УДК 577.1

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МТТ И РЕСАЗУРИНА

Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Клочков С.Г.

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, Черноголовка, e-mail: anikina1970@gmail.com

Проведено сравнительное исследование по определению жизнеспособности опухолевых клеток с помощью МТТ и ресазурина. Изучена антипролиферативная активность 10 модифицированных производных природного эпоксиалантолактона по отношению к опухолевым линиям клеток человека RD (рабдомиосаркома) и HCT116 (карцинома кишечника). Показано, что цитотоксический эффект сесквитерпеновых лактонов имеет выраженный дозозависимый характер, индивидуальный для каждого соединения. Обнаружено, что значение ингибирующей концентрации, определенное с участием МТТ, ниже, чем в случае ресазурина, и зависит от клеточной культуры. На примере изученных соединений установлено, что для рутинных скрининговых исследований на адгезионных культурах клеток актуальным является МТТ-тест. Однако при мультиплексной задаче исследования и при использовании суспензионных культур более предпочтительным становится метод с участием ресазурина в качестве прижизненного красителя.

Ключевые слова: жизнеспособность клеток, МТТ, ресазурин, сесквитерпеновые лактоны, эпоксиалантолактон, аминопроизводные, антипролиферативная активность

COMPARATIVE DEFINITION OF CELL VIABILITY BY MTT AND RESAZURIN

Anikina L.V., Pukhov S.A., Dubrovskaya E.S., Afanaseva S.V., Klochkov S.G.

Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, e-mail: anikina1970@gmail.com

In the present comparative study we investigated the viability of tumor cells lines by MTT and resazurin test methods. Have been examined the antiproliferative activity of 10 modified epoxyalantolactone natural derivatives against 2 human tumor cell lines: rhabdomyosarcoma RD and colorectal carcinoma HCT116. Shown that the cytotoxicity of sesquiterpene lactones has a marked dose-dependent individual effect for each tested compound. It`s found that the value of an inhibitory concentrations determined by MTT lower than in the case of using resazurin dye indncator. Furthermore this effect depends on the cell culture. By the example of tested substances have been determined that MTT is more relevant for routine screening against cells with adherent growth properties. However, resazurin may be used in multiplexing tasks (e.g. to measure both the cytotoxic effect of substances on cellular systems and cell-mediated cytotoxicity), as well this reduction equivalent more suitable for cells with suspension growth properties.

Keywords: cell viability, MTT, resazurin, sesquiterpene lactones, epoxyalantolactone, amino derivatives, antiproliferative activity

Под воздействием физиологически активных веществ клетки могут претерпевать изменения в морфологии, скорости клеточного роста, времени гибели и степени дезинтеграции, поэтому для каждого вещества, являющегося потенциальным фармакологическим агентом, необходимо выполнять оценку влияния на выживаемость клеток. Существуют различные методы определения цитотоксичности продуктов органического синтеза, природных соединений и экстрактов. Эти методы можно разделить на три группы:

1) измерение митохондриальной активности;

2) оценка выделения лактатдегидрогеназы или аденилаткиназы вследствие нарушения целостности цитоплазматической мембраны;

3) определение количества АТФ в клетках и активности киназы 3/7 как индикаторов клеточного некроза и апоптоза [14].

Первая группа методов особенно популярна в экспериментальных фармакологических исследованиях. Определение изменений в митохондриальной активности может быть определено с использованием МТТ (бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) и ресазурина (натриевой соли 7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксида) (рис. 1).

Метод МТТ, который был впервые описан Mosmann более 30 лет назад [15], широко используется как скрининговый метод измерения выживаемости клеток и включен в большинство протоколов методов молекулярной биологии и медицины [10; 7]. В его основе лежит реакция восстановления желтой соли тетразолия (МТТ) митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана, которые нерастворимы в водной среде обитания клеток. Кристаллы формазана (МТТ-ф) растворяют в ДМСО или в смеси

HCl-изопропанол и определяют колориметрически. Эта процедура убивает живые клетки, то есть МТТ-тест является конечной точкой исследования. Кроме того, метод определения цитотоксичности с помощью МТТ плохо реализуется при использовании суспензионных культур, так как подразумевает полное удаление среды культивирования на стадии растворения кристаллов формазана. Однако преимуществами данного метода является экономичность и отличная воспроизводимость результатов.

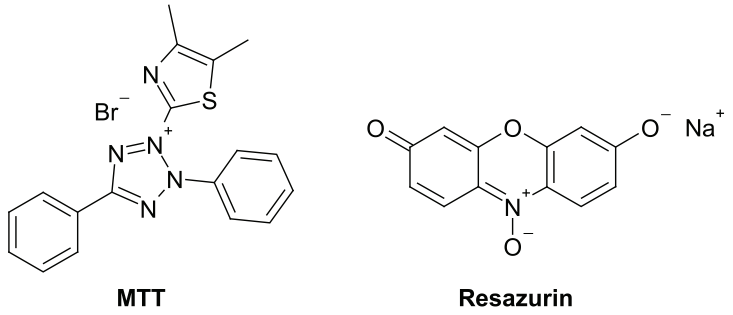

Рис. 1. Химические формулы использованных красителей

Ресазурин представляет собой водорастворимый прижизненный краситель, который используется с 1950-х годов для оценки бактериального и дрожжевого загрязнения биологических жидкостей и молока [9; 11]. Метод определения с его участием основан на способности живых клеток восстанавливать голубой нефлуоресцирующий ресазурин до розового флуоресцентного ресоруфина, который можно определить колориметрически или флуориметрически (последний способ более чувствителен) [4]. Ресазурин, в отличие от МТТ, восстанавливается более широким спектром ферментов: кроме митохондриальных дегидрогеназ его восстанавливают также цитохромы и дегидрогеназы, находящиеся в цитоплазме клетки [17]. Методологические особенности эксперимента с ресазурином позволяют использовать в исследовании суспензионные культуры и дают возможность в дальнейшем использовании культуры; то есть измерение выживаемости клеток при использовании ресазурина может быть первой, но не конечной, точкой эксперимента.

Целью данной работы является сравнение двух методов определения цитотоксичности – МТТ-теста и теста с участием ресазурина. Для решения задачи мы исследовали антипролиферативную активность 10 модифицированных производных природного эпоксиалантолактона по отношению к опухолевым линиям клеток человека RD (рабдомиосаркома) и HCT116 (карцинома кишечника).

Материалы и методы исследования

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования научным оборудованием для создания генно-модифицированных линий животных и изучения эффективности соединений на оригинальных клеточных и трансгенных моделях нейродегенеративных заболеваний человека.

Исследуемые соединения

В качестве исследуемых соединений нами были выбраны аминопроизводные природного сесквитерпенового лактона – эпоксиалантолактона (**1**), который является минорным вторичным метаболитом растения *Inula helenium* L. Сведения о препаративной наработке исходного соединения и последующем модифицировании были опубликовано нами ранее [2; 1]. Мы также показали, что производные **2–11**, сконструированные на основе эвдесманового сесквитерпенового лактона путем модифицирования рядом фармакофорных аминов, проявляют ингибирующую активность в отношении линии аденокарциномы молочной железы человека MCF7 [3]. Общая химическая структура исследуемых соединений приведена на рис. 2.

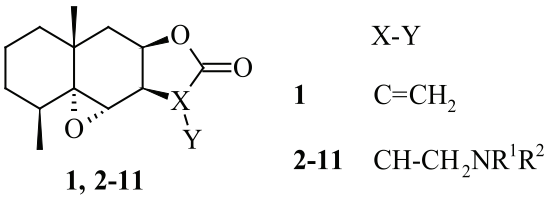

Рис. 2. Общая формула исследуемых соединений

Культуры клеток

Культуры клеток человека RD (ATCC® CCL-136™) и HCT116 (ATCC® CCL-247™) выращивали в среде DMEM (НПП ПанЭко) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone®, Thermo Scientific), 2мМ L-глутамина (НПП ПанЭко), 1 % гентамицина (ОАО Биохимик) в качестве антибиотика и инкубировали при 37 °C в атмосфере CO_2 (5 %).

Общая методика

Клетки сеяли в 96-луночный планшет (CELLTREAT™) в количестве $1 \cdot 10^4$ клеток/200 мкл и культивировали при 37 °C в атмосфере CO_2 (5 %). После 24 часов инкубации к культурам клеток были добавлены тестируемые соединения в различных концентрациях (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 и 1,56 мкМ),

и далее клетки культивировали в тех же условиях 48 часов. Для каждой концентрации эксперименты были выполнены в трех повторностях. Все вещества растворяли в ДМСО (PANREAC QUÍMICA S.L.U), конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 1 % и не была токсична для клеток. В контрольные лунки добавляли растворитель в количестве 1 %.

Определение цитотоксичности МТТ-тестом

Цитотоксичность синтезированных соединений была определена с помощью МТТ-теста [12]. После инкубации с соединениями в каждую лунку было добавлено 20 мкл МТТ (бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (5 мг/мл) (Sigma-Aldrich) и планшеты дополнительно инкубировали в течение 2 часов. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора (Victor^3, PerkinElmer) определяли оптическую плотность при 530 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм.

Определение цитотоксичности с помощью ресазурина

Цитотоксичность синтезированных соединений была определена по тесту Alamar Blue [16]. После инкубации с соединениями в каждую лунку было добавлено 22 мкл ресазурина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксида натриевой соли) (Sigma-Aldrich) с конечной концентрацией 50 мкМ. Планшеты инкубировали в течение 2 часов. Флуоресценцию восстановленного красителя определяли с помощью планшетного ридера (Victor^3, PerkinElmer) (возбуждение при 530 нм, эмиссия при 590 нм).

Значение концентрации, вызывающее 50 %-е ингибирование роста популяции клеток (IC_{50}), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Цитотоксический эффект сесквитерпеновых лактонов, определенный МТТ-тестом и с помощью ресазурина, по отношению к двум опухолевым линиям клеток человека имеет выраженный дозозависимый характер, индивидуальный для каждого соединения (рис. 3 и 4).

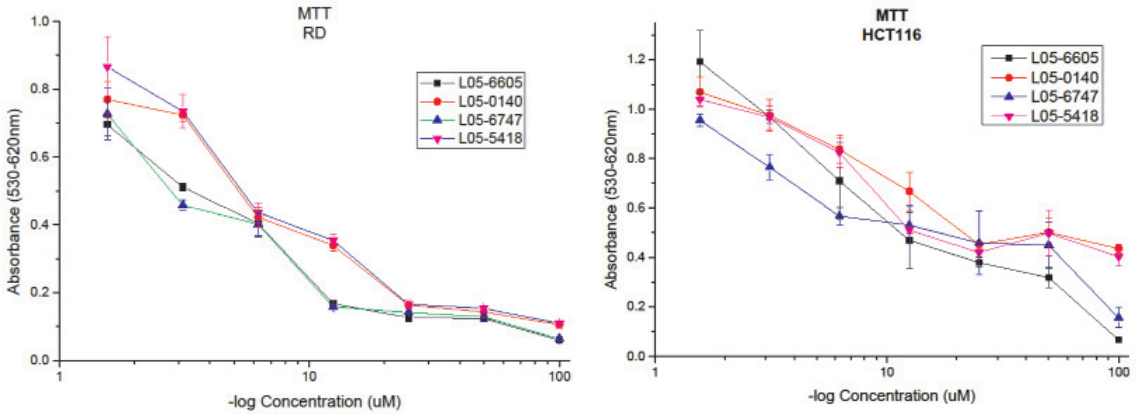

Рис. 3. Восстановление МТТ до МТТ-ф клетками RD и HCT116 при воздействии исследуемыми соединениями. Значения абсорбции представлены в относительных единицах. Для контроля (без соединений, 1 % ДМСО) значения для линий RD и HCT116 составляют 0,94 ± 0,05 и 1,03 ± 0,08 соответственно. Для приведенных данных отображены значения ± SD (n = 3)

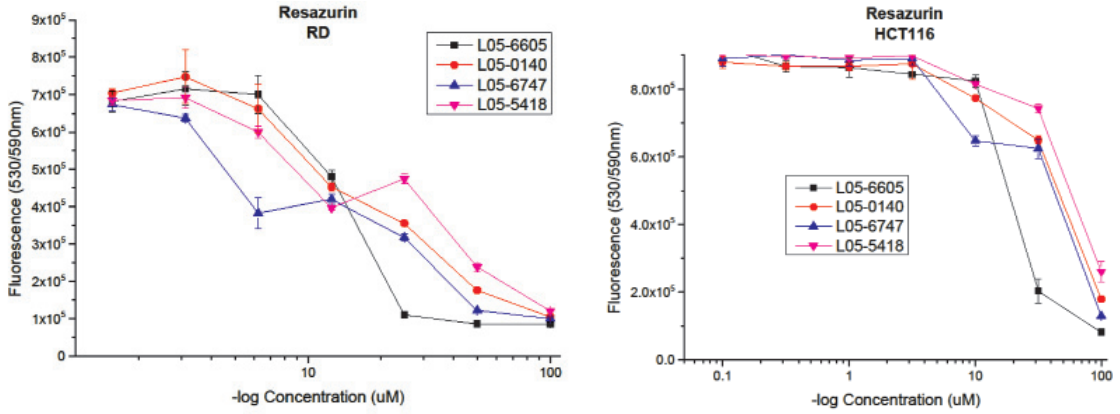

Рис. 4. Восстановление ресазурина до ресоруфина клетками RD и HCT116 при воздействии исследуемыми соединениями. Значения флуоресценции представлены в относительных единицах. Для контроля (без соединений, 1 % ДМСО) значения для линий RD и HCT116 составляют $6 \cdot 10^5 \pm 1 \cdot 10^4$ и $9 \cdot 10^5 \pm 2 \cdot 10^4$ соответственно. Для приведенных данных отображены значения ± SD (n = 3)

Проведенные исследования позволили определить эффективные концентрации соединений, вызывающие 50% ингибирование выживаемости клеток (IC_{50}). Значения IC_{50} всех тестируемых соединений приведены в таблице.

Значения IC_{50} (мкМ) модифицированных производных эпоксиалантолактона

Соединение	МТТ-тест		Тест с помощью ресазурина	
	RD	HCT116	RD	HCT116
L05-0003 (**2**)	12,79 ± 0,78	16,14 ± 1,82	46,69 ± 1,11	59,69 ± 0,30
L05-0619 (**3**)	17,07 ± 1,00	10,97 ± 0,41	43,19 ± 2,51	82,52 ± 2,10
L05-5272n (**4**)	24,94 ± 0,50	36,07 ± 0,82	33,38 ± 0,40	47,86 ± 1,50
L05-6640 (**5**)	11,94 ± 0,33	10,04 ± 1,64	44,94 ± 1,04	42,61 ± 1,87
L05-0218 (**6**)	18,10 ± 0,90	17,62 ± 0,06	36,12 ± 0,45	46,40 ± 1,78
L05-5702 (**7**)	18,04 ± 0,09	23,91 ± 6,17	70,29 ± 1,89	85,83 ± 6,96
L05-6605 (**8**)	4,21 ± 0,01	6,04 ± 0,09	21,36 ± 0,26	23,79 ± 0,32
L05-0140 (**9**)	5,38 ± 0,01	20,36 ± 0,42	37,65 ± 0,25	46,76 ± 0,58
L05-6747 (**10**)	2,86 ± 0,06	11,09 ± 1,83	35,85 ± 0,04	23,49 ± 1,34
L05-5418 (**11**)	5,54 ± 0,13	12,20 ± 0,05	51,10 ± 0,62	60,29 ± 0,86

Из таблицы видно, что в целом значение ингибирующей концентрации IC_{50}, полученное в результате использования МТТ, является более низким, чем полученное с помощью ресазурина. Разница между IC_{50} также варьируется в зависимости от клеточной культуры. В случае с культурой HCT116 она менее выражена и составляет от 1,3 раза (для соединения L05-5272n) до 7,5 раз (для соединения L05-0619). В случае с культурой RD она составляет от 1,3 раза (для соединения L05-5272n) до 12,5 раз (для соединения L05-6747).

Можно предположить, что полученная разница в значениях IC_{50} при использовании двух красителей является закономерной. Как было указано выше, ресазурин восстанавливается более широким спектром ферментов, чем МТТ. Кроме митохондриальных дегидрогеназ ресазурин восстанавливают также цитохромы и дегидрогеназы, находящиеся в цитоплазме клетки, а именно диафоразы [13; 5] и флавинредуктазы [8]. В то время как митохондриальная активность клеток угасает из-за проявления цитотоксичности соединений, цитоплазматические ферментные системы еще остаются в рабочем состоянии и определяются по восстановлению ресазурина. Более низкие значения IC_{50}, получаемые с помощью красителя МТТ, предпочтительнее при переходе на исследование специфической противоопухолевой активности и острой токсичности в моделях *in vivo*. Кроме того, из литературных данных следует, что МТТ-тест показывает бóльшую воспроизводимость результатов, оцениваемую по коэффициенту вариации и отношению сигнал/фон [6].

Таким образом, на примере 10 физиологически активных производных эпоксиалантолактона нами было проведено сравнительное определение цитотоксичности с использованием двух красителей. Было установлено, что для рутинных скрининговых исследований на адгезионных культурах клеток актуальным остается МТТ-тест. Однако при мультиплексной задаче исследования и при использовании суспензионных культур более предпочтительным становится метод с участием ресазурина в качестве прижизненного красителя.

Список литературы

1. Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Булычев Ю.Н., Неганова М.Е., Шевцова Е.Ф. Синтез и биологическая активность конъюгатов изоалантолактона с триптаминами / Изв. акад. наук. Сер. хим. – 2012. – № 2. – С. 407– 412.

2. Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Ерматова А.Б., Чудинов А.В. Модификация алантолактонов природными алкалоидами / Хим. прир. соед. – 2011. – № 5. – С. 630–637.

3. Пухов С.А., Неганова М.Е., Аникина Л.В., Шевцова Е.Ф., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Ингибирование роста клеток аденокарциномы молочной железы эпоксиалантолактоном и его производными / Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9. – С. 1988–1992

4. Ahmed S.A., Gogal R.M., Walsh J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay // J. Immunol. Meth. – 1994. – Vol. 170, № 2. – P. 211–224.

5. Belinsky M., Jaiswal A.K. NAD(P)H: quinine oxidoreductase1DT-diaphorase expression in normal and tumor tissues // Cancer Metastasis Rev. – 1993. – Vol.12, № 2. – P. 103–117.

6. Boncler M., Różalski M., Krajewska U., Podsędek A., Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assay of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells // J. Pharmacol. Toxicol. Meth. – 2014. – Vol. 69, № 1. – P. 9–16.

7. Cancer cell culture: methods and protocols / Ser. Methods in Molecular Medicine. Vol. 88. (Ed. S.P. Langdon) // Totowa, NJ: Humana Press, 2003. 165-169 p.

8. Chikuba K., Yubisui T., Shirabe K., Takeshita M. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA of the human erythrocyte NADPH-flavin reductase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – Vol. 198, № 3. – P. 1170–1176.

9. Erb R.E., Ehlers M.N. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity // J. Dairy Sci. – 1950. – Vol. 33, № 12. – P. 853–864.

10. In vitro toxicity testing protocols / Ser. Methods in Molecular Biology. (Eds S.O'Hare, C.K. Atterwill). // Totowa. – NJ: Humana Press, 1995. – Vol. 43. – P. 138–149.

11. Liu D. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity // Bull. Environ. Contam. Toxic. – 1981. – Vol. 26, № 1. – P. 145–149.

12. Mather J.P., Roberts P.E. Introduction to cell and tissue culture. Theory and technique. – New York: Plenum Press, 1998. – P. 175–194.

13. Matsumoto K., Yamada Y., Takahashi M., Todoroki T., Mizoguchi K., Misaki H., Yuki H. A fluorometric flow-injec fluorometric determination of carnitine in serum with immobilized carnitine dehydrogenase and diaphorase // Clin. Chem. – 1990. – Vol. 36, № 12. – P. 2072–2076.

14. Miret S., De Groene E.M., Klaffke W. Comparison of in vivo assay of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2 // J. Biomol. Screen. – 2006. – Vol. 11, № 2. – P. 184–193.

15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // J. Immunol. Meth. – 1983. – Vol. 65, № 1–2. – P. 55–63.

16. O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267, № 17. – P. 5421–5426.

17. Rampersad S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays // Sensors. – 2012. – Vol. 12, № 9. – P. 12347–12360.

References

1. Klochkov S.G., Afanas'eva S.V., Bulychev Yu.N., Neganova M.E., Shevtsova E.F.. Synthesis and biological activity of isoalantolactone-tryptamine conjugates / Rus. Chem. Bull., Int. Ed. 2012. Vol. 61, no 2. pp. 409–415.

2. Klochkov S.G., Afanas'eva S.V., Ermatova A.B., Chudinov A.V. Modification of alantolactones by natural alkaloids / Chem. of Nat. Comp. 2006. Vol. 47, no 5. pp. 716–725.

3. Pukhov S.A., Neganova M.E., Anikina L.V., Shevtsova E.F., Afanasyeva S.V., Klochkov S.G. Epoxyalantolactone and its derivatives inhibit the growth of mammary gland adenocarcinomas / Fundamental Researches. 2014. no 9. pp. 1988–1992.

4. Ahmed S.A., Gogal R.M., Walsh J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [^{3}H]thymidine incorporation assay. J. Immunol. Meth. 1994. Vol. 170, no 2. pp. 211–224.

5. Belinsky M., Jaiswal A.K. NAD(P)H: quinine oxidoreductase1DT-diaphorase expression in normal and tumor tissues. Cancer Metastasis Rev. 1993. Vol. 12, no 2. pp 103–117.

6. Boncler M., Różalski M., Krajewska U., Podsędek A., Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assay of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 2014. Vol. 69, no 1. pp. 9–16.

7. Cancer cell culture: methods and protocols / Ser. Methods in Molecular Medicine. Vol. 88. (Ed. S.P. Langdon). Totowa, NJ: Humana Press, 2003. 165-169 p.

8. Chikuba K., Yubisui T., Shirabe K., Takeshita M. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA of the human erythrocyte NADPH-flavin reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. Vol. 198, no 3. pp. 1170–1176.

9. Erb R.E., Ehlers M.N. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity. J. Dairy Sci. 1950. Vol. 33, no 12. pp. 853–864.

10. In vitro toxicity testing protocols / Ser. Methods in Molecular Biology. Vol. 43. (Eds S.O'Hare, C.K. Atterwill). Totowa, NJ: Humana Press, 1995. pp. 138–149.

11. Liu D. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. Bull. Environ. Contam. Toxic. 1981. Vol. 26, no 1. pp. 145–149.

12. Mather J.P., Roberts P.E. Introduction to cell and tissue culture. Theory and technique. New York: Plenum Press, 1998. pp. 175–194.

13. Matsumoto K., Yamada Y., Takahashi M., Todoroki T., Mizoguchi K., Misaki H., Yuki H. A fluorometric flow-injec fluorometric determination of carnitine in serum with immobilized carnitine dehydrogenase and diaphorase. Clin. Chem. 1990. Vol. 36, no 12. pp. 2072–2076.

14. Miret S., De Groene E.M., Klaffke W. Comparison of in vivo assay of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. J. Biomol. Screen. 2006. Vol. 11, no 2. pp. 184–193.

15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Meth. 1983. Vol. 65, no 1–2. pp. 55–63.

16. O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur. J. Biochem. 2000. Vol. 267, no 17. pp. 5421–5426.

17. Rampersad S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors. 2012. Vol. 12, no 9. Ъpp. 12347– 12360.

Рецензенты:

Григорьев В.В., д.б.н., заведующий лабораторией нейрорецепции, ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка;

Серков И.В., д.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории специального органического синтеза, ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка.

Работа поступила в редакцию 27.12.2014.