

В.С. Черепович, Е.В. Волочник, Е.В. Антоненко,
Е.С. Лоткова, Т.В. Романовская, В.В. Гринева

ОПТИМИЗАЦИЯ КРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МТТ-ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОЙ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

Белорусский государственный университет

МТТ-колориметрический тест стал стандартным в цитотоксических исследованиях. В статье обсуждаются критические параметры и ограничения метода в разных экспериментальных моделях.

Ключевые слова: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид, цитотоксичность.

V.S. Charapovich, A.V. Valochnik, A.V. Antanenka, A.S. Latkova, T.V. Ramanouskaya, V.V. Grinev
**OPTIMIZATION OF THE CRITICAL PARAMETERS OF THE MTT-ASSAY TO ASSESS CELL-
AND DRUG-MEDIATED CYTOTOXICITY**

In recent years MTT-based colorimetric assay has become one of the commonly used methods to assess drug-and cell-mediated cytotoxicity. The critical points of using the MTT-assays in experimental and clinical studies are explored and discussed.

Key words: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, cytotoxicity.

В клинико-лабораторных и экспериментальных исследованиях широкое распространение для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности получил МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Перевод формазана в раствор с помощью подходящих органических растворителей, таких как, диметилсульфоксид (ДМСО) или изопропанол, и последующая фотометрия позволяют точно сопоставить изменение оптической плотности раствора по отношению к контролю с изменением количества жизнеспособных клеток, а в цитотоксических исследованиях оценить специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным цитотоксическим агентом [4]. МТТ-тест технически прост, чувствителен и воспроизводим, однако для решения каждой конкретной экспериментальной или клинико-диагностической задачи требуется его оптимизация.

Мы использовали МТТ-тест для оценки специфической гибели клеток линии К562 эритробластного криза хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) человека и свежeweделенных лейкозных клеток большого ХМЛ, индуцированной мононуклеарными клетками периферической крови (МПК) или стандартными противолейкозными препаратами. Целью работы была оптимизация критических параметров (чувствительности, специфичности, воспроизводимости) МТТ-теста в различных экспериментальных моделях.

Материал и методы

Объектами исследования служили клетки линии К562 и свежeweделенные лейкозные клетки больных ХМЛ, находящихся на стадии акселерации и бластного криза. Все типы клеток культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 1,5 г/л бикарбоната натрия, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Источником лимфоцитов в цитотоксическом тесте служили МПК крови практически здоровых доноров РНПЦ гематологии и трансфузиологии. Лейкозные клетки и МПК выделяли стандартным методом в градиенте плотности фиколла-верографина (Кожевников В. С. // Иммунология.-1985, №4.-с. 34-37). В качестве стандартных противолейкозных препаратов использовали бусульфан («Милеран», Glaxo Wellcome Operations, Великобритания), цитарабин («Цитарабин», РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), N-гидроксикарбамид («Гидроксиуреа», Pliwa Krakow, Польша). Кроме того, в работе были использованы флавоноиды кверцетин, эпикатехин, байкалеин и фисетин (все производство фирмы Sigma Aldrich Co, США).

Оценка специфической гибели клеток линии К562, индуцированной противолейкозными препаратами. В лунки 96-луночной плоскодонной культуральной платы вносили по 100 мкл суспензии клеток (2 г 10⁵ кл/мл) и 100 мкл соответствующей концентрации лекарственного препарата. Все концентра-

ции ставили в триплетах. Платы оставляли на 24, 48, 72 и 96 ч. За 4 часа до окончания инкубационного периода вносили МТТ.

Цитотоксический тест с МПК. В лунки культуральной платы вносили клетки-мишени (лейкозные клетки) в разных концентрациях (от 1 × 10⁴ до 4 × 10⁴ кл/лунку) и клетки-эффекторы (МПК) в фиксированном количестве до получения соотношения от 1:0,625 до 1:40 (шаг 2). Суммарный объем клеточной суспензии составлял 200 мкл. Платы инкубировали 18 часов. За 4 часа до окончания инкубации в лунки вносили МТТ.

МТТ-тест. МТТ-тест проводили по методике, описанной Niks M. и Otto M. [5] с небольшими модификациями. В каждую лунку платы с клеточными суспензиями вносили 20 мкл раствора МТТ (5 г/л) и инкубировали на протяжении 4 ч при 37°C в темноте во влажной атмосфере с 5% CO₂. По окончании инкубации супернатант осторожно удаляли, а в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО. Осадок ресуспендировали и 15 мин инкубировали в темноте при комнатной температуре. Показания оптической плотности считывали на ИФА-ридере при 492 нм. Специфическую гибель лейкозных клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{специфическая гибель, индуцированная МПК, \%} = \left(1 - \frac{ОП_0 - ОП_3}{ОП_M - ОП_C}\right) \times 100\%,$$

$$\text{лекарственно-индуцированная гибель, \%} = \left(1 - \frac{ОП_0 - ОП_C}{ОП_M - ОП_C}\right) \times 100\%,$$

где ОП_М – оптическая плотность в контрольных лунках (клетки-мишени без клеток-эффекторов или цитостатика); ОП₀ – оптическая плотность в опытных пробах (клетки-мишени с клетками-эффекторами или цитостатиком); ОП₃ – оптическая плотность в контрольных лунках (клетки-эффекторы без клеток-мишени); ОП_С – оптическая плотность контроля среды.

Результаты и обсуждение

Оптимизация критических параметров МТТ-теста, предназначенного для оценки лекарственной чувствительности клеток. Предварительное исследование спектра поглощения водного раствора МТТ позволило установить, что окисление МТТ в формазан приводит к сдвигу пика поглощения с 375 нм до 550 нм. Пик поглощения формазана имеет основание от 400 нм до 700 нм, что позволяет измерять продукцию формазана в широком диапазоне длин волн, ориентируясь на технические возможности лаборатории. Мы использовали λ=492 нм, которая является рабочей для планшетного спектрофотометра Multiscan Ascent (ThermoLabsystems, Финляндия).

Для оценки чувствительности метода мы исследовали эффективность конверсии МТТ в формазан различным количеством лейкозных и мононуклеарных клеток (от 2 млн. кл./мл до 31 кл./мл для клеток К562 и от 40 млн. кл./мл до 62,5 тыс. кл./мл для МПК). Согласно полученным данным, минимальное

количество жизнеспособных клеток, достоверно выявляемое с помощью МТТ-теста, зависит от типа клеток. Для лейкозных клеток линии К562 таковым является 3 тыс. клеток на одну лунку стандартной 96-луночной платы, для МПК – 50 тыс. клеток на лунку. Изменение чувствительности метода по отношению к разным типам клеток может быть обусловлено отлича-

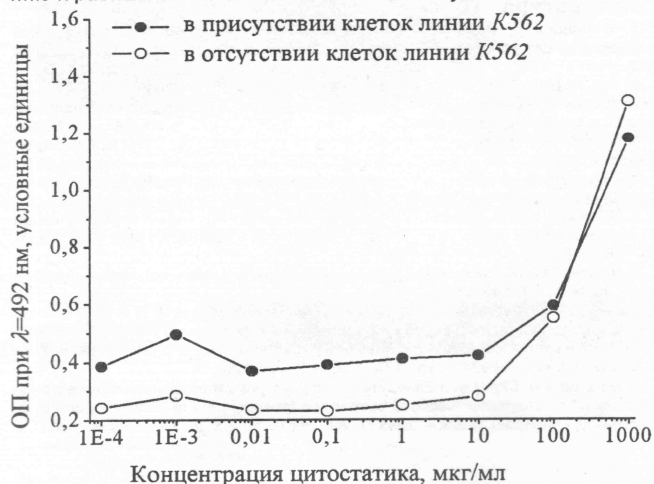


Рис. 1. Сравнение эффективности конверсии МТТ в формазан клетками линии К562 и МПК здоровых доноров

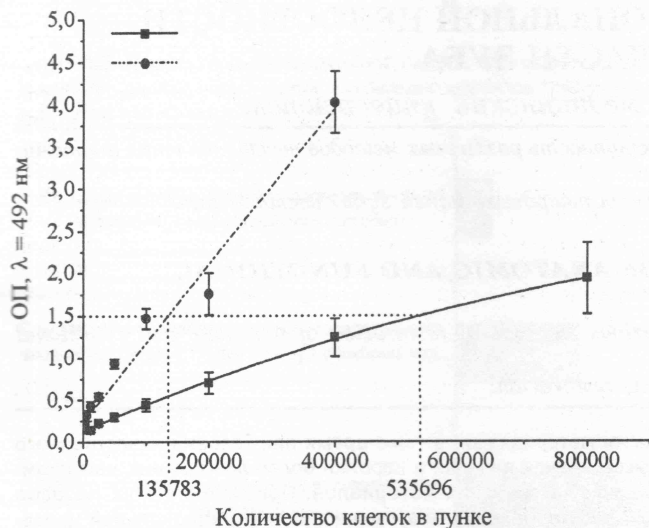


Рис. 2. Конверсия МТТ в формазан в присутствии противолейкозного лекарственного препарата N-гидроксикарбамида

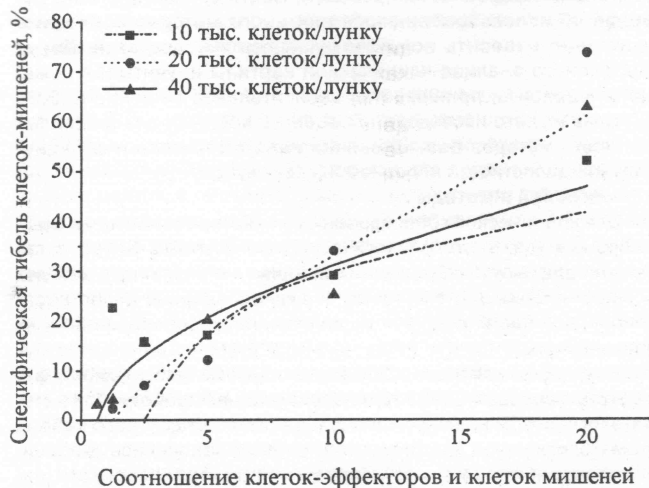


Рис. 3. Влияние концентрации клеток-мишеней (клетки линии К-562) на значение их специфической гибели, индуцированной МПК

ми в их метаболической активности.

Нелинейный регрессионный анализ полученных данных позволил установить, что зависимость количества образующегося формазана от числа жизнеспособных клеток для концентрации МТТ 0,5 мг/мл описывается линейной функцией только в диапазоне от 0 до 1,5 оптических единиц. При этом верхняя граница указанного диапазона для клеток линии К562 составляет 135,8 тыс. на лунку, а для МПК – 535,7 тыс. на лунку (рис. 1).

Таким образом, несмотря на то, что точность МТТ-теста повышается с увеличением количества клеток в лунке, это количество не должно превышать максимальное число клеток на лунку, определяемое границей диапазона линейной зависимости оптической плотности от концентрации жизнеспособных клеток.

На следующем этапе мы проверили влияние распространенных цитотоксических препаратов на эффективность конверсии МТТ в формазан. На существование такого влияния указывает анализ цитотоксического действия N-гидроксикарбамида на клетки К562 с помощью МТТ-теста: после 48 часов культивирования наблюдалась обратная зависимость между частотой специфической гибели лейкозных клеток и концентрацией цитостатика, а после 96 часов – прямая. Этот феномен мог быть объяснен как резистентностью клеток к препарату, так и нестабильностью МТТ в среде, содержащей N-гидроксикарбамида. Верификация данных МТТ-теста с помощью теста на исключение трипанового синего выявила высокую чувствительность клеток К562 к N-гидроксикарбамиду.

Дополнительные эксперименты по коинкубированию N-гидроксикарбамида и МТТ показали, что присутствие в среде N-гидроксикарбамида в концентрации 100 мкг/мл и более способствует спонтанному окислению МТТ (рис. 2). В дальнейшем нами была показана невозможность использования МТТ-теста и в исследованиях высоких концентраций других препаратов, в частности, таких как кверцетин, эпикатехин, байкалеин и фисетин, обладающих прооксидантными свойствами. В то же время, цитарабин и бусульфан даже при максимальных концентрациях (1 мг/мл и выше) не влияют на стабильность МТТ в растворе.

Таким образом, МТТ-тест имеет ограничения в исследованиях лекарственной цитотоксичности и не может быть использован для оценки цитотоксического действия препаратов, обладающих прооксидантными свойствами, так как в этом случае снижается его чувствительность и специфичность.

Оптимизация критических параметров МТТ-теста, предназначенного для оценки клеточной цитотоксичности. Ряд исследователей используют МТТ-тест для изучения естественной киллерной активности лимфоцитов периферической крови [3, 7], однако критические параметры такого теста (соотношение клеток-эффекторов и мишеней, число этих клеток на лунку и т. д.), которые могут влиять на конечный результат, при этом практически не обсуждаются и не изучаются. Для решения этой задачи мы использовали клеточную модель [К562]/[МПК], поскольку клетки линии К562 являются высокочувствительными мишенями для естественных киллерных клеток.

Основываясь на данных о чувствительности МТТ-теста, мы предположили, что его разрешающая способность при оценке специфической гибели клеток К562, индуцированной МПК, тем выше, чем больше лейкозных клеток вносится в лунки культуральной платы. Для проверки этой гипотезы мы провели сравнительный анализ частот специфической гибели клеток К562 при их различной концентрации и разном соотношении с МПК.

Согласно результатам МТТ-теста зависимость специфической гибели клеток К562 от их соотношения с МПК может быть описана функцией $y=A(x - B)^c$ (рис. 3). Хотя достоверных различий между сравниваемыми кривыми мы не получили, расчет минимального соотношения клеток К562 и МПК (параметр B в указанной функции), выше которого детектируется специфическая гибель лейкозных клеток, показал, что оно тем меньше, чем больше клеток линии К562 вносится в лунки платы. Аналогичные результаты нами были получены и при использовании в качестве клеток-мишеней свежeweделенных лейкозных клеток больных ХМЛ.

□ Оригинальная статья

Таким образом, учитывая эти данные, а так же данные о чувствительности МТТ-теста и диапазоне линейной зависимости между количеством жизнеспособных клеток и эффективностью конверсии ими МТТ в формазан, оптимальным соотношением лейкозных клеток линии К562 и МПК в данной экспериментальной модели является соотношение 1:20 при концентрации клеток-мишеней 2×10^4 на лунку.

Выводы

1. МТТ-тест позволяет выявить в одной лунке стандартной 96-луночной культуральной платы минимум 3 тыс. жизнеспособных лейкозных клеток линии К562 и 50 тыс. МПК.

2. Линейная зависимость между количеством таких клеток и эффективностью конверсии ими МТТ (изменением оптической плотности при 492 нм) сохраняется до 1,5 оптических единиц при максимальном количестве клеток К562 135,8 тыс. на лунку и МПК – 535,7 тыс. на лунку.

3. N-гидроксикарбамид при высоких концентрациях спонтанно окисляет МТТ до формазана. Исследование лекарственной цитотоксичности с помощью МТТ-теста требует предварительной проверки прямого влияния цитотоксического препарата на стабильность МТТ в растворе.

4. Разрешающая способность МТТ-теста, используемого для оценки клеточной цитотоксичности, зависит от количества

клеток-мишеней, вносимых в лунки 96-луночной платы, а также соотношения клеток-мишеней и клеток-эффекторов. Оптимальным соотношением лейкозных клеток линии К562 и МПК в изучаемой экспериментальной модели является соотношение 1:20 при концентрации клеток-мишеней 2×10^4 на лунку.

Литература

1. Шпакова А. П., Павлова К. С., Булычева Т. И. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток. // Клин. лаб. диагн. – 2000. – № 2. – С. 20-23.
2. Van de Loosdrecht A. A., Nennie E., Ossenkoppele G. J., Beelen R. H. et al. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. // J. Immunol. Meth. – 1991. – Vol. 141. – P. 15-22.
3. Nouri A. M. E., Mansouri M., Hussain R. F., Dos Santos A. V. L., Oliver R. T. D. Super-sensitive epithelial cell line and colorimetric assay to replace the conventional K562 target and chromium release assay for assessment of non-MHC-restricted cytotoxicity. // J. Immunol. Meth. – 1995. – Vol. 180 (1). – P. 63-68.
4. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // J. Immunol. Methods. – 1983. – Vol. 65 (1-2). – P. 55-63.
5. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. // J. Immunol. Meth. – 1990. – Vol. 130, № 1. – P. 149-151.
6. Van De Loosdrecht A. A., Beelen R. H. J., Ossenkoppele G. J. et al. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. // J. Immunol. Meth. – 1994. – Vol. 174 (1-2). – P. 311-320.
7. Qing-xia Niu, Cheng-yan Zhao, Zhi-an Jing. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. // J. Immunol. Meth. – 2001. – Vol. 251 (1-2). – P. 11-19.