

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-27

**СПОСОБ ОЦЕНКИ ЧИСЛА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК
В КЛЕТОЧНОМ СФЕРОИДЕ ПОСРЕДСТВОМ МТТ-АНАЛИЗА**

**METHOD FOR ESTIMATING THE NUMBER OF VIABLE CELLS
IN A CELL SPHEROID USING THE MTT ASSAY**

А. К. Лапенко, Е. Р. Ольховая, П. С. Купцова, Е. Р. Ляпунова, Л. Н. Комарова

*Обнинский институт атомной энергетики — филиал
Национального исследовательского ядерного университета МИФИ*

A. K. Lapenko, E. R. Ol'hovaya, P. S. Kupcova, E. R. Lyapunova, L. N. Komarova

Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering

✉ alialapenko@yandex.ru

Аннотация

Одним из методов изучения жизнеспособности клеточных сфероидов является МТТ-тест. Однако этот тест не позволяет определить количество жизнеспособных клеток внутри сфероида на стадиях культивирования, а дает косвенное представление о метаболической активности клеток. В этом исследовании мы предлагаем метод оценки количества жизнеспособных клеток в клеточном сфероиде с использованием МТТ-теста.

Abstract

One of the methods for studying the viability of cell spheroids is the MTT test. However, this test does not permit the determination of the number of viable cells within the spheroid at different stages of cultivation. Instead, it provides an indirect indication of the metabolic activity of cells. In this study, we propose a method for estimating the number of viable cells in a cell spheroid using the MTT test.

Клеточные сфероиды являются одной из разновидностей трехмерных клеточных моделей, которые активно применяются в современных исследованиях [1]. Сферами их применения являются регенеративная медицина, скрининг эффективности и токсичности фармакологических соединений [2]. Клеточные сфероиды на данный момент занимают промежуточное звено между стандартным клеточным культивированием и проведением экспериментов *in vivo*, поэтому поиск методов, позволяющий характеризовать клеточные сфероиды, является актуальным. Одним из распространенных методов изучения жизнеспособности клеточных сфероидов является МТТ-тест [3]. Однако МТТ-тест не позволяет напрямую определить количество жизнеспособных клеток внутри сфероида на стадиях культивирования, а дает косвенное представление о метаболической активности клеток. В данном исследовании предложен способ оценки числа жизнеспособных клеток в клеточном сфероиде посредством МТТ-анализа.

В качестве объекта исследования была выбрана клеточная линия — клетки почки эмбриона человека НЕК 293. Для создания кривой, описывающей изменение оптической плотности в зависимости от концентрации клеток, были использованы следующие концентрации клеток: 800, 1600, 3200, 6400, 12800, 25600, 51200, 102400 клеток/лунка. Необходимых клеточных концентраций достигали серией разведений клеточной суспензии. По достижении адгезии клеток к поверхности лунки планшета проводили МТТ-тест по стандартной методике [4]. Клеточные сфероиды получали путем культивирования на низкоадгезивной поверхности, посевные концентрации составили 5000, 8000, 10000, 15000, 30000, 60000 клеток/сфероид. МТТ-тест на клеточных сфероидах на разных стадиях культивирования проводили согласно литературным источникам [5]. Оптическую плотность определяли при длине волны 530 нм. Построение кривой осуществляли с помощью программного обеспечения Rstudio. Для построения использовали функцию `pls`.

На клетках почки эмбриона человека НЕК 293 была получена экспоненциальная кривая, описывающая изменение оптической плотности в зависимости от натурального логарифма концентрации клеток (рис. 1). Коэффициент детерминации (R^2) составил 0,84, что свидетельствует о том, что полученная кривая описывает данные с высокой точностью

С помощью полученной кривой было рассчитано количество жизнеспособных клеток в составе клеточных сфероидов НЕК-293 (рис. 2).

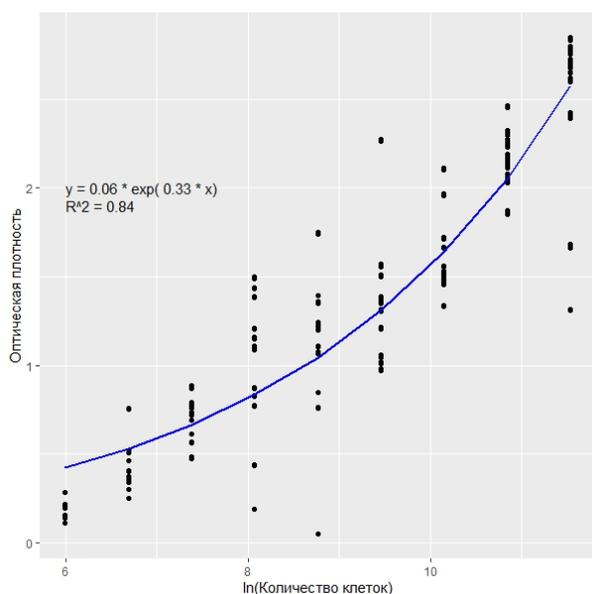


Рис. 1. Изменение оптической плотности в зависимости от количества клеток почки эмбриона человека НЕК 293

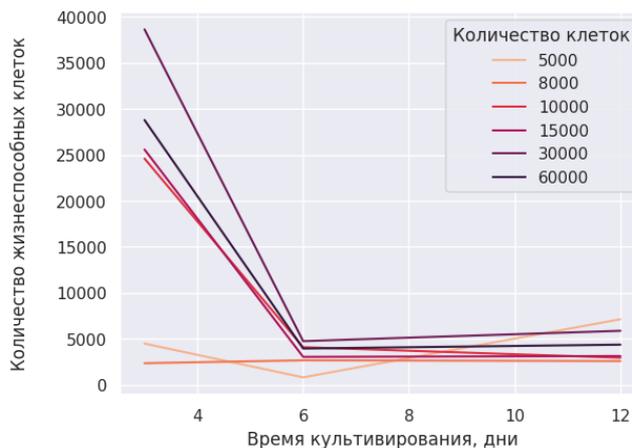


Рис. 2. Рассчитанные показатели количества жизнеспособных клеток в составе сфероидов на разных стадиях культивирования

Данный способ позволяет определять количество жизнеспособных клеток в составе клеточного сфероида с помощью МТТ-теста на разных этапах культивирования.

Литература

1. Białkowska K. et al. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures — examples of methods of preparation and the most important application // Intern. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, No. 17. P. 6225.
2. Badr-Eldin S. M. et al. Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects // Pharmaceuticals (Basel). 2022. Vol. 27. P. 926.
3. Меньших К. А., Воинова В. В., Бонарцев А. П. Создание 3D клеточных сфероидов на микросферах из поли-3-оксибутирата // Актуальная биотехнология. 2019. № 3. С. 591–592.
4. Яковлев Д. С. и др. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7 // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2020. № 1. С. 58–61.
5. Аникина Л. В. и др. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина // Фундаментальные исследования. 2014. № 12-7. С. 1423–1427.