

Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность

А.Н. Афанасьева, младший научный сотрудник, ORCID: 0000-0002-1443-4294,
В.Б. Сапарова, научный сотрудник, ORCID: 0000-0002-8445-1129,
Т.А. Сельменских, исследователь, ORCID: 0000-0001-7073-311X,
И.Е. Макаренко, руководитель медицинского департамента, ORCID: 0000-0003-2308-0608
ЗАО «Фарм Холдинг»
198515, Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34, литер А
E-mail: alina.afanaseva@geropharm.com

Резюме. Исследования жизнеспособности проводятся для измерения доли жизнеспособных клеток после воздействия на них вещества, лекарственного средства или манипуляции, например, в исследованиях цитотоксичности или пролиферативной активности, после криохранения или клеточного разделения и т.д. В этих исследованиях любые изменения *in vitro* могут быть интерпретированы для предсказания ответа *in vivo* таких же или похожих клеток. Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) поддерживает внедрение принципов 3Rs – заменять, сокращать и усовершенствовать – для этического использования животных при тестировании лекарств. Данная статья выполнена с соблюдением принципа 3Rs и не содержит описания каких-либо исследований животных в качестве объектов.

В настоящее время для оценки жизнеспособности клеток существует несколько методов, основанных на различных биохимических процессах, происходящих внутри клетки. Такие методы могут включать как прямое детектирование АТФ, так и определение активности митохондриальных дегидрогеназ. Выбор используемого в исследовании метода будет зависеть от изучаемого агента, природы предполагаемого ответа, клеток-мишеней, в частности, варибельности данных, применимых в каждом конкретном случае.

Цель данного исследования – проведение сравнительного анализа 3 следующих распространенных методов определения жизнеспособности клеток:

- ☞ МТТ-тест;
- ☞ анализ живых клеток с использованием резазурина;
- ☞ люминесцентный анализ CellTiter-Glo®.

Материал и методы. Выбранные методы определения жизнеспособности: МТТ-тест, анализ живых клеток с использованием резазурина, люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®. В качестве клеточных линий использовали различные линии по типу роста культуры клеток: адгезионная (СНО-K1 – клетки яичников китайского хомячка) и смешанная (3D clone 3 – клетки костного мозга мыши). Параметры оценки: определение чувствительного диапазона концентраций клеток и коэффициента вариации (CV) внутри каждой концентрации.

Результаты. По результатам исследования наиболее чувствительным, имеющим низкие показатели варибельности в диапазоне концентраций и соответственно наиболее оптимальным, оказался анализ живых клеток с использованием резазурина и люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®.

Ключевые слова: жизнеспособность клеток, МТТ-тест, формазан, соль тетразолия, резазурин, резорурфин, люминесцентный анализ, аденозинтрифосфат, люцифераза светлячка СНО-K1, 3D clone 3.

Для цитирования: Афанасьева А.Н., Сапарова В.Б., Сельменских Т.А., Макаренко И.Е. Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2021; 2: 16–24. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-02-03>

Optimal choice method of detection of the viability of cell cultures for tests on proliferation and cytotoxicity

A.N. Afanaseva, Jr. research assistant, ORCID: 0000-0002-1443-4294,
V.B. Saparova, Research associate, ORCID: 0000-0002-8445-1129,
T.A. Selmenskikh, Research worker, ORCID: 0000-0001-7073-311X,
I.E. Makarenko, Head of the Medical Department, ORCID: 0000-0003-2308-0608
«Pharm-Holding»,
34 A Svyazi Street, Strelna, Saint-Petersburg, 198515, Russia
E-mail: alina.afanaseva@geropharm.com

Abstract. Viability studies are carried out to measure the proportion of viable cells after exposure to a substance, drug or manipulation, for example, in studies of cytotoxicity or proliferative activity, after cryostorage or cell division, and etc. In these studies, any *in vitro* changes can be interpreted to predict the *in vivo* response of the same or similar cells. The European Medicines Agency (EMA) supports the implementation of the so-called 3Rs principles – replace, reduce and refine – for the ethical use of animals in medicine testing. This article has been written in compliance with the 3Rs principle and does not describe any studies of animals as objects.

Currently, there are several methods for assessing the viability of cells, based on various biochemical processes taking place inside the cell. These methods can include both direct detection of ATP and determination of the activity of mitochondrial dehydrogenases. The choice of the method used in the study will depend on the agent being studied, the nature of the expected response, on the target cells, and, in particular, on the variability of the data applicable in each case.

The aim of this study was to perform a comparative analysis of three common methods for determining cell viability: MTT test, analysis of living cells using resazurin, and CellTiter-Glo® luminescence analysis.

Material and methods. Selected methods for determining viability: MTT test, analysis of living cells using resazurin, luminescence analysis of cell viability CellTiter-Glo®. As cell lines, various lines were used according to the type of cell culture growth: adherent (CHO-K1 – Chinese hamster ovary cells) and mixed, adherent and suspension (32D clone 3 – mouse bone marrow cells). Evaluation parameters were determination of the sensitive range of cell concentrations and the coefficient of variation (CV) within each concentration.

Results. According to the results of the study, the most sensitive, having low levels of variability in the concentration range and, accordingly, the most optimal, were the methods – analysis of living cells using resazurin and luminescent analysis of cell viability CellTiter-Glo®.

Key words: Ecell viability, MTT test, formazan, tetrazolium salt, resazurin, resorufin, luminescence analysis, adenositriphosphate firefly luciferase CHO-K1, 32D clone 3.

For citation: Afanaseva A.N., Saparova V.B., Selmenskikh T.A., Makarenko I.E. Optimal choice method of detection of the viability of cell cultures for tests on proliferation and cytotoxicity. *Laboratory Animals for Science*. 2021; 2: 16–24. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-02-03>

Введение

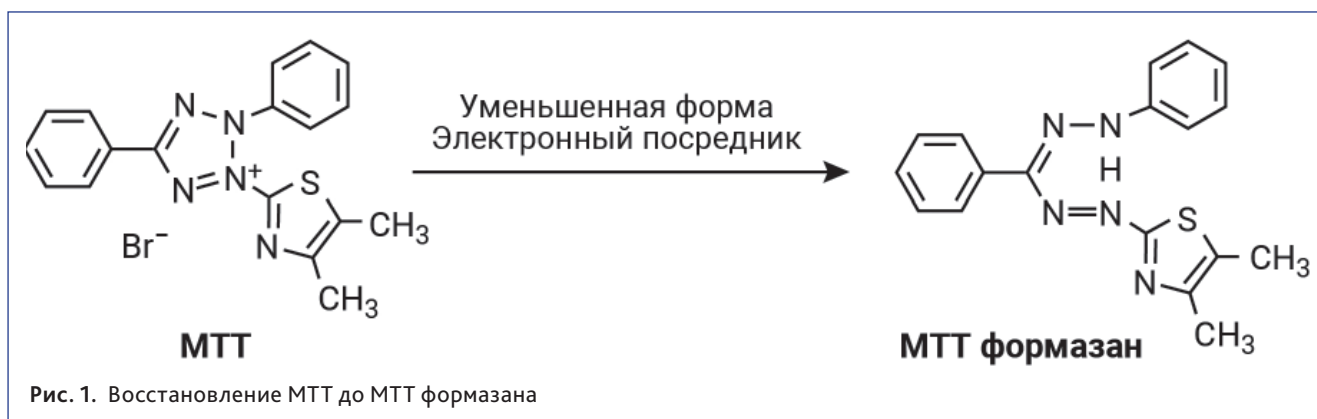
В настоящее время как альтернативная замена использования животных моделей широко применяются методы *in vitro*, что позволяет снизить количество тестируемого вещества, ускоряет анализы и в последующем снижает общую стоимость лекарственного средства [1]. Одним из основных цитологических тестов является определение жизнеспособности (предназначен для прогнозирования выживаемости) и пролиферации (определение динамических свойств клеточной культуры), которое применяется для большого количества химических веществ [2]. Жизнеспособность клеток – это количество живых клеток, присутствующих в образце (с губительным или обратным действием), а под пролиферацией клеток понимают механизм действия определенных генов, белков и биохимических процессов, вовлеченных в выживание, или гибель клеток после воздействия токсичных агентов. Обычно методы, используемые для определения жизнеспособности, также являются общими для обнаружения пролиферации клеток.

Существует множество методов анализа жизнеспособности, основанных на различных процессах, протекающих в клетках, таких как активность ферментов, проницаемость клеточной мембраны, адгезия клеток, продукция АТФ, производство коэнзимов и активность поглощения

нуклеотидов. Эти методы могут быть по большей части классифицированы на различные категории: методы исключения красителей, например 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) [3]. Однако в связи с трудоемкостью и/или большой погрешностью измерения не все перечисленные методы широко применяются для анализа лекарственных препаратов.

В проведенном исследовании использовали 2 наиболее распространенных в лабораторной практике метода определения жизнеспособности клеток, включенных в большинство протоколов молекулярной биологии и медицины [4, 5] – МТТ-тест и анализ живых клеток с использованием резазурина, которые относятся ко II группе методов в приведенной выше классификации, и один модифицированный: анализ жизнеспособности клеток с применением набора CellTiter-Glo®, который относится к III группе (анализ количества АТФ).

МТТ-анализ включает превращение водорастворимого желтого красителя [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид], который при восстановлении дегидрогеназой и восстанови-



телями, присутствующими в метаболически активных клетках, дает нерастворимый в воде пурпурный формазан [4, 6, 7] (рис. 1).

Липидорастворимый продукт формазан может быть экстрагирован органическими растворителями и оценен с помощью спектрофотометрии. Метод с самого начала подразумевался в качестве анализа жизнеспособности культивируемых клеток [8]. На общедоступном ресурсе PubMed часто встречаются статьи, в которых описано, что местами восстановления и образования осадка формазана являются митохондрии и митохондриальная сукцинатдегидрогеназа жизнеспособных клеток восстанавливает МТТ до соответствующего формазана [9–12]. Однако встречаются статьи, в которых описано, что формазан также может локализоваться в липидных каплях клеток [13, 14].

Резазурин представляет собой водорастворимый краситель, который используется в лабораторной практике с 1950-х годов для оценки дрожевой и бактериальной контаминации молока [15]. В отличие от МТТ, резазурин восстанавливается более широким спектром ферментов, кроме митохондриальных дегидрогеназ, его способны восста-

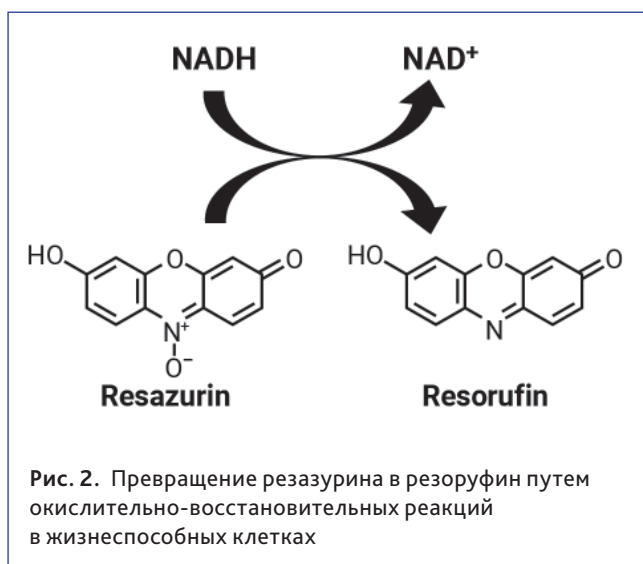
навливать также цитохромы и дегидрогеназы, локализованные в цитоплазме клеток [16].

Резазурин проницаем для клеток и практически не флуоресцентен. При попадании в клетки резазурин восстанавливается до резорурфина благодаря активности клеточных окислительно-восстановительных ферментов (рис. 2), принимая электроны от NADPH, FADH₂, FMNH₂, NADH и цитохромов [17, 18].

Данная реакция сопровождается изменением цвета от синего индиго до яркого флуоресцентного красного, который диффундирует из клеток в культуральную среду. Жизнеспособные клетки непрерывно превращают резазурин в резорурфин, тем самым генерируя количественную меру жизнеспособности клеток. Жизнеспособные клетки с активным метаболизмом могут преобразовать резазурин в резорурфиновый продукт, который является розовым или красновато-фиолетовым и флуоресцентным [19]. Основные преимущества анализа восстановления резазурина состоят в том, что он относительно недорогой, используется в гомогенном формате и более чувствительный, чем анализы, использующие тетразолии (например, МТТ-тест).

Метод, который использует содержание АТФ в качестве маркера наряду с МТТ-тестом, широко распространен для оценки жизнеспособности клеток. Когда клетки теряют целостность мембраны, они не способны синтезировать АТФ, а эндогенные АТФазы быстро истощают любую оставшуюся АТФ из цитоплазмы.

В исследовании применялся набор для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo[®] производства Promega. В данном наборе была модифицирована люцифераза для получения ее более стабильных молекул [19]. Стабильная форма люциферазы, как заявляет производитель, позволяет генерировать стабильный люминесцентный сигнал, одновременно ингибируя эндогенные ферменты, высвобождаемые во время лизиса клеток



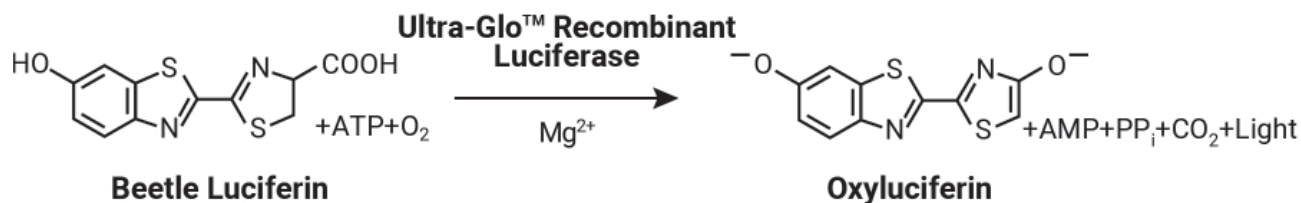


Рис. 3. Люциферазная реакция. Моноксигенация люциферина катализируется люциферазой в присутствии Mg²⁺, АТФ и молекулярного кислорода

(например АТФазы) [20]. Схема люциферазной реакции представлена на рис. 3.

Анализ АТФ является самым быстрым в использовании при определении жизнеспособности клеток, наиболее чувствителен и менее подвержен артефактам, чем другие методы анализа жизнеспособности. Люминесцентный сигнал достигает устойчивого состояния и стабилизируется в течение 10 мин после добавления реагента. Преимущество анализа АТФ заключается в отсутствии необходимости длительно инкубировать популяцию жизнеспособных клеток для превращения субстрата (такого как тетразолий или резазурин) в окрашенное соединение [19].

Материал и методы

Культивирование клеток линии CHO-K1. Клетки яичников китайского хомячка линия CHO-K1 (АТСС «Американская коллекция клеточных культур», США) выращивали во флаконах для культивирования в среде, состоящей из смеси Ham's F12 (Biosera, Франция) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Cargisogn, Польша) и смеси антибиотиков пенициллина G – 50 000 ед/фл, стрептомицина – 50 мкг/фл (Биолот, Россия) – 1 флакон на 450 мл среды при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В экспериментах использовали клетки 3–7 пассажей.

Культивирование клеток линии 32D clone 3. Клетки костного мозга мыши линии 32D clone 3 (АТСС «Американская коллекция клеточных культур», США) выращивали во флаконах для культивирования в среде, состоящей из смеси RPMI1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Cargisogn, Польша), 5 нг/мл интерлейкина-3 (IL-3, Sigma-Aldrich, США) и смеси антибиотиков пенициллина G – 50 000 ед/фл, стрептомицина – 50 мкг/фл (Биолот, Россия) – 1 флакон на 450 мл среды, инкубация проведена при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В экспериментах использовали клетки 3–7 пассажей.

Тест на жизнеспособность (МТТ-тест). Клетки CHO-K1 культивировали в 96-луночных планшетах

(Eppendorf, Германия) в объеме 100 мкл в концентрациях 5–50 тыс. клеток на 1 лунку. В качестве нулевого контроля использовали полную питательную среду, по 8 повторов (лунок планшета) для каждой посевной концентрации. Планшет инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 24±4 ч. Затем вносили в каждую лунку (в объеме 1:10) по 10 мкл 0,5% раствора красителя МТТ (Sigma-Aldrich, США). Инкубировали в тех же условиях в течение 2 ч (5% CO₂, 37°C). Затем аккуратно удаляли надосадочную жидкость из лунок и добавляли по 100 мкл ДМСО. Растворяли формазан в течение 20 мин при 250 об/мин на орбитальном термостатируемом шейкере ELMi Skyline ST-3L (Латвия) при комнатной температуре и далее измеряли оптическую плотность при 570 нм на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) с дальнейшим анализом данных в программе прибора MARS Data Analysis и статистическим анализом в программе GraphPad Prism 8.

Тест на жизнеспособность (анализ живых клеток с использованием резазурина). Клетки CHO-K1 и 32D clone 3 культивировали в 96-луночных планшетах (Sigma-Aldrich, США) по 100 мкл в концентрациях 5–50 тыс. клеток на 1 лунку. В качестве нулевого контроля использовали полную питательную среду, по 8 повторов (лунок планшета) для каждой посевной концентрации. Для CHO-K1 – Ham's F12 + 10% FBS, а для 32D clone 3 – RPMI1640 + 10% FBS + 5 нг/мл IL-3. Планшет инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 24±4 ч. Затем вносили в каждую лунку раствор красителя резазурина («Sigma-Aldrich», США) с конечной концентрацией в лунке 11,2 мкМ/мл в объеме, равном 10% от общего объема культуральной жидкости. Инкубировали в тех же условиях в течение 4 ч (5% CO₂, 37°C). После встряхивали на орбитальном шейкере в течение 2 мин при 37°C и далее измеряли уровень флуоресценции при длине волны 590 нм с использованием длины волны возбуждения 560 нм на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) с дальнейшим анализом данных в программе при-

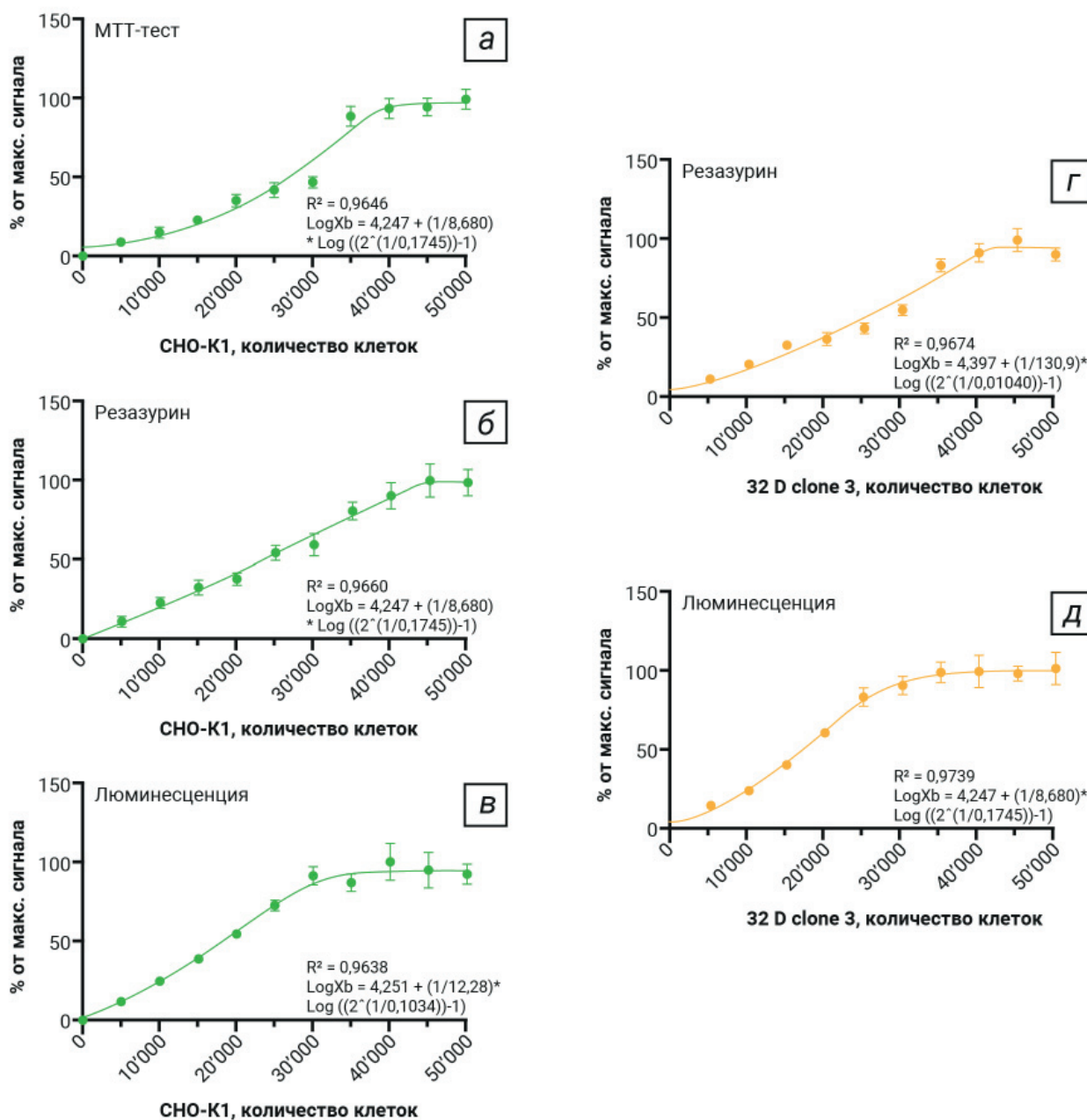


Рис. 4. Тесты определения жизнеспособности для культур клеток СНО-К1 и 32D clone 3. На представленных графиках (а, б, в, г) указаны формулы калибровочных кривых и значения R^2

бора MARS Data Analysis и статистическим анализом в программе GraphPad Prism 8.

Тест на жизнеспособность (люминесцентный анализ). Клетки СНО-К1 и 32D clone 3 культивировали в 96-луночных планшетах (Sigma-Aldrich, США) по 100 мкл в концентрациях 5–50 тыс. клеток на лунку. В качестве нулевого контроля использовали полную питательную среду. Для СНО-К1 это Ham's F12 + 10% FBS, а для 32D clone 3 – RPMI1640 + 10% FBS + 5 нг/мл IL-3. Планшет инкубировали при 37°C в 5%

CO₂ в течение 24±4 ч. Затем остужали планшеты до комнатной температуры с клетками в течение 1ч и вносили в каждую лунку реагент CellTiter-Glo в эквивалентном соотношении с культуральной жидкостью. Затем клетки лизировали механически на орбитальном шейкере в течение 2 мин при комнатной температуре. Затем инкубировали планшеты в течение 10 мин для стабилизации люминесцентного сигнала, после чего регистрировали люминесценцию на мультимодальном микропланшетном

ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) с дальнейшим анализом данных в программе прибора MARS Data Analysis и статистическим анализом в программе GraphPad Prism 8. Настройки на приборе включали Presets Ultra Glo, время интегрирования – 0,4 с на 1 лунку.

Анализ данных и статистический анализ. Основными показателями, при которых ориентировались в данном исследовании, были коэффициент вариации (coefficient of variation – CV), окно теста (Assay Window – AW) [21] и соотношение сигналов (Signal/Previous Ratio – SPR). Первичный анализ данных проводили, используя программное обеспечение прибора CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) MARS Data Analysis Software 3.01 R2. Полученные результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения Prism 8 (GraphPad Software, США).

Результаты

При обработке данных использовали показатели CV, SPR, AW и регрессионный анализ. CV показывает степень изменчивости по отношению к среднему показателю выборки [22]. Приемлемыми результатами считали, где $CV \leq 20\%$. SPR отражает процентное отношение сигнала каждой последующей концентрации клеток к предыдущей с поправкой на коэффициент вариации для определения чувствительного диапазона концентрации клеток в методике. Чувствительный диапазон методики определяется при значениях $SPR > 5\%$. AW – это процентное отношение максимальных и минимальных значений отклика, но без учета изменчивости сигнала. Окно теста можно считать приемлемым, если значение $> 30\%$. В регрессионном анализе рассматривали показатель R^2 (коэффициент корреляции), за приемлемый результат принимали значения 0,95 и более. Для всех проведенных тестов результаты соответствуют критериям приемлемости (рис. 4, табл. 1 и 2).

Метод с применением МТТ-теста плохо реализуется при использовании суспензионных или смешанных культур, так как подразумевает полное удаление среды культивирования на стадии растворения кристаллов формазана, данную проблему можно решить, осаждая клетки с помощью центрифугирования непосредственно в планшетах при наличии необходимого ротора. Клетки 32D clone 3 имеют смешанный тип роста и при отсутствии ротора для планшетов в тесте использовали только адгезивную клеточную линию CHO-K1, которую рас-

севали в концентрациях 5–50 тыс. клеток на 1 лунку. Инкубировали 24 ч и затем проводили измерение оптической плотности.

Результаты показали приемлемые значения $CV \leq 20\%$, значение AW составляло 21,7, для SPR положительные результаты были в сравнении концентрации клеток 0 и 5, 10 и 15, 30 и 35 тыс. При построении стандартной кривой наиболее подходящей стала асимметричная логистическая 5-параметрическая кривая, где при R^2 в значении 0,9638 выявлена линейная зависимость, при этом $R^2 = 0,9646$.

Оценку жизнеспособности методом окрашивания резазурином проводили на двух клеточных линиях CHO-K1 и 32 D clone 3, их рассеивали в концентрациях от 5–50 тыс. клеток на 1 лунку. Инкубировали 24 ч, добавляли раствор резазурина, на 4 ч оставляли в CO₂-инкубаторе и затем считывали флуоресценцию. Инкубационный период, необходимый для получения адекватного флуоресцентного сигнала выше фонового, обычно составляет от 1 до 4 ч и зависит от метаболической активности конкретного типа клеток, плотности клеток на лунку и других условий анализа, включая тип культуральной среды [19]. Соответственно инкубационный период должен быть оптимизирован и относительно коротким, чтобы избежать токсичности реагента, но в то же время достаточный, чтобы обеспечить адекватную чувствительность. В эксперименте для CHO-K1 результаты показали завышенный сигнал в фоновых лунках, где присутствовала только культуральная среда, для линии 32D clone 3 фоновый сигнал был гораздо ниже, значения коэффициента вариации в 2 тестах не превышали 20%, AW для линии CHO-K1 2% (высокий фоновый сигнал) и 40,7% для 32D clone 3. SPR для CHO-K1 доходит до 5% в концентрации клеток 0 и 5, 5 и 10 тыс.; для 32D clone 3 в концентрациях 0 и 5, 5 и 10, 10 и 15 тыс., 30 и 35 тыс. клеток – превышает 5%. Максимальное отличие SPR между концентрациями 0 и 5 тыс. клеток – 5% для CHO-K1 и 36% для 32D clone 3. При построении стандартной кривой выявлена линейная зависимость, где R^2 в значении 0,9582 для CHO-K1 и 0,9674 для 32D clone 3.

Жизнеспособность методом люминесцентного анализа проводили на двух клеточных линиях CHO-K1 и 32 D clone 3, их рассеивали в концентрациях от 5–50 тыс. клеток на 1 лунку. Инкубировали 24 ч, добавляли реагент CellTiter-Glo, 2 мин лизировали клетки и 10 мин стабилизировали сигнал, затем смотрели люминесценцию. Результаты продемонстрировали CV

Таблица 1. Основные показатели определения чувствительности метода в тестах жизнеспособности для CHO-K1

Клетки, тыс./лунка	МТТ-тест, AW = 21,7%		Резазурин, AW = 2,4%		Люминесценция, AW = 2894,4%	
	SPR, %	CV, %	SPR, %	CV, %	SPR, %	CV, %
0	n/a	15	n/a	3	n/a	35
5	5	16	5	3	5337	7
10	3	35	5	3	21	5
15	3	23	2	5	15	4
20	0	17	2	3	14	3
25	1	26	4	4	7	5
30	0	12	1	5	5	6
35	2	9	4	4	-1	7
40	1	14	1	5	1	12
45	2	21	1	6	-1	12
50	0	19	0	5	-1	8

Примечание. Здесь и в табл.2: AW – окно теста; SPR – соотношение сигналов (Signal / Previous Ratio); CV – коэффициент вариации; n/a – не применимо.

Таблица 2. Основные показатели определения чувствительности метода в тестах жизнеспособности для 32D clone 3

Клетки, тыс./лунка	Резазурин, AW = 40,7%		Люминесценция, AW = 2502,5%	
	SPR, %	CV, %	SPR, %	CV, %
0	n/a	16	n/a	16
5	36	15	3577	9
10	7	9	19	4
15	10	5	15	5
20	1	9	26	2
25	2	7	6	7
30	3	8	1	6
35	7	8	1	7
40	1	7	0	11
45	0	8	0	5
50	-1	7	0	10

не более 20%, AW для CHO-K1 2894,4% и для 32D clone 3 2502,5%. Происходит увеличение сигнала при каждой последующей концентрации клеток (SPR) как для 32D clone 3, так и для CHO-K1. Максимальное отличие SPR между концентрациями 0 и 5 тыс. клеток – 5337% для CHO-K1 и 3577% для 32D clone 3. При построении стандартной кривой выявлена асимметричная логистическая пятипараметрическая кривая, где R2 в значении 0,9638 для CHO-K1 и 0,9739 для 32D clone 3.

Обсуждение

МТТ-тест является надежным методом, но различается по манипуляциям для адгезионных, суспензионных и смешанных культур, менее чувствительный в сравнении с методом окрашивания резазурином и является более длительным по времени исполнения из-за дополнительного этапа растворения кристаллов.

Метод окрашивания резазурином является более чувствительным, чем анализы с использованием тетразолия, имеет низкую вариабельность и в случае

32D clone 3 окно теста >30%. Однако в тесте для СНО-K1 зарегистрирован завышенный сигнал в фоновых лунках, что может говорить о присутствующих в культуральной среде компонентах, которые мешают адекватному определению жизнеспособности у данной культуры. Метод более простой в исполнении, по сравнению с МТТ-тестом, так как необходимо только внести раствор резазурина и оставить инкубировать клетки, после чего остается измерить флуоресценцию.

Люминесцентный анализ со стабильной люциферазой показал наибольший диапазон чувствительности. Данный метод может уловить сигнал от клеток в количестве меньшем, чем 5000 клеток/лунка, что говорит о возможности обнаружения клеток, число которых ниже пределов обнаружения стандартных колориметрических и флуориметрических анализов. Данный анализ является гомогенным и самым быстрым среди трех использованных методов.

Заключение

Из всех 3 тестов, проведенных на 2 отличных друг от друга культурах клеток, наиболее чувствительными можно назвать методы окрашивания резазурином и люминесцентный анализ.

Вклад авторов

А.Н. Афанасьева – существенный вклад в концепцию или дизайн работы; сбор, анализ или интерпретация результатов работы, написание текста, критический пересмотр его содержания, постановка экспериментов

В.Б. Сапарова – помощь в анализе и интерпретации результатов работы

Т.А. Сельменских – постановка экспериментов, сбор данных, участие в анализе результатов

И.Е. Макаренко – утверждение окончательного варианта статьи для публикации; согласие нести ответственность за все аспекты работы, надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных или целостностью всех частей статьи.

Благодарности. В работе оказывали помощь в проведении работы и подготовке статьи коллеги ЗАО «Фарм Холдинг». Спонсорская поддержка ОАО «ГЕРОФАРМ».

Сокращения

EMA – Европейское агентство по лекарственным средствам

3Rs – принципы проведения экспериментов на животных

CV – коэффициент вариации

АТФ – аденозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МТТ – желтый тетразол

AW – Окно Теста

SPR – соотношение сигналов

R² – коэффициент детерминации (корреляции)

NADPH, FADH₂, FMNH₂, NADH – коферменты

АТСС – Американская коллекция клеточных культур

культур

ДМСО – диметилсульфоксид

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

IL-3 – интерлейкин-3.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Authors contributions

A.N. Afanasyeva – significant contribution to the concept or design of the work; collecting, analyzing or interpreting the results of work, writing a text, a critical revision of its content, setting up experiments

V.B. Saparova – assistance in the analysis and interpretation of the results of the work

T.A. Selmenskikh – setting up experiments, collecting data, participating in the analysis of results

I.E. Makarenko – approval of the final version of the article for publication; agreement to be responsible for all aspects of the work, due study and resolution of issues related to the accuracy of data or the integrity of all parts of the article.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Abhishek K. Jain, Divya Singh, Kavita Dubey, Renuka Maurya, Sandeep Mittal, Alok K. Pandey Models and Methods for In Vitro Toxicity // In Vitro Toxicology. Elsevier, 2018. P. 45–65.
2. John R. W. Masters. Animal Cell Culture. A Practical Approach. Third Edition. Oxford University Press, 2000. 315 p.
3. Adan A., Kiraz Y., Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays // Curr. Pharm. Biotechnol. 2016. Vol. 17, № 14. P. 1213–1221.
4. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay // Cold Spring Harb. Protoc. 2018. Vol. 2018, № 6.
5. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay // Cold Spring Harb. Protoc. 2018. Vol. 2018, № 6. P. pdb. prot095489.
6. Gomez Perez M. et al. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of

copper compounds // *Anal. Biochem.* 2017. Vol. 535. P. 43–46.

7. Angius F., Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair // *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA.* 2015. Vol. 29, № 2. P. 314–319.

8. 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.

9. Du X.M. et al. Evaluation of the cytotoxicity of a two-photon absorbing fluorescence compound on human HepG2 cells and its application to tracking human hepatic cancer cells in mice // *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* 2010. Vol. 85, № 2. P. 107–113.

10. Bruzell E.M., Morisbak E., Tønnesen H.H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations // *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2005. Vol. 4, № 7. P. 523–530

11. Feuerstein T., Schauder A., Malik Z. Silencing of ALA dehydratase affects ALA-photodynamic therapy efficacy in K562 erythroleukemic cells // *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2009. Vol. 8, № 10. P. 1461–1466.

12. Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay // *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2011. Vol. 731. P. 237–245.

13. Diaz G. et al. Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates // *Eur. J. Histochem. EJH.* 2007. Vol. 51, № 3. P. 213–218.

14. Stockert J.C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets // *Acta Histochem.* 2012. Vol. 114, № 8. P. 785–796.

15. ГОСТ 23454-2016 Молоко. Методы определения ингибирующих веществ (с Поправкой). [GOST 23454-2016 Moloko. Metody opredeleniya ingibiruyushchikh veshchestv (s Popravkoi).] (in Russ.)

16. Golovinskaya O.V. et al. Comparative Analysis of Dyes Used in the Assessment of Filgrastim Products Specific Activity by Biological in vitro Methods // *Bioprep. Prev. Diagn. Treat.* 2020. Vol. 20, № 3. P. 193–201.

17. Borra R.C., Monica Andrade Lotufo, Sonia Maria Gaglioti, Fabiana de Mesquita Barros, Priscila Maria Andrade A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays // *Braz. Oral Res.* 2009. Vol. 23, № 3. P. 255–262.

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

19. Riss T.L., Richard A. Moravec, Andrew L. Niles, Sarah Duellman, Hélène A. Benink Cell Viability Assays // *Assay Guidance Manual / ed. Sittampalam G.S. et al. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.*

20. Auld D.S., Ya-Qin Zhang, Noel T. Southall, Ganesha Rai, Marc Landsman A basis for reduced chemical library inhibition of firefly luciferase obtained from directed evolution // *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52, № 5. P. 1450–1458.

21. Nonclinical statistics for pharmaceutical and biotechnology industries. New York, NY: Springer Science+Business Media, 2015.

22. Решение № 85 “Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза.” 2016. [Reshenie № 85 “Ob utverzhdenii Pravil provedeniya issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkakh Evraziiskogo ekonomicheskogo soyuza.” 2016] (in Russ.)