

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТИЛТИАЗОЛИЛДИФЕНИЛ-ТЕТРАЗОЛИУМ БРОМИДА ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОЙ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

Е. В. Антоненко, Е. В. Шахлевич

Для оценки клеточной (опосредованной цитотоксическими клетками иммунной системы) и лекарственной (опосредованной цитостатиками, ингибиторами протеин киназ и другими лекарственными препаратами) цитотоксичности используются разнообразные аналитические методы – от применения радиоактивных меток (например, H^3 -тимидина или Cr^{51}) до флуоресцентных зондов, таких как *DiOC₆*, *JC-1* или *PI* [1; 2]. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и свои недостатки. Так, очень чувствительным и воспроизводимым методом оценки клеточной цитотоксичности является радиоизотопный метод. Однако применение радиоактивных изотопов сопряжено с риском радиоактивного облучения. Кроме того, нестабильность радиоактивных меток, их дороговизна, потребность в специальном техническом оборудовании (таком, как клеточный харвестер, бета- и/или гамма-счетчик и т. д.) так же накладывают ограничения на возможность использования радиоизотопного метода в повседневной лабораторной практике.

В настоящее время в клинико-лабораторных и экспериментальных исследованиях клеточной и/или лекарственной цитотоксичности все более популярным становится МТТ тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид (МТТ) в нерастворимый формазан, который кристаллизуется внутри живой клетки [3; 4]. Поскольку между количеством жизнеспособных клеток (или, строго говоря, между количеством внутриклеточных активно функционирующих окислительных дегидрогеназ) и количеством образовавшегося формазана существует линейная зависимость, то перевод формазана в раствор с помощью подходящих органических растворителей (например, диметилсульфоксида или изопропанола) и последующая фотометрия позволяют точно рассчитать специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным цитотоксическим агентом. МТТ тест технически прост, чувствителен и воспроизводим. Однако, не смотря на свою техническую простоту и постулируемую универсальность МТТ теста, для каждой конкретной экспериментальной модели требуется его оптимизация.

Мы использовали МТТ тест для оценки специфической гибели клеток линии *K562* эритробластного криза хронического миелоидного лейкоза человека, индуцированной мононуклеарными клетками периферической крови (МПК) или противолейкозными лекарственными препаратами. Дизайн исследования включал оценку: 1) чувствительности метода (минимального количества жизнеспособных клеток, выявляемых с его помощью); 2) диапазона линейной зависимости между количеством жизнеспособных клеток и эффективностью конверсии ими МТТ в формазан; 3) оптимального соотношения клеток линии *K562* и МПК в цитотоксическом тесте; 4) стабильности МТТ в присутствии противолейкозных препаратов.

Согласно нашим экспериментальным данным, минимальное количество жизнеспособных клеток, выявляемое с помощью МТТ теста, зависит от типа клеток: для лейкозных клеток линии *K562* таковым является ~3 тыс. клеток на одну лунку стандартной 96-луночной микроплаты, а для МПК ~50 тыс. клеток на лунку (табл. 1). По-видимому, наблюдаемые различия обусловлены более высокой метаболической активностью лейкозных клеток по сравнению с нормальными клетками крови.

Не смотря на различия по минимальному количеству достоверно детектируемых жизнеспособных клеток, линейная зависимость между количеством таких клеток и эффективностью конверсии ими 0,45 мг/мл МТТ (изменению оптической плотности при $\lambda = 492$ нм) для обоих типов клеток сохраняется примерно до 1,5 оптических единиц. Этот вывод подтверждается данными нелинейного регрессионного анализа, согласно которым зависимость между количеством жизнеспособных клеток и количеством образовавшегося формазана описывается линейной функцией $y=A+Bx$ только в диапазоне до 1,5 оптических единиц при максимальном количестве клеток линии *K562* 135,8 тыс. на лунку и МПК – 535,7 тыс. на лунку. При дальнейшем увеличении количества клеток на лунку наблюдается нелинейный рост оптической плотности при $\lambda=492$ нм, описываемый экспоненциальной функцией $y=y_0+A1(1-\exp(-x/t1))+A2(1-\exp(-x/t2))$.

Исходя из данных по чувствительности МТТ теста, мы предположили, что его разрешающая способность (т. е. минимальное количество мертвых клеток выявляемых с помощью этого метода) при оценке специфической гибели клеток линии *K562*, индуцированной МПК, тем выше, чем больше лейкозных клеток вносится в лунки микроплаты. Для проверки выдвинутой гипотезы мы провели сравнительный анализ частоты специфической гибели клеток линии *K562* при их различной концентрации (от 10 тыс. до 40 тыс. клеток на лунку) и разном соотношении с МПК (от 1:0,625 до 1:40).

Таблица 1

**Эффективность конверсии МТТ в формазан
клетками линии K562 и МПК человека.**

Количество клеток в лунке	Тип клеток			
	$X \pm Sx$	P	$X \pm Sx$	P
0	$0,168 \pm 0,033$		$0,140 \pm 0,036$	
6,1	$0,157 \pm 0,005$	$> 0,05$	нет данных	
12,2	$0,177 \pm 0,014$	$> 0,05$	нет данных	
24,4	$0,197 \pm 0,047$	$> 0,05$	нет данных	
48,8	$0,200 \pm 0,034$	$> 0,05$	нет данных	
97,7	$0,267 \pm 0,094$	$> 0,05$	нет данных	
195,3	$0,192 \pm 0,017$	$> 0,05$	нет данных	
390,6	$0,198 \pm 0,005$	$> 0,05$	нет данных	
781,3	$0,205 \pm 0,013$	$> 0,05$	нет данных	
1562,5	$0,193 \pm 0,007$	$> 0,05$	нет данных	
3125	$0,226 \pm 0,021$	0,02	нет данных	
6250	$0,312 \pm 0,062$	0,01	нет данных	
12500	$0,426 \pm 0,061$	$< 0,01$	$0,135 \pm 0,017$	$> 0,05$
25000	$0,545 \pm 0,046$	$< 0,01$	$0,219 \pm 0,024$	$> 0,05$
50000	$0,935 \pm 0,053$	$< 0,01$	$0,294 \pm 0,042$	0,02
100000	$1,467 \pm 0,121$	$< 0,01$	$0,440 \pm 0,075$	0,01
200000	$1,754 \pm 0,247$	$< 0,01$	$0,703 \pm 0,126$	$< 0,01$
400000	$4,020 \pm 0,369$	$< 0,01$	$1,238 \pm 0,225$	$< 0,01$
800000	нет данных		$1,932 \pm 0,419$	$< 0,01$

Нами обнаружено, что специфическая гибель клеток линии K562 зависит от их соотношения с МПК, причем эта зависимость может быть описана с помощью нелинейной функции $y=A(x-B)^C$. Хотя достоверных различий между сравниваемыми кривыми мы не получили, тем не менее, расчет минимального соотношения клеток линии K562 и МПК (параметр B в указанной нелинейной функции), выше которого детектируется специфическая гибель лейкозных клеток, показал, что оно тем меньше, чем больше клеток линии K562 вносится в лунки микроплаты (табл. 2).

Исходя из этих данных, а так же данных по чувствительности МТТ теста и диапазону линейной зависимости между количеством жизнеспособных клеток и эффективностью конверсии ими МТТ в формазан, оптимальным соотношением лейкозных клеток линии K562 и МПК в изучаемой экспериментальной модели является соотношение 1:20.

Таблица 2

Расчетные параметры цитотоксического взаимодействия между МПК человека и клетками линии K562, полученные в нелинейной регрессионной модели $y=A(x-B)^C$.

Количество клеток-мишеней на лунку	Расчетные параметры		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
1×10^4	15,23782	2,5	0,35067
2×10^4	6,23772	1,25	0,77701
4×10^4	9,58552	0,625	0,53514

В завершение мы изучили стабильность МТТ в присутствии противолейкозных лекарственных препаратов. На протяжении стандартного периода постановки теста (4-е часа) МТТ стабилен в растворе, содержащем 0,001–100 мкг/мл бусульфана, 0,001–1000 мкг/мл цитарабина и 0,001–10 мкг/мл *N*-гидроксикарбамида. Стабильность МТТ при указанных концентрациях цитостатиков позволяет успешно использовать МТТ тест для оценки дозо- и время-зависимого эффекта противолейкозных препаратов на выживаемость клеток линии K562. В случае же с *N*-гидроксикарбамидом при концентрации этого препарата выше 10 мкг/мл МТТ начинает спонтанно окисляться до формазана, что не позволяет использовать данный тест для оценки специфической гибели лейкозных клеток, индуцированной *N*-гидроксикарбамидом.

Литература

1. *Haugland R. P.* Handbook of fluorescent probes and research products. Ninth Edition / Leiden, 2002.
2. *Kemenade E. W., Ligtenberg M. J. L., Boer A. J.* et al. Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction // J. Immunol. 1993. № 2. P. 767–776.
3. *Liu J. W., Tang Y., Shen Y., Zhong X. Y.* Synergistic effect of cell differential agent-II and arsenic trioxide on induction of cell cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells // World J. Gastroenterol. 2003. № 1. P. 65–68.
4. *Niks M., Otto M.* Towards an optimized MTT assay // J. Immunol. Methods. 1990. № 1. P. 149–151.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНАЛОГОВ ПРОСТАГЛАНДИНОВ Е С МОДИФИЦИРОВАННОЙ Ω -ЦЕПЬЮ

О. И. Губич

Простагландины (ПГ) – специфические биорегуляторы, представляющие собой низкомолекулярные продукты биотрансформации полиненасыщенных жирных кислот [1]. Физиолого-биохимический эффект ПГ обеспечивается несколькими системами сигнальной трансдукции; преобладающим путем является аденилатциклазный (АЦ) каскад [2].