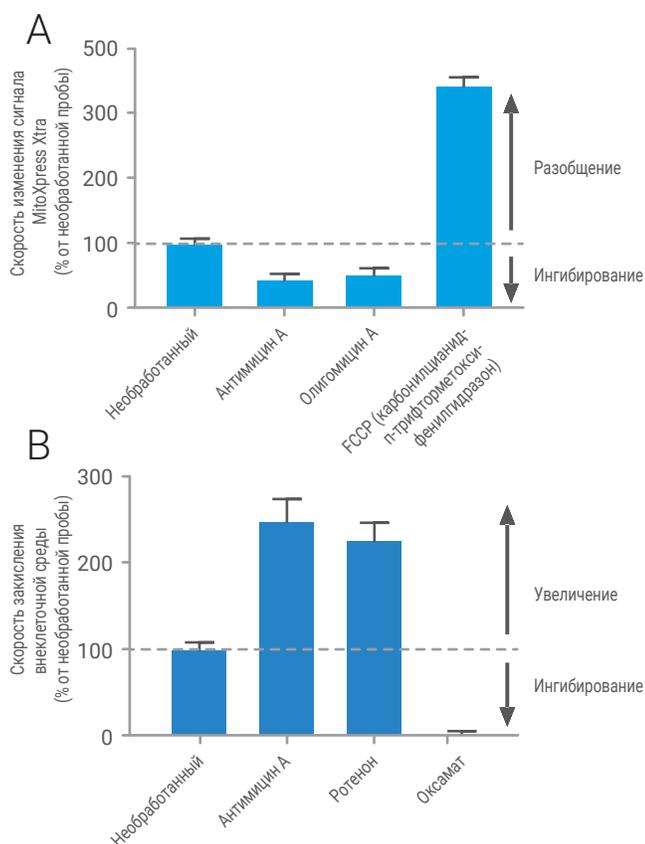


Рис. 8. (А) Относительный эффект обработки различными препаратами на потребление кислорода трехмерной культурой А549 3D RAFT, измеренный с помощью теста Agilent MitoXpress Xtra. (Б) Относительный эффект обработки различными препаратами на скорость закисления внеклеточной среды трехмерной культуры НерG2 RAFT, измеренный с помощью теста на скорость гликолиза Agilent pH Xtra.

Совместное измерение скорости гликолиза и потребления кислорода

Совместное использование тестов MitoXpress Xtra и pH Xtra позволяет оценить метаболическое равновесие клеточной культуры в качестве базовой линии для последующих исследований метаболизма. На рис. 9 показано, как эти тесты совместно используются для изучения баланса между потреблением кислорода и скоростью гликолиза в различных типах клеток. Также на этом рисунке можно увидеть, как на этот метаболический баланс влияет доступность субстрата.

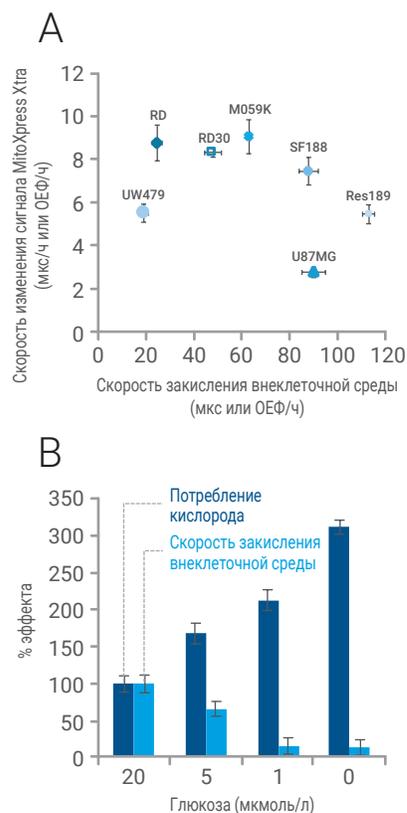


Рис. 9. (А) Совместное измерение скорости гликолиза и интенсивности митохондриального дыхания в линиях злокачественных клеток с помощью тестов Agilent MitoXpress Xtra и Agilent pH Xtra. (Б) Влияние доступности глюкозы на метаболизм клеточной культуры линии U87MG. Увеличение доступности глюкозы ведет к снижению интенсивности дыхания и увеличению скорости гликолиза (данные приведены с разрешения д-ра Карла Мортена (Karl Morten), Оксфордский университет, Великобритания).

Тест MitoXpress Intra на измерение внутриклеточного кислорода

Внутриклеточная оксигенация и гипоксия



Доступность кислорода на клеточном уровне значительно влияет на физиологию клетки, передачу сигналов и метаболизм. Поэтому в исследованиях *in vitro*, в особенности при исследовании метаболизма злокачественных клеток, поиске новых лекарственных препаратов и исследованиях нервной и сердечно-сосудистой систем применяется пониженная концентрация кислорода, в большей степени соответствующая физиологической. Ключевым элементом таких моделей *in vitro* является возможность отслеживать клеточную оксигенацию, так как неустойчивость этого параметра может исказить интерпретацию данных. Поэтому так важно знать глубину и продолжительность воздействия кислорода на модельную клеточную культуру.

Тест MitoXpress Intra позволяет измерять внутриклеточные концентрации кислорода живой клеточной культуры. Реактив захватывается клеткой, и его концентрация может измеряться с помощью флуоресцентного сканера планшетов, который способен выполнять двухлучевой флуоресцентный анализ с временным разрешением (TRF). Датчик в реальном времени реагирует на все изменения внутриклеточной концентрации кислорода, которые вызваны изменением состава атмосферы или клеточным дыханием.

Этот тест (кроме того, что это информативный инструмент для мониторинга состояния клетки) позволяет связать изменение метаболической активности с доступным уровнем кислорода. Эти параметры особенно важны в таких областях, как исследование ишемической болезни сердца, метаболизма злокачественных клеток и гипоксии. На рис. 10 показано, как можно использовать тест MitoXpress Intra для того, чтобы обнаружить значительное различие между парциальным давлением кислорода внутри и вне клетки. Величина этого различия зависит от числа клеток, их скорости размножения, типа и метаболического равновесия, поэтому из парциального давления кислорода во внеклеточной среде нельзя установить уровень гипоксии, испытываемый клеткой.



Рис. 10. Снижение концентрации кислорода в образцах клеточной культуры линии HepG2, выращенной как трехмерная культура (RAFT, Lonza), в ответ на снижение парциального давления кислорода в атмосфере. При атмосферном парциальном давлении кислорода оксигенация клеток равна ~ 10%, в то время как при снижении парциального давления кислорода в атмосфере до 5% уровень оксигенации приближается к 0%.

Снижение оксигенации может иметь серьезные физиологические последствия и, если ее не измерять, может привести к неправильной интерпретации данных из-за того, что уровень оксигенации модельной клеточной культуры в ходе эксперимента неизвестен. На рис. 11 приведен пример, в котором стабилизация концентрации фактора, индуцируемого гипоксией (HIF) на уровне 40%, наблюдается при клеточном уровне кислорода ~ 1,5%. Однако при отсутствии возможности измерить оксигенацию можно было бы предположить, что этот уровень стабилизации достигается при уровне кислорода ~ 5%.

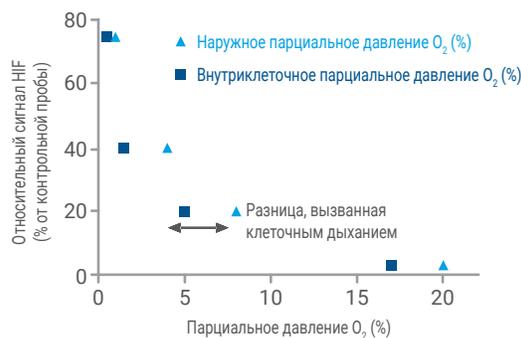


Рис. 11. Измерение равновесной концентрации фактора, индуцируемого гипоксией (HIF) с помощью люминесцентного репортера HIF в клеточной культуре HT-1080, при снижении концентрации кислорода. Стабилизация концентрации HIF связана как с внеклеточным парциальным давлением кислорода (голубые точки), так и с реальным уровнем оксигенации клетки, который измеряется тестом Agilent MitoXpress Intra (синие точки). Эти данные показывают, что без данных о внутриклеточной оксигенации можно сделать ошибочные выводы о связи между доступностью кислорода и равновесной концентрацией HIF. (Данные приведены с разрешения д-ра Карла Мортена (Karl Morten), Оксфордский университет, Великобритания.)

Решения MitoXpress Intra

Изучения метаболизма злокачественных клеток в условиях гипоксии

Мониторинг внутриклеточной оксигенации в реальном времени с помощью теста MitoXpress Intra позволяет точно определить глубину гипоксии, которую испытывает модельная клеточная культура. Как и тест MitoXpress Xtra, тест MitoXpress Intra может быть совмещен с другими анализами, проводимыми с помощью сканера планшетов, включая измерение жизнеспособности, мембранного потенциала и активных форм кислорода. Это особенно важно в исследовании метаболизма злокачественных клеток, в котором особую важность приобретает связь между гипоксической средой опухоли, гибкостью метаболизма и фенотипом злокачественной опухоли.

На рис. 12 приведен пример такого исследования, в котором одновременно измерялись внутриклеточная оксигенация и гликолитическая активность с помощью теста MitoXpress Intra и теста на скорость гликолиза pH Xtra. Измерения выполнялись как в условиях гипоксии, так и при атмосферном парциальном давлении кислорода, а их данные демонстрируют влияние оксигенации на гликолитическую активность.

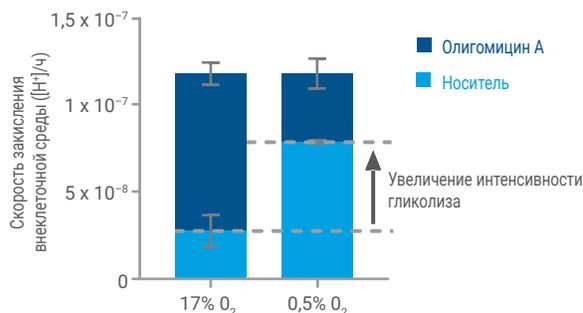
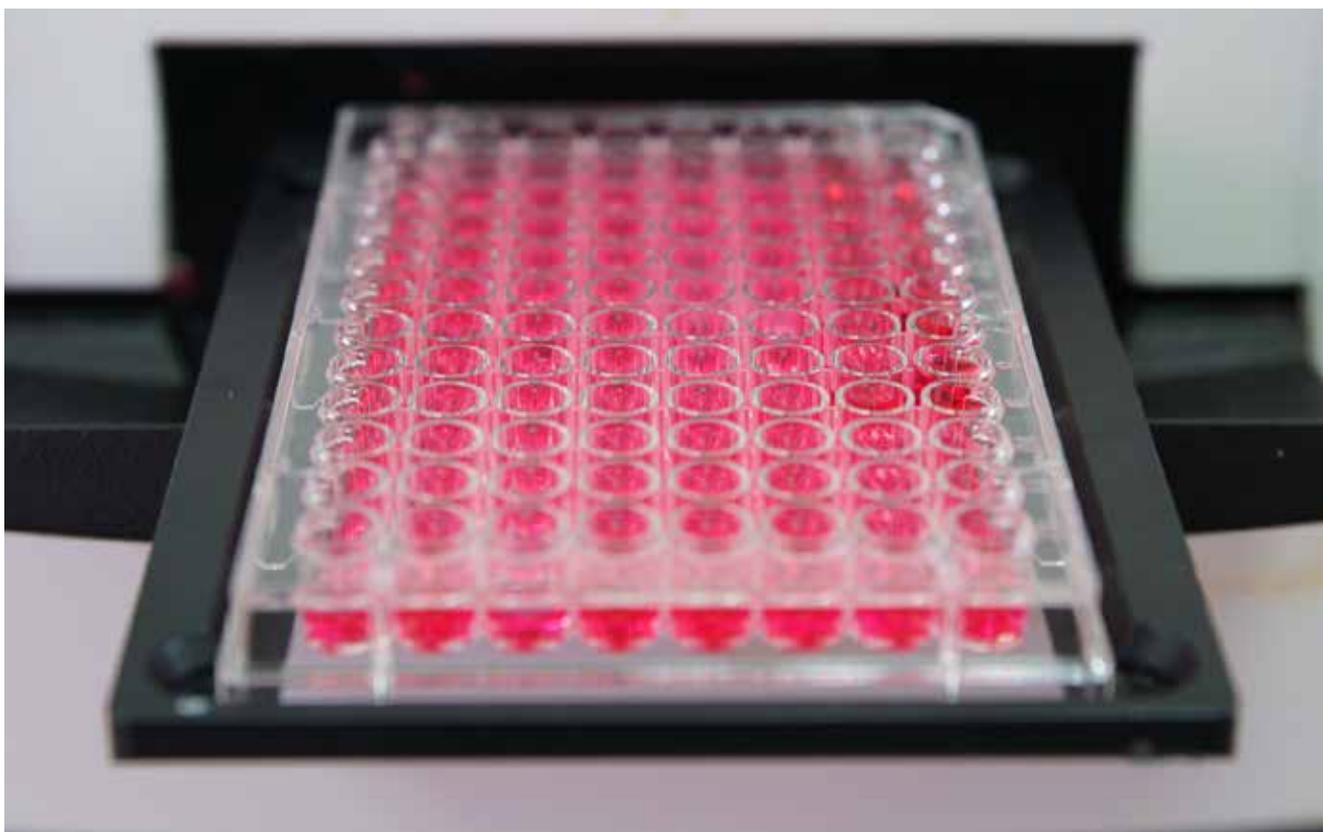


Рис. 12. Закисление внеклеточной среды клеточной культуры линии A549, измеренное с помощью теста на скорость гликолиза Agilent pH Xtra одновременно с измерением внутриклеточного уровня кислорода с помощью теста Agilent MitoXpress Intra в условиях гипоксии, вызванной блоком управления составом атмосферы сканера планшетов. Базальная скорость закисления внеклеточной среды культуры, обработанной растворителем, увеличилась примерно в три раза в условиях гипоксии (голубая часть), в то время как гликолитическая емкость, измеренная с помощью обработки олигомицином (синяя часть) в качестве ингибитора образования митохондриального АТФ, осталась неизменной.

Преимущества продукции компании Agilent

Метаболизм лежит в основе всех реакций клетки, поэтому он является основой всех функциональных исследований в клеточной биологии. Теперь компания Agilent предлагает ряд совместимых с флуоресцентными сканерами планшетов метаболитических датчиков — исчерпывающий набор решений для исследования клеточного метаболизма *in vitro*. В этой статье приведен ряд примеров того, как эти тесты могут применяться для исследования метаболизма и функции клетки. Дополнительные материалы, подробные методики и ответы на вопросы о том, как наши растворимые метаболитические датчики могут помочь вам в ваших исследованиях, можно найти по адресу www.agilent.com или непосредственно у компании Agilent по электронному адресу cellanalysis.support@agilent.com.



Линейка решений для цитологических исследований Agilent

Наши лидирующие на рынке технологии исследования живых клеток в реальном времени уже помогли исследователям раздвинуть границы многих областей исследования.

Больше о нашей полной линейке решений можно узнать на нашем веб-сайте по адресу www.agilent.com/chem/discoverxf.

Узнать подробнее:

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables

База данных публикаций:

www.agilent.com/publications-database/

Эталонная база данных клеточных культур:

www.agilent.com/cell-reference-database/

Вебинары:

www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series

Международная техническая поддержка:

cellanalysis.support@agilent.com

США и Канада:

1-800-227-9770 (нажмите 3, затем 8)

Европа

Великобритания: 0500 096 7632

Германия: 0800 180 66 78

Другие страны ЕС: +45 3236 9878

Только для исследовательских целей. Не для использования в диагностических процедурах.

Информация в этом документе может быть изменена без уведомления.