

Д. С. Яковлев^{1,2}, **К. Т. Султанова**^{1,2}, **Е. А. Золотова**¹,
А. Г. Гасайниева¹, **А. А. Спасов**^{1,2}

¹ Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и биоинформатики;

² Волгоградский медицинский научный центр

ОПТИМИЗАЦИЯ МТТ-ТЕСТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ MCF-7

УДК 615.013

Изучены особенности определения острой цитотоксичности с помощью МТТ-теста. Проведена адаптация МТТ-теста с учетом основных критических параметров для клеточной линии аденокарциномы молочной железы. Подобрано наиболее оптимальное число высеваемых клеток для линии MCF-7, время адаптации и инкубации веществ для проведения изучения цитотоксичности в ходе МТТ-теста.

Ключевые слова: МТТ-тест, клеточная линия аденокарциномы молочной железы, MCF-7.

D. S. Yakovlev, K. T. Sultanova, E. A. Zolotova, A. G. Gasainieva, A. A. Spasov

OPTIMIZATION OF MTT ASSAY FOR EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF NEW CHEMICAL COMPOUNDS ON MCF-7 CELL LINE

It describes the features of determining of acute cytotoxicity using MTT assay. In this study the adaptation of main critical parameters of MTT assay for breast adenocarcinoma cell line has been reported. There were matched the optimal density of MCF-7 cells, time of cell adaptation and time of incubation of substances for measurement of cytotoxicity during the MTT assay.

Key words: MTT assay, breast adenocarcinoma cell line, MCF-7.

Изучение токсичности и безопасности новых биологически активных молекул является одним из необходимых этапов их доклинического изучения. Применение клеточных культур и методик определения цитотоксичности при оценке безопасности новых веществ позволяет уменьшить эксперименты на животных при поиске и разработке новых эффективных препаратов, делает полученные данные прогностически более надежными при их экстраполяции на организм человека.

Классическим тестом для производительного скрининга на наличие цитотоксичности у новых соединений является МТТ-тест. Применение данной методики на раннем этапе оценки безопасности отличается быстротой получения результатов, относительной дешевизной, высокой воспроизводимостью.

В зависимости от целей исследования, вариабельные параметры в протоколе проведения МТТ-теста подвергаются модификациям. При воспроизведении методики изучения цитотоксичности соединений необходимо учитывать основные критические параметры: особенности культивирования используемой клеточной линии, количество высеваемых клеток, время

адаптации до внесения субстанций, объем добавляемых веществ, время инкубации.

Диапазон допустимой раститровки клеток для проведения МТТ-теста достаточно широк, в то же время точность и воспроизводимость результатов зависит от числа жизнеспособных клеток, конверсирующих МТТ-реагент (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия).

Максимальное количество клеток должно находиться в пределах линейного участка кривой зависимости оптической при восстановлении МТТ в формазан от числа метаболически активных клеток [4]. При этом стоит учитывать, что при низких плотностях клеток они оказываются более чувствительными к действию токсических веществ, а при высокой плотности высеваемых клеток часть из них становится недоступной для токсина [2]. Также выбор необходимого для засеваания в лунку количества клеток напрямую зависит от времени инкубации. При длительном времени инкубации число клеток минимально, поскольку по истечении эксперимента не должно происходить перерастания монослоя.

При изучении острой цитотоксичности новых соединений наименьшее время инкубации

составляет 6 часов, однако данный параметр чаще варьирует от 24 до 72 часов.

Подходы внесения исследуемых веществ также переменны. Объем раствора исследуемых веществ, как правило, не превышает 1/10 конечного объема среды. При этом возможно производить аспирацию среды после прикрепления клеток ко дну планшета с последующим добавлением новой среды и раствора исследуемых веществ.

Другим подходом является добавление новой среды и раствора изучаемых соединений без аспирации имеющейся среды.

Отличается и используемая концентрация рабочего раствора МТТ от 2 до 5 мг/мл с различным последующим временем инкубации (1–4 часа).

Измерение оптической плотности формазана проводят в широком диапазоне длин волн от 420 до 664 нм, наиболее часто с детекцией пиков при 500 или 550 нм [3]. Во многих случаях выбор длины волны продиктован техническими возможностями оборудования исследователей. С этим часто связан и выбор длины волны для отсека фонового свечения среды, находящегося в пределах 620–720 нм.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оптимизировать метод оценки острой цитотоксичности на клеточной линии аденокарциномы молочной железы (MCF-7) для тестирования новых химических соединений, т. к. существует достаточно большое количество вариаций проведения МТТ-теста

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение цитотоксичности проводилось на клетках линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) (ATCC® HTB-22™). [*Выражаем благодарность Научно-образовательному центру фармацевтики Казанского федерального университета за предоставление клеточной линии MCF-7*].

Использовались реактивы: полная ростовая среда [среда DMEM (Gibco), эмбриональная телячья сыворотка (FBS) (Gibco), 1%-й раствор пенициллина-стрептомицина (Gibco), 1%-й раствор незаменимых аминокислот (NEAA) (Sigma-Aldrich), раствор пирувата натрия 2 мМ (Sigma-Aldrich)], раствор Хэнкса (ПанЭко), 0,25%-й раствор трипсина-ЭДТА (Gibco), диметилсульфоксид (DMCO) (Helicon), МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (Sigma-Aldrich), 0,4%-й раствор трипанового синего (Helicon), доксорубицина гидрохлорид (Sigma-Aldrich), вода деионизированная.

Использовалось оборудование: планшетный ридер CLARIOstar (BMG LABTECH), ламинарный бокс II класса биобезопасности (LAMSYSTEMS), CO₂-инкубатор (Galaxy 170R New Brunswick an Eppendorf company), микроскоп инвертированный (PrimoVert Plus, Carl Zeiss), камера Ньюбауэра, (Heinz Herenz).

На первом этапе проводилось пассирование клеток в полной ростовой среде для уточнения времени удвоения клеточной линии с целью выбора времени адаптации, необходимого для адгезии, и последующей инкубации веществ без пересева. Для процедуры снятия клеточного монослоя применялся метод трипсинизации с последующей оценкой жизнеспособности клеток методом исключения раствора трипанового синего.

На втором этапе исследования для выбора наиболее оптимальной длины волны регистрации оптической плотности при конверсии МТТ в формазан производилось измерение спектров абсорбции.

Третьим этапом работы являлся выбор оптимального числа высеваемых клеток. Производилась инкубация 25; 12,5; 10; 6,250; 3,125; 1,5 и 0,781 тысяч клеток на лунку в полной ростовой среде для адгезии клеток ко дну планшета. По истечении времени адаптации производилось внесение в лунки раствора доксорубицина гидрохлорида в концентрациях 1×10^{-5} , 1×10^{-6} и 1×10^{-7} моль/л. В контрольные лунки вносится эквивалентный объем раствора Хэнкса.

По истечении времени инкубации веществ [1], при исключении контакта с дном планшета, производилось удаление культуральной среды при помощи автоматического вакуумного аспиратора. В каждую лунку планшета вносился раствор МТТ-реактива, приготовленный из расчета 5 мг/мл, с последующей инкубацией в течение 2 часов. Для солюбилизации внутриклеточных фиолетовых кристаллов формазана использовался раствор ДМСО в объеме 100 мкл.

Далее осуществлялась детекция абсорбции на выбранных длинах волн и последующий расчет процента жизнеспособности клеток в каждой лунке относительно значения абсорбции контроля с построением графиков зависимости % жизнеспособных клеток от концентрации доксорубицина с последующим расчетом IC₅₀.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения MARS Data Analysis Software, Microsoft Office Excel 16 и GraphPad Prism v.8.0.1 с применением линейного регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе изучения времени удвоения клеточной культуры аденокарциномы молочной железы было показано, что через 5 часов после пассажа клеток наблюдалась частичная адгезия клеток ко дну культурального флакона.

Через 24 часа инкубации начиналось 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 данного времени недостаточно для образования монослоя в культуральном планшете с учетом 48 часов инкубации веществ, что исключает завышение показателей цитотоксичности соединений из-за замедления метаболической активности плотно контактирующих клеток.

Для выбора оптимальной длины волны для детекции были сняты спектры абсорбции среды DMEM и формазана в диапазоне длин волн 220–1000 нм. При этом было показано, что максимум абсорбции при конверсии МТТ-реагента в формазан клетками линии MCF-7 при использовании в качестве солюбилизатора раствора ДМСО приходится на 555 нм. Данная длина волны была выбрана для регистрации оптической плотности в последующих исследо-

ваниях. В качестве референсной была выбрана длина волны 650 нм, так как в интактной группе образцов собственная оптическая плотность среды и клеточной массы при данной длине волны по величине сопоставима с показателем оптической плотности при длине волны 555 нм. 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. Линейный участок кривой зависимости оптической плотности при конверсии МТТ в формазан от количества жизнеспособных клеток начинается в среднем при 10 тыс. клеток в лунке (см. рис.). При пассаже меньшего количества наблюдаются низкие значения абсорбции, что может привести к значительному искажению результатов исследования цитотоксичности соединений в сторону понижения IC_{50} .

По данным оптической плотности рассчитывалась полуингибирующая концентрация (IC_{50}) цитостатика доксорубицина, т. е. концентрация препарата, вызывающая торможение роста клеток на 50 %, коррелирующая с метаболической активностью жизнеспособных клеток, а также проведены расчеты $\log C_{Y=50}$ (см. табл.).

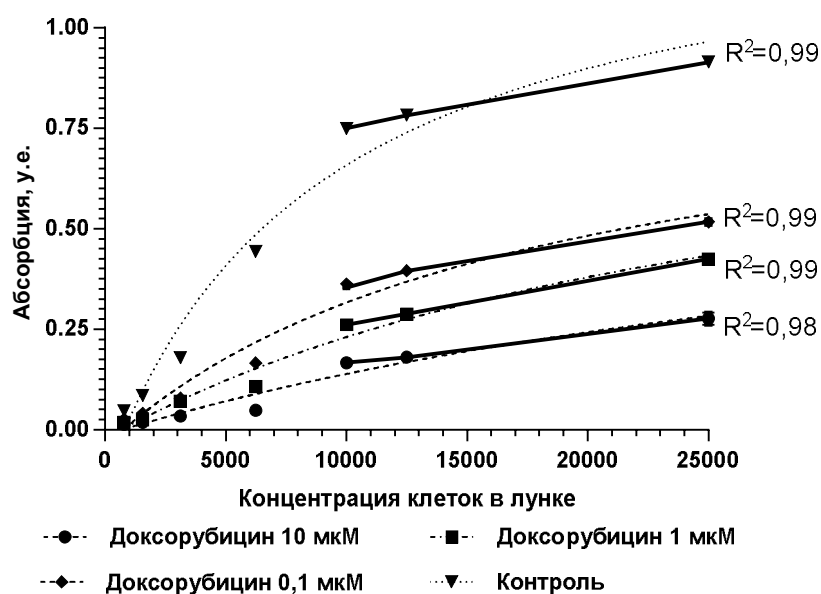


Рис. Влияние плотности высеваемых клеток на абсорбцию формазана

Цитотоксичность доксорубицина в МТТ-тесте в диапазоне высеваемых клеток

Количество клеток, тыс.	0,781	1,563	3,125	6,25	10	12,5	25
$\log C_{Y=50\%}, M$	$2,75 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-8}$	$4,94 \times 10^{-8}$	$1,12 \times 10^{-8}$	$1,13 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-6}$
R^2	0,96	0,91	0,86	0,91	0,99	0,98	0,97

Так как линейный участок кривой зависимости оптической плотности при конверсии МТТ в формазан от количества жизнеспособных клеток начинается при 10 тыс. клеток в лунке, данное количество клеток рекомендуется для проведения исследований цитотоксичности. При этом значение полуингибирующей концентрации для доксорубина составило 1,13 ммоль/л, что согласуется с литературными данными [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования подобраны оптимальные условия для проведения МТТ-теста с использованием клеточной линии аденокарциномы молочной железы (MCF-7): рекомендуемое число высеваемых клеток в лунку составляет 10 тысяч; рекомендуемое время адаптации клеток для адгезии и нормализации процесса пролиферации составляет 24 часа; оптимальные длины волн для проведения МТТ-теста: 555 нм – для регистрации абсорбции формазана и 650 нм – для отсечения фонового сигнала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств [Текст] / 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.
2. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay / Kellen Cristina da Silva Gasque [et al.] // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2014. – Vol. 57, № 3. – P. 381–385.
3. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds / Mariela G. Perez [et al.] // *Analytical Biochemistry.* – 2017. – Vol. 535. – P. 43–46.
4. *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.
5. Synthesis and antitumor activity of pyridoxine monoalkenyl derivatives / M. V. Pugachev [et al.] // *Russian Chemical Bulletin, International Edition.* – 2016. – Vol. 65. – № 2. – P. 532–536