

Николаевич Л.Н., кандидат биологических наук, доцент¹
 Згировская А.А., кандидат биологических наук¹
 Церковский Д.А., кандидат медицинских наук, доцент²
 Якубовский С.М., научный сотрудник¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

²РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Республика Беларусь

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ МТТ-АНАЛИЗА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Резюме

МТТ-анализ клеточной метаболической активности широко используется в исследованиях цитотоксичности *in vitro*. В этой статье мы представляем собственные данные вместе с критической оценкой научной литературы для обоснованности и обсуждения применимости и потенциальных ограничений анализа МТТ.

Ключевые слова: МТТ-анализ, клеточный метаболизм, жизнеспособность клеток, цитотоксичность, клеточная линия карциномы гортани человека Hep2, клеточная линия почки африканской зеленой мартышки Vero, оптическая плотность (ОП).

Summary

The MTT assay for cellular metabolic activity is widely used *in vitro*. This paper presents our own data and critical assessment of the literature data is carried out. The applicability and potential limitations of the MTT assay are discussed.

Keywords: MTT assay, cellular metabolism, cell viability, cytotoxicity, human laryngeal carcinoma cell line Hep2, African green monkey kidney cell line Vero, optical density (OD).

Поступила в редакцию 12.12.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время как альтернативная замена использования моделей на животных широко применяются методы *in vitro* [1]. Методы определения жизнеспособности клеток могут быть классифицированы по различным категориям, а именно методы исключения красителей (краситель трипановый синий) (I); методы, основанные на метаболической активности (II); анализ количества АТФ (III); анализы с использованием сульфородамина В (IV); анализ жизнеспособности по маркерам протеазы (V); клоногенный анализ (VI); анализы пролиферации клеток по синтезу ДНК (VII) и микроспектроскопия комбинационного рассеяния (VIII) [2]. Наиболее распространенным в лабораторной практике методом

определения жизнеспособности клеток, включенном в большинство протоколов молекулярной биологии и медицины, является МТТ-анализ [3, 4], который относится ко II группе методов в приведенной выше классификации.

Реагент МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид) представляет собой соль монотетразолия, состоящую из положительно заряженного ядра четвертичного тетразольного кольца, содержащего четыре атома азота, окруженного тремя ароматическими кольцами, включая два фенильных фрагмента и одно тиазолильное кольцо. Восстановление МТТ приводит к разрушению основного тетразольного кольца и образованию фиолетово-синей водонерастворимой молеку-

лы, называемой формазаном [5]. Реагент МТТ может проходить через клеточную мембрану, а также внутреннюю мембрану митохондрий жизнеспособных клеток предположительно благодаря своему положительному заряду [5], а также липофильной структуре [6] и восстанавливается до формазана [5]. Хромогенная природа этой окислительно-восстановительной химической реакции обеспечивает колориметрическое измерение внутриклеточного образования формазана, на основе которого Т. Mosmann разработал анализ МТТ в 1983 г. [7], который имеет широкое применение в качестве анализа метаболической активности клеток. Анализ МТТ обычно проводят после нескольких часов инкубации клеток с МТТ. Полученный водонерастворимый формазан затем растворяют в растворителе, таком как диметилсульфоксид (ДМСО). Впоследствии снижение светопропускания за счет поглощения и других механизмов гомогенизированного раствора МТТ-формазана измеряется с помощью устройства для считывания микропланшетов с точки зрения его оптической плотности (ОП) на длине волны, которую формазан, полученный из МТТ, поглощает больше всего в диапазоне 490–570 нм. Значения ОП отражают концентрацию формазана и, следовательно, внутриклеточное снижение МТТ. Внутриклеточное снижение МТТ может быть опосредовано ферментами оксидоредуктазой и дегидрогеназой, а также донорами электронов (в основном НАД(Ф)Н) на разных стадиях гликолитического пути к митохондриальной цепи переноса электронов [5]. Пока место образования формазана и его внутриклеточный транспорт остаются спорными.

На общедоступном ресурсе Pub Med часто встречаются статьи, в которых описано, что местами восстановления и образования осадка формазана являются митохондрии, а митохондриальная сукцинатдегидрогеназа жизнеспособных клеток восстанавливает МТТ до формазана [8] и может локализоваться в липидных каплях клеток [9]. В литературе обоснована роль митохондрий в снижении МТТ [10]. Внутриклеточные гранулы формазана также определялись в различных органеллах, а именно в эндоплазматическом ретикулуме, плазматических мембранах [5], ядре и лизосо-

мах [8]. Эти наблюдения позволяют предположить, что анализ МТТ – это больше чем просто представление митохондриальной активности [8]. Некоторые исследователи выявили факторы, ограничивающие применение метода МТТ [6–8], которые необходимо учитывать при разработке, проведении, анализе и интерпретации результатов данного анализа. Обычно упускаемые из виду мешающие переменные включают количество посеянных клеток, концентрацию реагента МТТ, добавленного к клеткам, время инкубации клеток с МТТ, тип культуральной среды, удаление супернатанта клеток после инкубации МТТ, длину волны, при которой измеряется оптическая плотность. В этих параметрах также существуют несоответствия, которые затрудняют сравнение измеренных значений ОП в разных исследованиях. Восстановление красителя зависит прежде всего от клеточного метаболизма; иногда это отражает жизнеспособность клеток, но смешивание переменных приводит к неточности анализа.

Механизм, лежащий в основе анализа, также до конца не изучен. До сих пор существуют разногласия и неопределенности по некоторым аспектам: например, какие дополнительные органеллы, ферменты и молекулы участвуют в восстановлении МТТ, происхождение внеклеточных кристаллов формазана, цитотоксический эффект самого реагента МТТ и то, как результаты анализа отражают жизнеспособность клеток, метаболическую активность и/или токсичность тестируемых веществ [7].

Общеизвестно, что МТТ-анализ включает превращение водорастворимого желтого красителя [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид], который при восстановлении дегидрогеназой и восстановителями, присутствующими в метаболически активных клетках, дает нерастворимый в воде пурпурный формазан [7]. Химическая структура МТТ и формазана показаны на рисунке 1.

Восстановление МТТ приводит к разрушению основного тетразольного кольца и образованию формазана. Липидорастворимый продукт формазан может быть экстрагирован органическими растворителями и оценен с помощью спектрофотометрии.

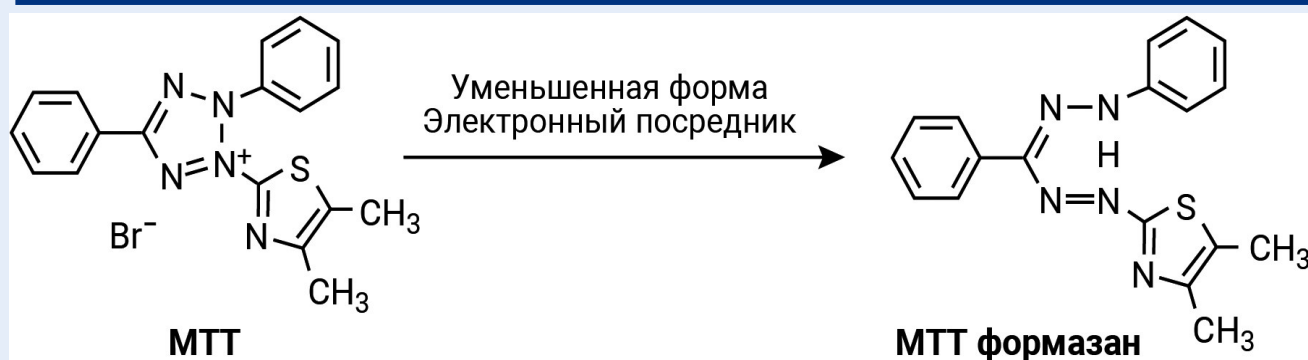


Рисунок 1. – Восстановление МТТ в формазан

Метод с самого начала подразумевался в качестве анализа жизнеспособности культивируемых клеток [8]. К факторам, влияющим на окончательные измерения оптической плотности (ОП) в анализе МТТ, относятся концентрация реагента МТТ и его доля, которая фактически попадает в клетку, клеточная метаболическая активность (которая сильно зависит от множества переменных, включая обработку клеток, биологическое действие культуральной среды, плотность клеток и сопротивление клеточного метаболизма из-за токсические эффекты МТТ), количество клеток, время экстракции кристаллов формазана (что может препятствовать дальнейшему усвоению МТТ), химическое вмешательство, такое как абиотическое снижение МТТ культуральной средой, тестируемое вещество или высвобождение клеточного содержимого, оптическое вмешательство со стороны всех фоновые компоненты, время инкубации клеток с реагентом МТТ и/или тестируемой обработкой и, в конечном счете, оптические измерения.

Цель исследования – разработать протокол МТТ-анализа для оценки жизнеспособности опухолевых клеток карциномы гортани человека Hep2 и нормальных клеток почки африканской зеленой мартышки Vero, основанный на их метаболической активности с учетом основных параметров (количество посеянных клеток, плотность посева, инкубационный период, состав среды, условия культивирования, количество реагента МТТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены в лаборатории биотехнологии отдела вирусных ин-

фекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского» на клетках линии Hep2 (аденокарцинома гортани человека) и Vero (почка африканской зеленой мартышки), которые приобретены из коллекции клеточных культур человека и животных РНИЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ.

В работе использовали следующие реактивы: бессывороточная среда RPMI 1640 (Gibco), эмбриональная телячья сыворотка (FBS) (Gibco), 0,25%-ный раствор трипсина-ЭДТА (Gibco), диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma-Aldrich), МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (Sigma-Aldrich), 0,4%-ный раствор трипанового синего (Sigma-Aldrich) и оборудование: спектрофотометр STAT 21 при длине волны 492/630 нм, ламинарный бокс II класса биобезопасности (LAMSYSTEMS), CO₂-инкубатор (Galaxy 170R New Brunswick an Eppendorf company), микроскоп инвертированный (Primo Vert Plus, Carl Zeiss).

На первом этапе проводили исследования по определению логарифмической фазы роста клеток в полной ростовой среде RPMI 1640 (Biosera, Франция) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Caricogn, Польша) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ для уточнения времени удвоения используемых в работе клеточных линий с целью выбора времени адаптации, необходимого для адгезии, и последующей инкубации веществ без посева. Для процедуры снятия клеточного монослоя применялся метод трипсинизации с последующей оценкой жизнеспособности клеток методом исключения раствора трипанового синего. Для подсчета коли-

чества клеток в суспензии готовили смесь из 10 мкл полученных при снятии монослоя клеток и 10 мкл раствора трипанового синего. В течение нескольких минут смесь вводили в камеру Горяева и подсчитывали количество неокрашенных (живые клетки) и окрашенных в синий цвет (мертвые клетки). Оценивали долю жизнеспособных клеток и концентрацию клеток в суспензии. Исходная концентрация клеток составила 240000 кл/мл.

На втором этапе работы подбирали оптимальное количество клеток на лунку в полной ростовой среде для адгезии клеток ко дну планшета. В лунки вносили по 100 мкл суспензии клеток Her2 и Vero. В вертикальные и горизонтальные дорожки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл полной культуральной среды. В качестве нулевого контроля использовали полную питательную среду для каждой посевной концентрации. Планшет помещали в CO₂ инкубатор и клетки культивировали 24, 48, 72 и 96 ч без смены среды. Конфлюэнтность монослоя клеточных популяций Her2 и Vero контролировали при помощи световой микроскопии.

По истечении времени инкубации клеток в каждую лунку планшета вносили стерильный раствор МТТ-реагента, приготовленный из расчета 5 мг/мл, с последующей инкубацией в течение 4 ч при температуре 37 °С в инкубаторе CO₂. В итоге содержание МТТ реагента (мкг) в лунках составило 50; 25; 12,5; 6,25; 1,56 мкг/лунку.

Затем аккуратно удаляли надосадочную жидкость из лунок и образовавшиеся внутриклеточные фиолетовые кристаллы формазана салюбилизировали добавлением раствора ДМСО в объеме 150 мкл на лунку в течение 30 мин при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе. Для полноты растворения энергично пипетировали. Затем измеряли поглощение света с длиной волны 492/630 нм в каждой лунке в блоке ОП (оптическая плотность) на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) с предварительным встряхиванием.

Статистическую обработку данных проводили с использованием линейного регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведены исследования по определению оптимальной плотности клеток, времени культивирования, концентрации МТТ-реагента и времени инкубации МТТ в массовом анализе МТТ на клеточных линиях аденокарциномы гортани (Her2) и почки африканской зеленой мартышки (Vero). В ходе изучения времени удвоения клеточной культуры аденокарциномы гортани и почки африканской зеленой мартышки было показано, что через 5 ч после культивирования клеток наблюдалась частичная адгезия клеток ко дну культурального флакона. Через 24 ч инкубации наблюдалось удвоение клеток, в связи с чем данное время было выбрано для дальнейших исследований как необходимое для адаптации – первичной адгезии и нормализации жизнедеятельности и роста. При этом было показано, что максимум абсорбции при конверсии МТТ-реагента в формазан клетками линии Her2 и Vero при использовании в качестве солиubilизатора раствора ДМСО приходится на 492 нм. Данная длина волны была выбрана для регистрации оптической плотности в последующих исследованиях. В качестве референтской была выбрана длина волны 630 нм. Автоматическое отсечение данного показателя при расчетах позволяет не использовать отрицательный контроль (среда без клеток).

Для выбора оптимальной концентрации клеток для пассажа было посеяно различное количество клеток в каждую лунку 96-луночного планшета, время культивирования клеточных популяций Her2 и Vero составило 24, 48, 72, 96 ч перед добавлением МТТ.

Данные, представленные на рисунках 1 и 2, отражают динамику зависимости оптической плотности клеток линии Her2 и Vero 3-го пассажа от концентрации клеток в суспензии и времени инкубации. Показано, что линейный участок кривой зависимости оптической плотности при конверсии МТТ в формазан от количества жизнеспособных клеток в популяции Her2 начинается в среднем при 20 тыс. клеток в лунке (рисунок 2). Выявлено, что ОП зависит от количества/плотности посева клеток, концентрации МТТ и времени инкубации клеток. ОП меняется с увеличением количества/плотности посева клеток.

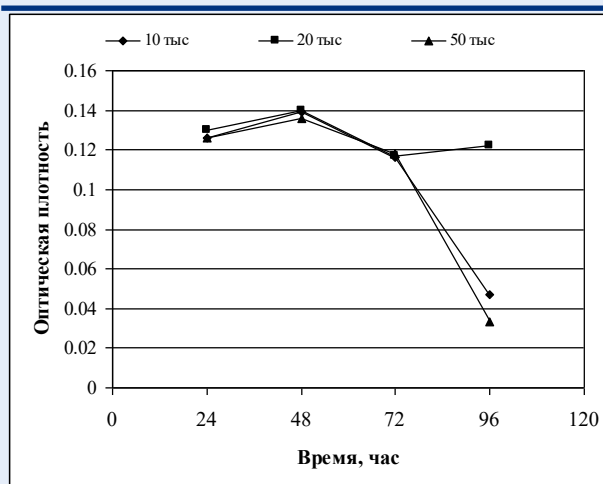


Рисунок 2. – Динамика зависимости оптической плотности клеток линии Hep2 3 пассажа от концентрации клеток в суспензии и времени инкубации

В то же время линейный участок кривой зависимости оптической плотности при конверсии МТТ в формазан от количества жизнеспособных клеток Vero начинается при 25 тыс. клеток в лунке при инкубации 48 ч (рисунок 3).

Следовательно, такие параметры, как концентрация клеток на лунку 96-луночного планшета для клеток Hep2 составляет 20 тыс., а клеток Vero – 25 тыс., и одинаковый период культивирования в течение 48 ч рекомендуются для проведения исследований на цитотоксичность тестируемых веществ *in vitro* анализом МТТ.

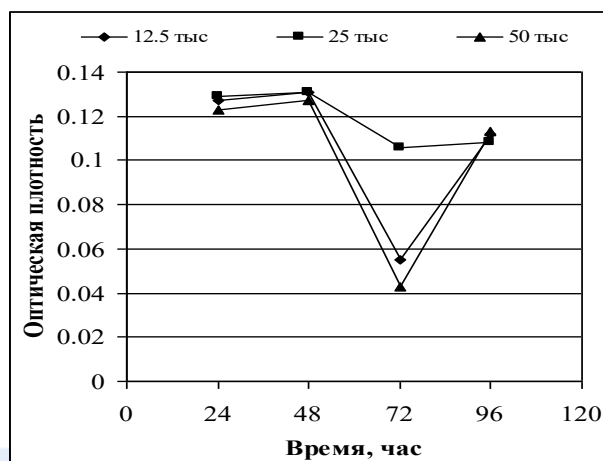


Рисунок 3. – Динамика зависимости оптической плотности клеток линии VERO 3 пассажа от концентрации клеток в суспензии и времени инкубации

Как показывают данные, полученные на клеточной линии Hep2 независимо от концентрации МТТ и времени инкубации МТТ, увеличение количества посева клеток увеличивает ОП. Это логически понятно, поскольку увеличение количества клеток увеличивает общий уровень продуцируемого формазана клеточной популяцией и, следовательно, измеряемую ОП, как показано в других исследованиях [17, 18]. Тот факт, что уровни ОП в отсутствие МТТ не менялись с увеличением количества клеток, показывает, что это не связано с оптическими эффектами увеличения количества клеток.

Результаты анализа МТТ на клетках и Vero с применением диапазона концентраций МТТ реагента (25 мкг, 12,5 мкг и 6,25 мкг на лунку) показали, что увеличение концентрации МТТ до 25 мкг на лунку вызывало увеличение уровня ОП независимо от количества клеток и момента времени измерения (рисунок 4).

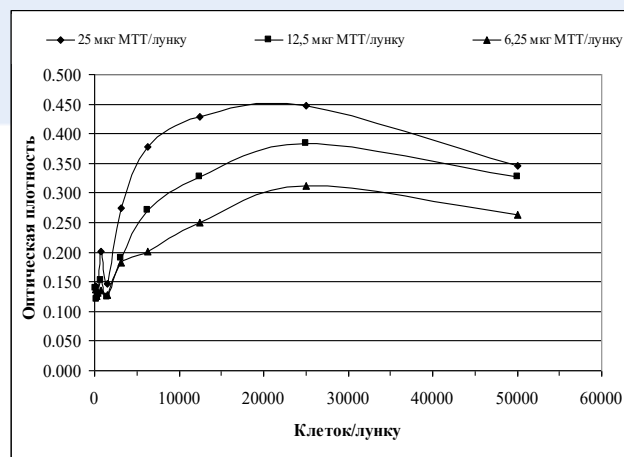


Рисунок 4. – Влияние количества клеток Vero в лунке на образование формазана, оцениваемое по результатам измерения оптической плотности, при различных концентрациях МТТ

Однако при большем количестве клеток и в более длительные моменты времени разница ОП между концентрациями МТТ более очевидна. Увеличение концентрации МТТ не приводило к дальнейшему увеличению уровней ОП независимо от количества клеток и момента времени измерения. Вероятным объяснением этих наблюдений является ускорение гибели клеток, вызванной МТТ, при более высо-

ких концентрациях МТТ реагента. Другими словами, выше определенного уровня концентрации МТТ ускоренная скорость гибели клеток находится на уровне, который не позволяет клеткам снижать МТТ в такой степени, как при более низких концентрациях МТТ. Следовательно, концентрация МТТ, при которой образуется максимальный уровень формазана до гибели клеток, индуцированной МТТ, должна быть выбрана как оптимальная концентрация МТТ для каждого конкретного типа клеток, количества клеток и времени инкубации.

Чтобы определить переменные, которые потенциально могут повлиять на измерения объемного МТТ-анализа, мы изучили ОП (в частности, уменьшенную интенсивность пропускания света при освещении образца с полосой пропускания 492 нм в зависимости от количества клеток, концентрации МТТ и времени инкубации клеток с реагентом МТТ на клеточной популяции линии Нер2 (рисунок 5). ОП клеток измеряли через 4 ч после добавления МТТ в концентрациях 5 мкг, 15 мкг и 25 мкг на лунку.

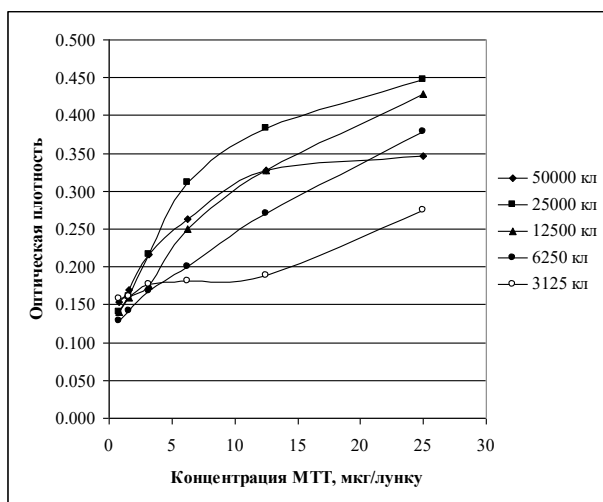


Рисунок 5. – Зависимость образования формазана от количества клеток Нер2 в лунке при различных концентрациях МТТ

Наблюдаемое увеличение ОП также может быть результатом увеличения плотности клеток, а не их количества как такового, учитывая, что пространственная близость клеток друг к другу может влиять на межклеточную коммуникацию и, следова-

тельно, изменять метаболическое поведение клеток [11]. Другими словами, с увеличением количества клеток не только увеличивается сумма уровней формазана, продуцируемого клетками, но и более высокая плотность клеток может также изменить уровень формазана в каждой отдельной клетке за счет изменения природы межклеточной передачи сигналов и, следовательно, ферментативной активности клеток. Однако это не просто вытекает из наших данных и должно быть подтверждено путем сравнения уровней ОП различных популяций клеток с одинаковым количеством клеток, различающихся пролиферативным потенциалом деления.

Следует отметить, что влияние увеличения количества клеток на ОП неодинаково в зависимости от различных концентраций МТТ и времени инкубации. Даже при одинаковой концентрации МТТ и времени инкубации величина этого эффекта не остается постоянной по мере увеличения числа клеток. Исследования других авторов также показали, что ОП не всегда является линейной функцией количества клеток, и эта функция варьирует в зависимости от типа клеток [12], количества клеток [12, 13], pH [12] и формазана [13]. В целом эти результаты позволяют заключить, что перед применением МТТ-анализа для оценки жизнеспособности клеток необходимо провести эксперименты по строгому протоколу, чтобы определить, как вышеупомянутые параметры влияют на взаимосвязь между измеренной ОП и количеством клеток.

На концентрацию формазана, вырабатываемую клеточной популяцией, влияет не только количество жизнеспособных клеток, но и другие факторы, связанные с тестируемыми веществами или состоянием клеток, а именно различное количество поглощения МТТ [14] и изменения метаболической активности клеток [15]. Другими словами, суммарный эффект всех изученных факторов, а не только одного из них, определяет уровень снижения МТТ, последующую выработку формазана и, наконец, измеренную ОП. Например, в работе М. Ghasemi et al. [16] показано, что измерение уровней ОП в разные моменты времени (2, 3 и 4 ч) после инкубации клеток РС-3 (простата человека) с МТТ в условиях

независимо от концентрации МТТ, количества посева клеток и увеличения времени инкубации МТТ увеличивает уровни ОП, что предположительно представляет собой снижение МТТ и формазана. Однако при отсутствии клеток уровни ОП были одинаковыми в разное время инкубации независимо от концентрации МТТ. Кроме того, максимально возможный уровень снижения МТТ достигается через 3 ч инкубации при 20000 клеток РС-3 на лунку 96-луночного планшета с 0,3 и 0,4 мг/мл МТТ. Однако при более низких уровнях количества клеток и/или концентрации МТТ максимальный (насыщающий) уровень его снижения не достигается вплоть до 4 ч инкубации МТТ. Следовательно, момент времени насыщения зависит от количества засеянных клеток и концентрации МТТ реагента [12]. Достижение уровня плато ОП после определенного времени инкубации клеток с МТТ может быть связано с уменьшением клетками всего доступного реагента МТТ или затруднением дальнейшего поглощения МТТ при появлении определенного количества кристаллов формазана на поверхности клеток [9, 10]. Другой причиной может быть цитотоксический эффект реагента МТТ. Показано, что внутриклеточный метаболизм МТТ постепенно вызывает повреждение митохондрий, нарушение нормального клеточного метаболизма и, наконец, апоптоз клеток [17]. Зависимая от времени потеря целостности мембраны в результате экзоцитоза формазана также является одним из механизмов гибели клеток после инкубации МТТ [18]. Тот факт, что насыщение уровней ОП происходит раньше при более высокой концентрации МТТ и большем количестве клеток, позволяет предположить, что более высокая концентрация МТТ и/или большее количество клеток потенциально ускоряют достижение уровня насыщения при снижении МТТ.

Таким образом, более высокая плотность клеток и их близость друг к другу могут повысить метаболическую активность клеток. Тестируемые лекарственные вещества также могут изменить момент времени насыщения и/или уровень насыщения и таким образом потенциально исказить сравнительный анализ между различными состояниями клеток.

Поскольку культуральные среды обеспечивают питательные вещества для роста, пролиферации и метаболизма клеток, то их состав и наличие или отсутствие сыворотки могут влиять на результаты анализа МТТ, биологическое поведение клеток, уровень метаболической активности и, следовательно, на снижение МТТ.

Чтобы выяснить, как влияние сывороточного голодания на метаболическую активность клеток будет отражаться на измерениях анализа МТТ, мы сравнили литературные данные анализа МТТ между клетками, выращенными в бессывороточной и содержащей сыворотку средах [16].

Данные литературы свидетельствуют о том, что большинство клеток, которым не хватало сыворотки в течение 26 ч, имели круглую морфологию (некоторые с пузырьками) по сравнению с нормальной формой веретена большинства клеток, получавших сыворотку, в то время как веретенообразная форма клеток РС-3 (простата человека) может указывать на жизнеспособность и прикрепление, круглая форма указывает на отслоение клеток и может быть морфологическим индикатором апоптоза клеток [18, 19]. Однако гибель клеток представляет собой поэтапный процесс, который обычно занимает несколько часов [18], и клетки круглой формы могут находиться на разных стадиях клеточной гибели, тогда как на более ранних стадиях они все еще демонстрируют некоторый уровень метаболической активности, о чем свидетельствует образование формазана в этих клетках.

Следует также отметить, что компоненты, присутствующие в культуральной среде, потенциально могут повлиять на результаты анализа МТТ. Вероятно, это может возникнуть из-за оптических помех (поглощение или рассеяние света), химических реакций (абиотическое восстановление МТТ) и биологического воздействия на жизнеспособность, рост и метаболическую активность клеток, которые, следовательно, могут повлиять на общий уровень снижения МТТ. Некоторыми авторами было показано, что МТТ сам по себе не оказывает оптического влияния на результаты анализа [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы и собственные данные свидетельствуют о том, что измерения параметров МТТ являются результатом сложного процесса, зависящего от многих из вышеупомянутых факторов, и поэтому оптимизация анализа и рациональная интерпретация данных необходимы для предотвращения ошибочных выводов о таких переменных, как жизнеспособность клеток, токсичность тестируемого вещества или состояние клеточного метаболизма.

Наши результаты указывают на необходимость оптимизации таких параметров, как количество клеток, условия культивирования, концентрация МТТ и время инкубации МТТ для каждой клеточной линии, условий эксперимента. Оптимальные значения этих параметров достигаются, когда анализ может оптимально выявить различия между различными клеточными популяциями, позволяя клеткам проявлять максимальную способность к снижению МТТ, но не вызывать значительного уровня токсичности клеток перед измерениями анализа. Именно в таких оптимальных условиях значения ОП можно применять в качестве приблизительной оценки среднего уровня снижения МТТ в каждой популяции клеток. Однако уровень

ОП не является простым представлением только одного параметра, такого как жизнеспособность клеток, пролиферация клеток или метаболическая активность, а представляет собой сумму многих факторов на уровне отдельных клеток и клеточных популяций, а также других клеточных факторов, таких как фаза роста клеток, скорость поглощения МТТ и экстружии формазана, на которые потенциально может влиять тестируемое вещество или культуральная среда.

В ходе исследований нами разработан протокол для проведения МТТ-анализа на клетках аденокарциномы гортани Hep2 и почки африканской зеленой мартышки Vero, который включает рекомендуемые оптимальные условия, а именно число высеваемых клеток Hep2 в лунку составляет 20 тыс. клеток, а Vero – 25 тыс. клеток; время адаптации клеток для адгезии и нормализации процесса пролиферации составляет 48 ч; оптимальная концентрация МТТ – 25 мкг на лунку 96-луночного планшета; оптимальное время инкубации реагента МТТ с клетками – 4 ч при температуре 37 °С и 5 % CO₂; оптимальные длины волн для проведения МТТ-теста: 492 нм – для регистрации абсорбции формазана и 630 нм – для отсекающего фонового сигнала.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность / А. Н. Афанасьева [и др.] // *Лабораторные животные для научных исследований*. – 2021. – № 2. – С. 16–24.
2. Adan, A. *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays* / A. Adan, Y. Kiraz, Y. Baran // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 17, № 14. – P. 1213–1221.
3. Sylvester, P. W. *Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability* / P. W. Sylvester // *Drug Design and Discovery*. – 2011. – Vol. 716. – P. 157–168.
4. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / Е. М. Трещалина [и др.] // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А. Н. Миронова. Ч. 1.* – М.: Гриф и К, 2012. – С. 640–654.
5. Berridge, M. V. *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction* / M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan // *Biotechnol. Annu. Rev.* – 2005. – № 11. – P. 127–152.
6. Stockert, J. C. *Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives* / J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo // *Acta Histochem.* – 2018. – Vol. 120. – P. 159–167.
7. Mosmann, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays* / T. Mosmann // *Immunol. Methods*. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
8. Angius, F. *Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair* / F. Angius, A. Floris // *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA*. – 2015. – Vol. 29, № 2. – P. 314–319.
9. *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets* / J. C. Stockert, [et al.] // *Acta Histochem.* – 2012. – Vol. 114, № 8. – P. 785–796.
10. *Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons* / A. M. Surin [et al.] // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 82. – P. 737–749.

11. Karp, G. *Cell signaling and signal transduction: Communication between cells* / G. Karp, P. van der Geer // *Cell and Molecular Biology. Concepts Exp.* – 2005. – Vol. 6. – P. 608–609.
12. *Considerations and Technical Pitfalls in the Employment of the MTT Assay to Evaluate Photosensitizers for Photodynamic Therapy* / E. Carreco [et al.] // *Appl. Sci.* – 2021. – Vol. 11. – P. 2603.
13. Koyanagi, M. *A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells* / M. Koyanagi, S. Kawakabe, Y. Arimura // *Cytotechnology* 2015. – Vol. 68. – P. 1489–1498.
14. *Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates* / G. Diaz [et al.] // *Eur. J. Histochem.* – 2007. – Vol. 51. – P. 213–218.
15. *Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods* / L. Tang [et al.] // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2018. – Vol. 37. – P. 1–15.
16. *The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis* / M. Ghasemi [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 12827.
17. *Biomechanical stimulation effects on the metabolism of adipocyte* / L. M. Moldovan [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2020. – Vol. 235. – P. 8702–8713.
18. Elmore, S. *Apoptosis: A review of programmed cell death* // *Toxicol. Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 495–516.
19. *Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death* / G. Kroemer [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 16. – P. 3–11.

ТРИКЛАМИЗОЛ
противопаразитарный препарат

ПРИМЕНЯЮТ
при ассоциативных
гельминтозах крупного
рогатого скота и
диких парнокопытных
животных групповым
способом с кормом или
подкормкой однократно

СОДЕРЖИТ
триклабендазол,
албендазол,
левамизола
гидрохлорид,
лактозу

WWW.BIEVM.BY