

# Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków<sup>1</sup>

Jolanta Krzysztoń-Russjan, Iza Książek, Elżbieta Anuszevska

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków Narodowego Instytutu Leków

Adres do korespondencji: dr n. med. Jolanta Krzysztoń-Russjan, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, tel./faks 022 841 54 31, e-mail: jrussjan@il.waw.pl

Cytotoksyczność jest jednym z podstawowych mechanizmów działania chemioterapeutyków stosowanych w farmakoterapii [1–3]. W oznaczaniu aktywności cytotoksycznej leków przeciwnowotworowych w warunkach *in vitro*, stosuje się liczne techniki pozwalające na pomiar zmian związanych z zaburzeniami procesów fizjologicznych komórek ludzkich lub zwierzęcych, powodowanych przez badaną substancję [4, 5]. Pomiar zmian aktywności procesów komórkowych jest przeprowadzany dla hodowli komórkowej poddanej działaniu badanej substancji, w odniesieniu do kontroli stanowiącej hodowlę bez leku, najczęściej przy użyciu technik kolorymetrycznych, fluorymetrycznych, bioluminescencyjnych lub izotopowych [1, 5–7]. Miarą aktywności cytotoksycznej badanej substancji jest określenie stężenia hamującego,  $IC_{50}$  (*ang.* inhibitory concentration), dla którego wzrost i proliferacja komórek w hodowli zostają zahamowane w 50%, w stosunku do wzrostu komórek kontrolnych.

Testy stosowane do oceny cytotoksyczności pozwalają na bezpośredni bądź pośredni pomiar różnych zmian odzwierciedlających aktywność cytotoksyczną, np. liczby żywych komórek, niekiedy w połączeniu z określeniem integralności błony komórkowej, oznaczeniem aktywności enzymatycznej związanej z metabolizmem komórki, określeniem zdolności do podziałów komórkowych (stopień proliferacji) czy określeniem całkowitej zawartości białka lub DNA w hodowli komórkowej. Na jakość wyników badań wpływa wiele czynników, m.in. stabilność zastosowanej linii komórkowej, walidacja protokołu prowadzenia badania, a także optymalny dobór techniki [2, 8]. Na rynku jest obecnie bardzo dużo testów i rozwiązań technicznych, dlatego niżej omówiono te najczęściej stosowane.

## Comparison of MTT and EZ4U assays applied for xenobiotics cytotoxicity evaluation · Aim of study.

The aim of this study was a comparison of MTT and EZ4U assays usefulness for doxorubicin cytotoxicity evaluation. It was performed by following various cell lines such as: human melanoma – ME18, – ME18/R, normal human fibroblasts – WS-1, mouse's fibroblasts – L929 and human cervical cells – HeLa.

**Results.** Doxorubicin  $IC_{50}$  values analysis obtained for all cultures used in this study included repeatability, inside experiments variability as a value of relative standard deviation in percents –%RSDi) and intermediate precision (variability between experiments –%RSDb). The highest concordance of both techniques was reflected by followed doxorubicin  $IC_{50}$  values (MTT  $IC_{50}$  = 0,28 vs. EZ4U  $IC_{50}$  = 0,27  $\mu$ g/ml) obtained for HeLa cells with respective precision  $\pm$ 24 vs.  $\pm$ 11,2%. For WS1 and L929 cell cultures  $IC_{50}$  values obtained in MTT assay were almost two-fold lower than achieved by EZ4U assays and characterized by values 0,21 and 0,22 vs. 0,44 i 0,52  $\mu$ g/ml respectively with the precision for MTT assay reflected by values including %RSDb  $\pm$  32,6 and  $\pm$  35,2%, and for EZ4U assay  $\pm$  5,8 and  $\pm$  4,0% respectively.  $IC_{50}$  for ME18 determined by MTT assay was 2,4-fold higher than by EZ4U assay (0,6 vs. 0,25  $\mu$ g/ml). This values were obtained with the precision for MTT assay  $\pm$ 20,5%, and for EZ4U assay  $\pm$  12,0%. There was not obtained any  $IC_{50}$  value for MR18/R by MTT assay in tested range concentrations but by EZ4U assay  $IC_{50}$  reached 34,4  $\mu$ g/ml and was characterized  $\pm$  by 5,8% precision.

**Conclusions.** The results obtained in this study performing by EZ4U and MTT confirmed the usefulness of this both techniques for doxorubicin cytotoxicity evaluation. The EZ4U assay results characterized by considerably higher precision and repeatability (results in the article) then MTT assay results and as an only one followed to obtain  $IC_{50}$  values in the ranged doxorubicin concentration for all cell lines used in this study.

**Keywords:** cytotoxicity, MTT assay, EZ4U assay, doxorubicin

© Farm Pol, 2009, 65(6): 395-402

<sup>1</sup> Praca została wykonana w ramach działalności statutowej NIL w 2008 r., DS nr 1.54.

Celem pracy było porównanie użyteczności testów MTT oraz EZ4U do oceny aktywności doksorubicyny. Porównanie to przeprowadzono z zastosowaniem różnych linii komórkowych, tj.: komórek ludzkiego czerniaka – ME18, – ME18/R, prawidłowych fibroblastów ludzkich – WS-1, fibroblastów mysich – L929 oraz komórek raka szyjki macicy – HeLa.

Jednym z podstawowych i szybkich badań jest pomiar liczby żywych komórek, który może być przeprowadzony pośrednio z uwzględnieniem oceny integralności błon komórkowych, np. w teście z czerwiecią obojętną, NR (ang. *neutral red*), opartym na wychwycie czerwieni przez lizosomy. Barwnik ten przechodzi przez błonę komórkową jedynie żywych komórek i gromadzi się w lizosomach. Badanie to po-

zwala na odróżnienie komórek żywych i nieuszkodzonych od martwych lub uszkodzonych, poprzez określenie liczby komórek żywych, zabarwionych na czerwono w komorze hemocytometru, bądź spektrofotometrycznie przez pomiar absorpcji roztworu uzyskanego po rozpuszczeniu barwnika w 1% roztworze acetonu zawierającego 30% etanolu, po uprzednim usunięciu podłoża hodowlanego [4]. Innym rozwiązaniem technicznym wskazującym na brak integralności błon komórkowych, jest pomiar aktywności enzymu cytoplazmatycznego dehydrogenazy mleczanowej, LDH w podłożu hodowlanym. Obecność tego enzymu w podłożu

świadczy o uszkodzeniu błon komórkowych i może być mierzona pośrednio przez wykrywanie zredukowanego formazanu. W teście LDH wykorzystuje się reakcję redukcji soli tetrazoliowej do barwnego formazanu, jako produktu dwustopniowej reakcji. W pierwszym etapie, w wyniku przekształcenia mleczanu do pirogrogrianu przy udziale LDH powstaje zredukowany dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy NADH/H<sup>+</sup>, z którego przy udziale diaforazy w drugim etapie jon wodorowy H<sup>+</sup> jest przenoszony na sól tetrazoliową. W efekcie powstaje barwny formazan, którego intensywność zabarwienia jest mierzona spektrofotometrycznie [2, 5].

Przykładem innego badania, również wskazującego na brak integralności błon komórkowych, jest test NAG. Pozwala on na wykazanie obecności enzymu lizosomalnego N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy w podłożu hodowlanym, co jest możliwe jedynie wtedy, gdy komórki są uszkodzone. Dlatego oznaczanie aktywności tego enzymu w teście NAG jest także stosowane w badaniach cytotoxyczości [1].

Określanie liczby komórek jest możliwe przy użyciu testu z sulforodaminą (SRB). Pozwala on na określenie całkowitej ilości białka w badanej próbce, która jest wprost proporcjonalna do liczby komórek. Podstawą tego badania jest elektrostatyczne wiązanie się sulforodaminy do białek w odpowiednim pH, zależnym od składu jakościowego aminokwasów, po wcześniejszym utrwaleniu komórek kwasem trójchlo-rooctowym TCA. [9].

Przykładem badania efektywności procesów energetycznych zachodzących w mitochondriach, stosowanego do określenia cytotoxyczości, jest oznaczenie

liczby wewnątrzkomórkowego ATP [6]. Założeniem tej metody jest przyjęcie stałej charakterystycznej liczby ATP dla określonego rodzaju komórki w optymalnych warunkach hodowli. Zmiana ilości ATP jest proporcjonalna odpowiednio do wzrostu lub spadku liczby komórek, a także do spadku efektywności procesów energetycznych w komórkach. W oznaczeniu liczby ATP wykorzystuje się zjawisko bioluminescencji powstające w reakcji z lucyferazą, katalizującą reakcję utlenienia lucyferyny do oksylucyferyny z udziałem jednej cząsteczki ATP. W tym procesie emitowane jest promieniowanie świetlne. Intensywność świecenia mierzona jest luminometrycznie i wyrażana w fotonach. W określeniu liczby ATP w badanej próbce wykorzystuje się liniową zależność intensywności luminescencji od liczby ATP i liczby komórek. Innym przykładem pomiaru aktywności metabolicznej żywych komórek jest test AB (ang. *AlamarBlue*) z zastosowaniem resauryny o barwie niebieskiej, która w procesach oksydoredukcyjnych jest przekształcana w resorufinę o różowej fluorescencji. Pomiar ilości powstałego produktu może być przeprowadzony spektrofotometrycznie lub fluorometrycznie. Uzyskane wyniki pozwalają ocenić aktywność enzymatyczną procesów utleniania i redukcji w odniesieniu do kontroli [2].

Spośród technik kolorymetrycznych jedną z najczęściej stosowanych metod ilościowych, pozwalających na określenie cytotoxyczości badanej substancji wobec komórek, jest test MTT opracowany w latach 80. XX w. przez Mosmanna [10]. Wykorzystuje się w nim aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu mitochondrialnego, obecnego w żywych komórkach, który przekształca rozpuszczalną sól tetrazoliową, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy, w formę zredukowaną, nierozpuszczalny formazan, wytrącający się w postaci kryształów [11]. Po zmianie środowiska i rozpuszczeniu kryształów w DMSO lub izopropanolu powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie w zakresie długości fal 492–570 nm [1, 2, 5]. W komórkach uszkodzonych, upośledzonych metabolicznie lub martwych, formazan tworzy się w mniejszych ilościach lub nie powstaje. Zmiany ilości i aktywności enzymatycznej dehydrogenazy bursztynianowej w teście MTT są odzwierciedlone w pomiarach absorpcji. Intensywność barwy roztworu jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego produktu i pośrednio do liczby żywych komórek. Uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników z zastosowaniem testu MTT, wymaga precyzji laboratoryjnej na wszystkich etapach testu, ze szczególnym uwzględnieniem ostatniego etapu, tj.: rozpuszczania kryształów formazanu [1, 4].

Do oceny cytotoxyczości substancji dostępnych jest dziś wiele testów komercyjnych, które jako substrat wykorzystują sól tetrazoliową, przekształcaną pod wpływem dehydrogenazy w barwny, rozpuszczalny

związek, nie zaś w kryształach formazanu. Taka modyfikacja skraca procedurę i upraszcza końcowy etap wizualizacji wyników, przez co zmniejsza ryzyko błędu laboratoryjnego. Jednym z takich komercyjnych testów, wykorzystujących zasadę działania zbliżoną do testu MTT, tj. redukcję soli tetrazoliowej, ale z modyfikacją i skróceniem ostatnich etapów wizualizacji wyniku, jest test EZ4U firmy Biomedica GmbH, Austria (EZ4U. *The 4th generation non radioactive cell proliferation & cytotoxicity assay*. www.bmgrp.com).

Celem pracy było określenie użyteczności zastosowania EZ4U do oceny cytotoksyczności doksorubicyny różnych komórek w hodowlach ludzkich i mysich linii komórkowych oraz określenie powtarzalności i precyzji pośredniej wyników uzyskanych z zastosowaniem testów MTT i EZ4U, a także porównanie wartości  $IC_{50}$  uzyskanych w obu metodach.

## Materiały i metody

Badanie obejmowało ocenę cytotoksyczności doksorubicyny z zastosowaniem testu MTT oraz EZ4U i zostało przeprowadzone z zastosowaniem pięciu zróżnicowanych linii komórkowych.

### Linie komórkowe

W badaniu zastosowano następujące linie komórkowe:

1. linia ciągła fibroblastów mysich, L929,
2. linia prawidłowych fibroblastów ludzkich pochodzenia zarodkowego, WS-1,
3. linia ciągła wyprowadzona z komórek nowotworu szyjki macicy, HeLa,
4. linia ciągła wyprowadzona z komórek ludzkiego czerniaka złośliwego, ME18,
5. linia ciągła, oporna na doksorubicynę, ME18/R – wyprowadzona z ME18.

Linie komórkowe L929 i HeLa pochodzą z banku *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, linia komórkowa WS-1 z *European Collection of Cell Cultures*, linia ME18 została przekazana z Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, zaś ME18/R to podlinia uzyskana doświadczalnie z ME18 w Zakładzie Biochemii i Biofarmaceutyków Narodowego Instytutu Leków [12].

### Warunki hodowli

Komórki rosły adhezyjnie w podłożu MEM (Gibco, USA) z dodatkiem 10% FBS (Gibco, USA) oraz 1% roztworu antybiotyków (Gibco, USA) przygotowanego ze stężonego roztworu mieszaniny zawierającej 10 000 U/ml penicyliny G, 10 µg/ml siarczanu streptomycyny oraz 25 µg/ml amfoterycyny B. Hodowle inkubowano w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w temp. 37°C. Czas podwojenia, DT (ang. *doubling time*) większości komórek ww. linii wynosił ok. 24 h z wyjątkiem komórek WS-1, dla których wynosił ok. 67 h.

## Test MTT

### Przygotowanie zawiesiny komórek

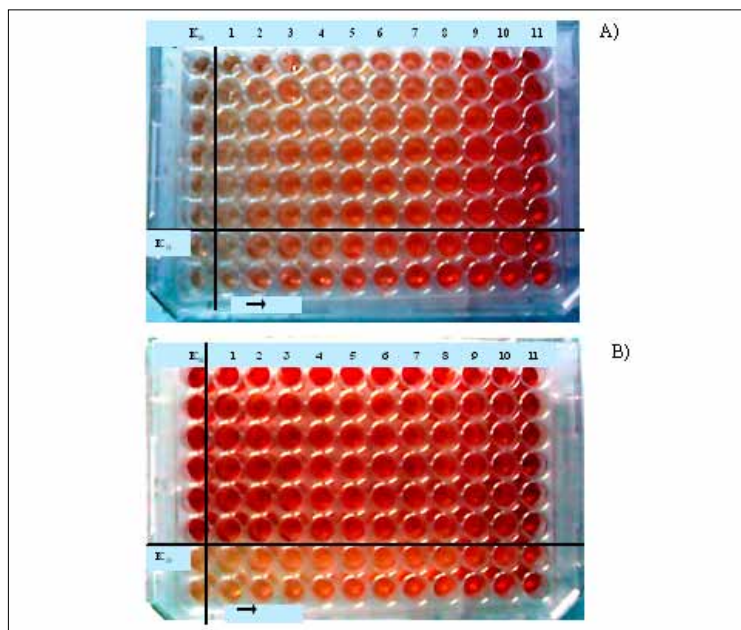
Z 24 h hodowli komórek linii L929, HeLa, ME18 i ME18/R oraz z 72h WS-1, będących w fazie wzrostu logarytmicznego uzyskiwano zawiesinę komórek przez odklejenie ich od powierzchni naczynia, po trypsynowaniu przez ok. 2–4 min (0,05% r-r trypsyny z EDTA, Gibco, USA) w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Liczbę komórek w 1 ml podłoża do hodowli oznaczano z zastosowaniem licznika Coulter Z2. Przed rozpoczęciem badań dla każdej linii zoptymalizowano wielkość inokulum, które zapewniało przynajmniej 70% pokrycia naczynia. Pojedyncze badanie dla określonej linii stanowiła hodowla komórkowa założona równolegle na dwóch 96-studzienkowych płytkach titracyjnych, przeznaczonych do badania odpowiednio testem MTT i EZ4U. Dla każdej linii przeprowadzono od 2 do 4 niezależnych powtórzeń badania z zastosowaniem obu testów.

### Zakładanie hodowli

Na płytki titracyjne nanoszono po 200 µl zawiesiny komórek/studzienkę o optymalnej liczbie komórek/ml, tj. od 1,5 do 2,75 × 10<sup>4</sup> k-k/ml, w zależności od linii (tabela 1). Hodowle inkubowano przez 24 h dla większości linii, z wyłączeniem komórek WS-1, które inkubowano 48–72 h w wyżej opisanych warunkach w celu przyklejenia się ich do powierzchni. Po inkubacji oceniano wzrost hodowli pod względem pokrycia powierzchni studzienki. Uzyskanie pokrycia powierzchni studzienki w ok. 70% pozwalało na kontynuację doświadczenia. Bezpośrednio przed wymianą podłoża przygotowywano 11-punktowy szereg rozcieńczeń doksorubicyny, o stężeniu wyjściowym 2 mg/ml (Adrimedac, roztwór do wstrzykiwań, 2 mg/ml, Medac, Niemcy) w podłożu. Dla linii wrażliwych szereg ten obejmował rozcieńczenia doksorubicyny od 0,06 do 5,8 µg/ml, zaś dla linii odpornej ME18/R, przygotowano dwa szeregi rozcieńczeń doksorubicyny, tj. od 2,9 do 92,8 µg/ml oraz od 1,16 do 46,4 µg/ml. Każdy punkt o określonym stężeniu doksorubicyny był wykonany w 8 powtórzeniach. Podłoże po wstępnej inkubacji usuwano i zastępowano podłożem z odpowiednimi stężeniami doksorubicyny. W kontroli, którą stanowiła hodowla bez leku (kolumna 1), wymieniano podłoże na świeże. Do każdej kolejnej kolumny studzienek dodawano po 200 µl określonego rozcieńczenia badanej

**Tabela 1.** Optymalna, wyjściowa gęstość komórek dla linii komórkowych użytych w oznaczaniu cytotoksyczności przy użyciu testów EZ4U i MTT

Linia komórkowa	Liczba komórek/ml
ME18	1,5 × 10 <sup>4</sup>
ME18/R	2,5 × 10 <sup>4</sup>
HeLa	2,75 × 10 <sup>4</sup>
WS-1	2,5 × 10 <sup>4</sup>
L929	2,5 × 10 <sup>4</sup>



**Rycina 1.** Wpływ stężenia doksorubicyny w podłożu na barwę podłoża obserwowany po 48h inkubacji hodowli komórek linii MER18/R, A) natychmiast po dodaniu odczynnika EZ4U, B) po 4h inkubacji z odczynnikiem EZ4U. Kierunek wzrostu stężenia doksorubicyny zaznaczono strzałką (2,9–92,8 µg/ml).  $K_H$  – kontrola hodowli,  $K_D$  – kontrola tła (podłoże z doksorubicyną)

substancji w podłożu, w kolejności od najniższego (kolumna 2) do najwyższego (kolumna 12) stężenia. Komórki linii ME18, ME18/R, HeLa, L929 inkubowano przez 48 h, zaś komórki linii WS-1 przez 72 h w warunkach opisanych wyżej. Po inkubacji komórek z doksorubicyną podłoże usuwano i do każdej studzienki dodawano po 50 µl odczynnika MTT o stężeniu 5 mg/ml (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy). Hodowlę następnie inkubowano przez 4 h w wyżej wymienionych warunkach. Po inkubacji oglądano wytrącone kryształy formazanu. Płyn z nad kryształów usuwano delikatnie przez odpipetowanie, następnie do każdej studzienki dodawano 100 µl r-ru DMSO (99,5%) (Labscan Ltd, Irlandia) i łagodnie mieszano kilka minut w celu rozpuszczenia kryształów. Absorbancję roztworów mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 492 nm z zastosowaniem czytnika płytek iEMS Reader MF (Labsystems Oy, Finlandia).

**Tabela 2.** Porównanie wartości  $IC_{50}$  doksorubicyny uzyskanych dla poszczególnych linii komórkowych w zależności od testu zastosowanego w tej pracy z uwzględnieniem precyzji pośredniej otrzymanych wyników (%RSDm)

Linia komórkowa	MTT		EZ4U	
	$IC_{50}$ w µg/ml [µM]	%RSDm	$IC_{50}$ w µg/ml [µM]	%RSDm
ME18	0,6 [1,1]	20,5	0,25 [0,46]	12,0
ME18/R	>92,8 [170,7]	nie wyznaczono	34,4 [63,3]	5,8
HeLa	0,28 [0,5]	24,2	0,27 [0,49]	11,2
WS-1	0,21 [0,39]	32,6	0,44 [0,8]	5,8
L929	0,22 [0,4]	35,2	0,52 [0,95]	4,0

Żywołność komórek w obecności określonego stężenia doksorubicyny obliczano, odnosząc odpowiednio wartości absorbancji uzyskane dla poszczególnych stężeń leku do wartości absorbancji komórek kontrolnych, przyjmując absorbancję roztworu dla komórek kontrolnych za 100%. Dla wszystkich badanych linii komórkowych wyznaczono wartości  $IC_{50}$ , tj. stężenia doksorubicyny, w których żywołność komórek badanych linii była zahamowana w 50% hodowli.

### Test EZ4U

Hodowle przeznaczone do badania testem EZ4U prowadzono według protokołu dla testu MTT równolegle, do momentu zakończenia inkubacji hodowli w podłożu z doksorubicyną, zgodnie z zaleceniami producenta (EZ4U. *The 4th generation non radioactive cell proliferation & cytotoxicity assay*. www.bmgrp.com). W tym teście dodatkowo uwzględniano kontrolę zabarwienia podłoża dla każdego punktu z szeregu rozcieńczeń doksorubicyny. Każdy punkt z szeregu rozcieńczeń był wykonany w 6 powtórzeniach, zaś kontrola zabarwienia leku w podłożu w 2 powtórzeniach (**rycina 1A**). Po inkubacji z doksorubicyną badanie prowadzono zgodnie z protokołem producenta. Przygotowywano roztwór zawierający sól tetrazoliową (odczynnik EZ4U) i bezpośrednio do każdej studzienki dodawano po 20 µl tego odczynnika. Płytkę inkubowano przez 4 h w wyżej opisanych warunkach, a następnie mierzono absorbancję w spektrofotometrze mikroplótkowym przy długości fali  $\lambda=492$  i  $\lambda=620$ , zgodnie z zaleceniami producenta. Pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda=620$  był dodatkowo zalecony przez producenta w celu korekty wyników o tło, pochodzące, m.in. od pozostałości komórek. Podczas obliczania wyników wartość absorbancji mierzona przy długości fali  $\lambda=492$  była pomniejszana o wartość absorbancji mierzonej przy długości fali  $\lambda=620$ .

### Wyniki

#### Optymalizacja liczby komórek

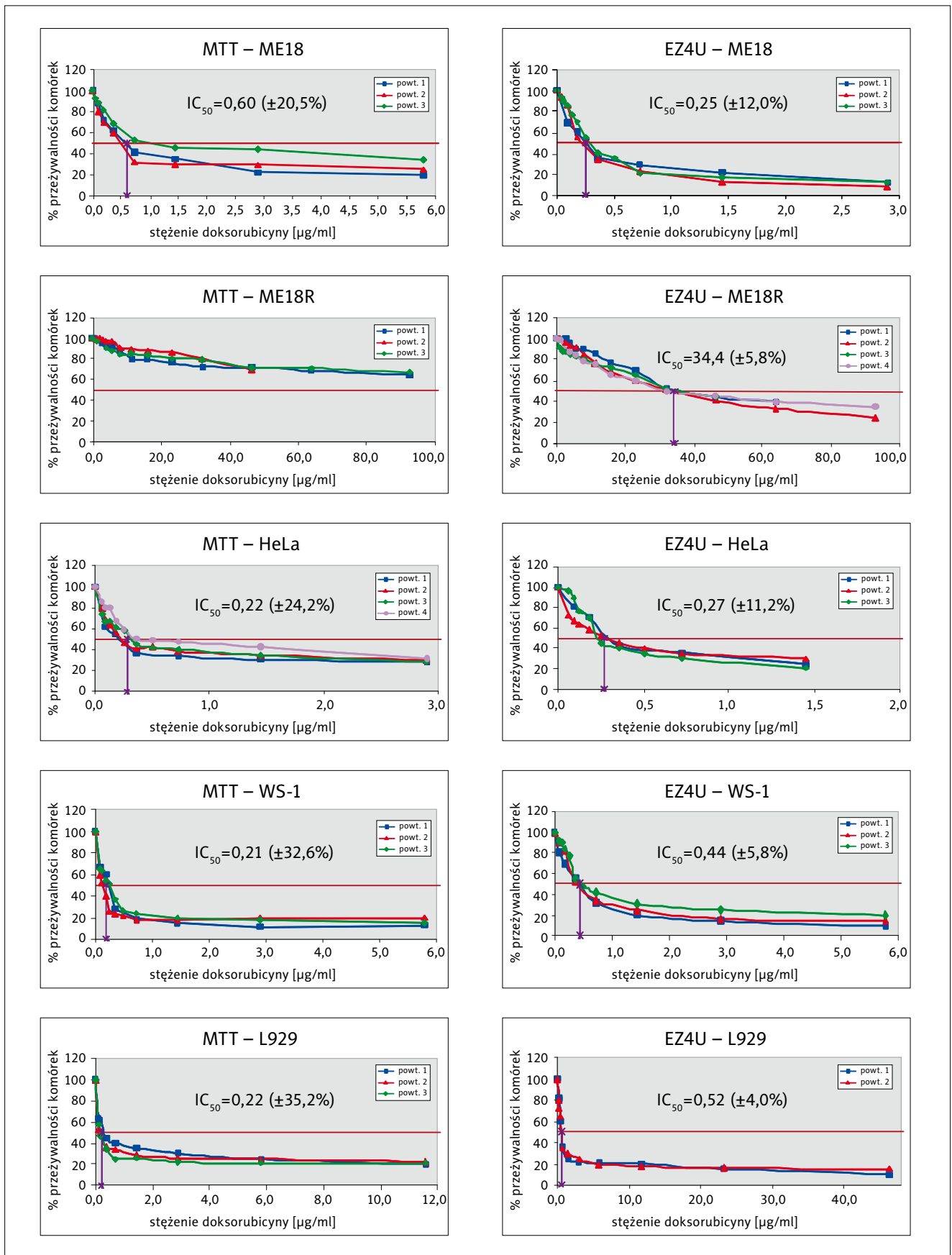
Optymalne inokulum dobrane do użytych testów było zróżnicowane w zależności od użytej linii. Najniższą gęstość, tj.  $1,5 \times 10^4$ /ml wyznaczono dla linii MER18, najwyższą zaś –  $2,75 \times 10^4$ /ml dla linii HeLa, dla pozostałych linii gęstość ta była jednakowa i wynosiła  $2,5 \times 10^4$ /ml, szczegółowe wyniki przedstawia **tabela 1**.

#### Porównanie wartości $IC_{50}$ dla poszczególnych linii w zależności od zastosowanego testu

Wartości  $IC_{50}$  uzyskane z zastosowaniem testów MTT i EZ4U dla poszczególnych linii komórkowych przedstawione zostały w **tabeli 2** oraz na **rycynie 2**.

Porównywalne wartości  $IC_{50}$  uzyskano dla HeLa (0,28 w MTT i 0,27 µg/ml w EZ4U). Dla komórek linii WS-1 i L929 w teście MTT uzyskano blisko dwukrotnie niższe wartości  $IC_{50}$ , niż w EZ4U (odpowiednio 0,21





Rycina 2. Zależność przeżywalności komórek (%) od stężenia doxorubicyny (µg/ml) określona dla poszczególnych linii komórkowych w testach MTT i EZ4U. Poszczególne powtórzenia badania odzwierciedlają odpowiednie kolory wykreślonych krzywych

i 0,22 µg/ml vs. 0,44 i 0,52 µg/ml w MTT). Dla komórek ME18 w teście MTT wartość  $IC_{50}$  była 2,4 razy wyższa niż w teście EZ4U (0,6 w MTT vs. 0,25 µg/ml). Dla komórek linii odpornej ME18/R nie określono konkretnej wartości  $IC_{50}$  w teście MTT, wartość ta była wyższa od górnego zakresu stężenia dla doksorubicyny, tj. wyższa niż 92,8 µg/ml i około trzykrotnie przekraczała wartość  $IC_{50}$  uzyskaną dla komórek tej linii w teście EZ4U (34,4 µg/ml).

### Strategia opracowania statystycznego uzyskanych wyników

Wyniki badania cytotoksyczności przedstawiono dla każdej linii komórkowej w postaci zależności stopnia przeżywalności komórek (wyrażonego w procentach) od stężenia, doksorubicyny (µg/ml) (**rycina 2**). Zależność ta została zobrazowana dla każdego powtórzenia badania i użytej linii komórkowej, w postaci linii o określonych kolorach na wykresach, przypisanych kolejnym powtórzeniom badania, dla obu zastosowanych testów MTT oraz EZ4U. Wyniki poddano obróbce statystycznej, wyznaczając zmienność wewnątrz- i międzyeksperymentalną, które wyrażono liczbowo i oznaczono odpowiednio skrótami: RSDw i RSDm [13]. Zmienność wewnątrzeksperymentalna odzwierciedlała powtarzalność, zaś międzyeksperymentalna precyzję pośrednią uzyskanych wyników  $IC_{50}$  (**tabela 2 i 3**).

RSDw oznaczają średnią obliczoną z uzyskanych wartości względnego odchylenia standardowego we wszystkich powtórzeniach badania dla każdego punktu z szeregu rozcieńczeń, przy czym dla testu MTT odpowiednio z 8-krotnego powtórzenia punktu, zaś dla testu EZ4U z 6-krotnego i wyrażona była w procentach (%RSDw) [13]. W **tabeli 3** przedstawiono średnie wartości zmienności wewnątrzeksperymentalnej dla każdej linii z rozróżnieniem użytego testu.

Zmienność międzyeksperymentalną (RSDm), wyrażona w procentach, określała precyzję pośrednią wyników uzyskiwanych danym testem. Została obliczona na podstawie powtarzalności wartości  $IC_{50}$  wyznaczonych z liniowych fragmentów krzywych przedstawiających zależność przeżywalności komórek od stężenia doksorubicyny [13]. W **tabeli 2** przedstawiono wartości  $IC_{50}$  uzyskane dla obu porównywanych testów.

### Porównanie wartości zmienności wewnątrz- i międzyeksperymentalnej

Średnie wartości %RSDw (**tabela 3**) wyznaczone dla testu MTT kształtowały się w zakresie od 7,1 dla komórek HeLa do 10,9% dla komórek ME18, przy czym

dla poszczególnych linii zakresy były jeszcze szersze i wahały się od kilku do nieco ponad 20%. W teście EZ4U odpowiednio wartości średnie %RSDw oscylowały między 4,9 dla komórek ME18 i 6,4 dla komórek L929, przy czym dla poszczególnych linii wahały się od kilku do 13,6%.

Średnie wartości %RSDm (**tabela 2**) dla testu MTT wahały się w granicach od 20,5 do ponad 35%, zaś dla testu EZ4U między 4 i 12%.

### Omówienie wyników

W niniejszej pracy porównywano dwa testy, wykrywające aktywność mitochondrialnego enzymu dehydrogenazy bursztynianowej przez redukcję soli tetrazoliowej do formazanu. W teście MTT powstaje nierozpuszczalny w środowisku wodnym formazan w formie kryształów, zaś w teście EZ4U – rozpuszczony w podłożu, również zredukowany związek soli tetrazoliowej [1; EZ4U. *The 4th generation non radioactive cell proliferation & cytotoxicity assay*. www.bmgrp.com]. W związku z niewielką różnicą związaną z powstającym produktem końcowym, testy te były nieznacznie zróżnicowane pod względem technicznym.

Porównawcze badania cytotoksyczności doksorubicyny rozpoczęto od optymalizacji wyjściowej liczby komórek w ml, zastosowanej w prowadzonych badaniach. Ustalenie tego parametru i zapewnienie powtarzalnych warunków podczas doświadczenia miało bardzo istotny wpływ na wyznaczaną wartość  $IC_{50}$  i jej powtarzalność, a więc na jakość wyniku. Wyznaczone w opisany wyżej sposób optymalne inokulum zapewniało w każdym przypadku uzyskanie w ostatnim dniu badania 90–100% pokrycia powierzchni studzienek kontrolnych. W wielu pracach wykazano wpływ wyjściowej gęstości komórek na wartości absorbancji i  $IC_{50}$  [2, 14]. Wstępna optymalizacja gęstości komórek nanoszonych na płytkę mikrotitracyjną na podstawie oceny stopnia pokrycia po 24h i 72h, miała na celu określenie bezpiecznej gęstości, tj. takiej, która nie wpłynęłaby hamująco na aktywność proliferacyjną komórek.

W omawianej pracy do badań cytotoksyczności wybrano doksorubicynę, tj. lek o dobrze udokumentowanej aktywności cytotoksycznej, który jest stosowany w farmakoterapii różnego rodzaju chorób nowotworowych [3, 12]. W związku z tym, w następnej kolejności dobrano różne linie komórkowe, w większości nowotworowe [12, 15, 16].

W celu porównania zbliżonych ze sobą w mechanizmie działania testów MTT i EZ4U, zaplanowano dużą liczbę powtórzeń każdego z punktów szeregu rozcieńczeń leku w pojedynczym eksperymencie. Z zamieszczonych danych wynika, że średni %RSDw zmienności wewnątrzeksperymentalnej był o ok. 3,5% wyższy w teście MTT niż w EZ4U i wynosił 7,1–10,9%. Wartości

Do oceny cytotoksyczności substancji dostępnych jest dziś wiele testów komercyjnych, które jako substrat wykorzystują sól tetrazoliową, przekształcaną pod wpływem dehydrogenazy w barwny, rozpuszczalny związek, nie zaś w kryształy formazanu. Taka modyfikacja skraca procedurę i upraszcza końcowy etap wizualizacji wyników, przez co zmniejsza ryzyko błędów laboratoryjnych.

uzyskane dla średnich wartości %RSDw w teście EZ4U mieszczą się w zakresie 4,9–6,4%. Zmienność wewnątrzeksperymentalną stanowił błąd powtarzalności uzyskany dla punktów wyznaczających krzywą, zaś zmienność międzyeksperymentalną wyznaczono na podstawie powtarzalności wartości  $IC_{50}$ , wyznaczonej z liniowej zależności fragmentu wykresu, przedstawiającego zależność stopnia zahamowania żywotności komórek od stężenia doksorubicyny.

Określając średnią wartość %RSDm dla obu testów zastosowanych w tej pracy, którą wyznaczono z 2–4 niezależnych powtórzeń badania danej linii komórkowej (tabela 3), wyznaczono precyzję pośrednią, tj. powtarzalność wartości  $IC_{50}$  dla obu testów. Uzyskane dane przedstawiono w tabeli 2. Wykazano, że powtarzalność wartości  $IC_{50}$  dla wszystkich użytych linii jest również większa w teście EZ4U. Rozrzut uzyskanych wartości mieści się w przedziale 4,0–12,0%, podczas gdy w teście MTT zakres wartości %RSDm oscylował od kilku do 20,5%.

Biorąc pod uwagę rozpiętość zastosowanych stężeń doksorubicyny oraz uwzględniając błąd wyznaczenia wartości  $IC_{50}$  (%RSD), stwierdzono, że oprócz komórek linii ME18/R, dla pozostałych linii komórkowych zróżnicowanie wartości  $IC_{50}$  uzyskanych w obu testach jest nieistotne statystycznie, co pozwala uznać oba testy za porównywalne pod względem dokładności oznaczenia.

Otrzymane wyniki powtarzalności międzyeksperymentalnej korelują z wcześniej przedstawionymi wynikami dla powtarzalności wewnątrzeksperymentalnej. Mniejsza dokładność wyznaczania odsetka przeżywających komórek w teście MTT (wyższe %RSDw), pociąga za sobą wyższy błąd (%RSDm) wyznaczania wartości  $IC_{50}$ .

Dla komórek linii ME18/R nie udało się wyznaczyć wartości  $IC_{50}$  w wybranym zakresie stężeń doksorubicyny. Przy najwyższym badanym stężeniu doksorubicyny 92,8  $\mu\text{g/ml}$  w teście MTT uzyskano ok. 65% żywych komórek w stosunku do kontroli. W teście EZ4U dla komórek tej linii wyznaczono  $IC_{50}$  na poziomie 34,4  $\mu\text{g/ml}$ , co świadczy o oporności tej linii na badany lek. Porównując wartości  $IC_{50}$  uzyskane w obu testach dla komórek linii ME18 (wrażliwej) stwierdzono, że wartości uzyskane w teście MTT są ok. 2,5-krotnie wyższe niż w teście EZ4U. Zaobserwowana zależność może dotyczyć obu linii, co wyjaśniałoby fakt występowania wartości  $IC_{50}$  powyżej wartości 92,8  $\mu\text{g/ml}$ . Warto ponadto zauważyć, że również dla komórek ludzkiego czerniaka ME18, w teście MTT uzyskano najwyższy średni błąd (10,9%) oraz rozrzut wartości %RSDw zmienności wewnątrzeksperymentalnej (1,7–21,2%). Podczas wykonywania doświadczeń dla komórek linii ME18 i ME18/R stwierdzono zmniejszoną adhezję komórek tych linii do podłoża, w porównaniu do pozostałych rodzajów linii komórkowych, użytych w badaniach. Wynika

z tego, że powyższa cecha komórek może bezpośrednio wpływać na precyzję pośrednią metody (zmienność międzyeksperymentalną). Podczas wymiany podłoża łatwo bowiem o przypadkowe usunięcie komórek ze studzienek na płytce. W teście MTT, oprócz wymiany pożywki hodowlanej na podłożu z lekiem, dokonuje się jeszcze jednej wymiany, gdy podłożu z lekiem zastępuje się odczynnikiem MTT. Ponieważ komórki są osłabione działaniem substancji cytotoksycznej (w tym przypadku doksorubicyny), łatwo ulegają odklejaniu od podłoża. Im mniej adherentne komórki, tym łatwiej o wprowadzenie do doświadczenia błędu eksperymentalnego. W teście EZ4U nie ma tego drugiego etapu, ponieważ odczynnik ten dodaje się bezpośrednio do podłoża z lekiem (nie ma etapu usuwania podłoża, tak jak w MTT) i po 4 h inkubacji następuje bezpośredni odczyt absorbancji roztworu. Innowacyjność tego rozwiązania eliminuje jeszcze jeden, bardzo krytyczny etap, występujący w standardowo przeprowadzanym teście MTT, a powodujący pojawianie się przypadkowych błędów i mający duży wpływ na wartość  $IC_{50}$ , tj. etap usuwania niezwiązanego odczynnika MTT, w celu rozpuszczenia w DMSO powstałych w wyniku reakcji kryształów formazanu. Podczas usuwania odczynnika MTT często obserwowano przypadkowe odrywanie się kryształów, co wpłynęło na zmianę zabarwienia roztworu poddawane go pomiarowi absorpcji. Największy tego typu problem stwierdzono podczas pracy z komórkami linii ME18/R, gdzie w kontroli występowało bardzo dużo kryształów słabo przyklejonych do podłoża. Podczas wymiany odczynnika MTT na DMSO, duża ich liczba ulegała przypadkowemu usunięciu, co znacznie obniżało wartość odniesienia dla pozostałych wyników, błędnie zawyżając przedstawioną na wykresie zależność przeżywalności od stężenia (rycina 1). Mogło to przyczynić się do znacznego zawyżenia wartości  $IC_{50}$  dla tej linii i braku wyznaczenia wartości  $IC_{50}$  w ustalonym zakresie stężeń dla doksorubicyny. W teście EZ4U taki problem nie występował, dla

**Tabela 3.** Porównanie wartości zmienności wewnątrz eksperymentalnej (RSD testów MTT i EZ4U – powtarzalność metody

Linia komórkowa	MTT		EZ4U	
	%RSDw (wartość min i max)	Liczba badań	%RSDw (wartość min i max)	Liczba badań
ME18	10,9 (1,7–21,2)	3	4,9 (1,6–11,2)	3
ME18/R	7,25 (1,22–12,2)	3	5,6 (0,4–13,6)	4
HeLa	7,1 (0,0–11,5)	4	5,7 (1,5–12,1)	3
WS-1	9,6 (2,2–20,5)	3	5,4 (1,3–9,9)	3
L929	9,9 (3,4–15,0)	3	6,4 (2,3–10,4)	2

tego udało się wyznaczyć wartość  $IC_{50}$  dla ME18/R na poziomie 34,4  $\mu\text{g/ml}$ .

W teście EZ4U zaobserwowano wyraźny wpływ barwy doksorubicyny na wartość absorbancji. Wysokie stężenia doksorubicyny spowodowały widoczną zmianę barwy podłoża, co obrazuje **rycina 2**. Rycina ta przedstawia obraz płytki natychmiast po dodaniu odczynnika EZ4U (A) – widoczny jest wzrost intensywności barwy wraz ze wzrostem stężenia doksorubicyny (od lewej do prawej strony płytki) oraz po 4 h inkubacji z odczynnikiem EZ4U (B) – widoczne jest zróżnicowanie intensywności barwy doksorubicyny zależne od jej stężenia, szczególnie w dwóch dolnych szeregach studzienek, stanowiących kontrolę zabarwienia tła. Z uwagi na zaobserwowany, wizualnie i w pomiarach (dane niezamieszczone), wpływ barwy doksorubicyny na wartości absorbancji podczas obliczeń, wartości absorbancji uzyskane z hodowli po inkubacji z odczynnikiem EZ4U pomniejszono o wartości absorbancji uzyskane dla kontroli z szeregiem odpowiednich rozcieńczeń doksorubicyny.

Ze względu na wykazany w tej pracy wpływ barwy doksorubicyny na końcowe wartości absorbancji, pojawia się wniosek, że dla badania barwnych substancji protokół oznaczania cytotoksyczności zaproponowany przez wytwórcę testu, powinien uwzględniać kontrolę zabarwienia. W przeciwnym wypadku zmiana absorbancji, będąca wynikiem wpływu barwy badanej substancji, może znacząco wpływać na uzyskiwane wyniki. Podejmując badania cytotoksyczności warto już na wstępie przeprowadzić optymalizację przebiegu eksperymentu, m.in. pod względem doboru linii komórkowej, liczby komórek, czasu inkubacji z badaną substancją oraz doboru właściwych kontroli. W naszej pracy wydłużenie czasu inkubacji z doksorubicyną do 48 h dla większości linii komórkowych i 72 h dla WS-1 było związane z próbą uzyskania wyraźniejszych efektów działania tego leku na badane komórki.

Badania cytotoksyczności substancji używanych w farmakoterapii nowotworów [1–3] są najczęściej wykonywane z zastosowaniem uznanych i sprawdzonych eksperymentalnie testów opartych na redukcji formazanu. Nie zawsze jednak te testy mogą być stosowane w ocenie cytotoksyczności. Przy badaniu leków wpływających na obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników pojawiają się zmiany komórkowe, które mogą wpływać na wzrost żywotności komórek i jednocześnie na wyniki tych badań. Wykazano np., że obecność flufenazyny, leku antypsychotycznego, o aktywności, m.in. chemioprewencyjnej wobec komórek nowotworowych, w hodowli komórkowej limfocytów może wpływać na ocenę cytotoksyczności leku z zastosowaniem MTT [8]. W takich

sytuacjach sugeruje się zwykle zastosowanie dodatkowych technik, umożliwiających badanie innych zmian cytotoksycznych, wywołanych przez zmianę innych procesów komórkowych.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników badania cytotoksyczności doksorubicyny z zastosowaniem dwóch testów, EZ4U i MTT oraz pięciu zróżnicowanych linii komórkowych, stwierdzono, że obie techniki są użyteczne w badaniach cytotoksyczności. Wartości  $IC_{50}$  uzyskane z zastosowaniem testu EZ4U charakteryzowały się znacznie mniejszą zmiennością wewnątrz- i międzyeksperymentalną, a przez to wyższą powtarzalnością oraz precyzją pośrednią. Test ten pozwolił na określenie wartości  $IC_{50}$  dla wszystkich badanych linii, był przy tym łatwiejszy w wykonaniu i mniej czasochłonny niż MTT.

*Autorzy składają podziękowania dr Beacie Gruber za krytyczne przeczytanie manuskryptu tej pracy i cenne uwagi.*

Otrzymano: 2009.02.24 · Zaakceptowano: 2009.03.10

## Piśmiennictwo

1. Niu Q., Zhao C., Jing Z.: An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 2001, 251, 1-2, 11-19.
2. Bopp S.K., Lettieri T.: Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol.* 2008, 8, 8.
3. Dorobek Ł., Szcześniak P., Thor P. i wsp.: Aktualne kierunki poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych. *Geriatrics* 2008, 2, 37-46.
4. Chiba K., Kawakami K., Tohyama K.: Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in vitro* 1998, 12, 3, 251-258.
5. Fotakis G., Timbrell J.A.: *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 2006, 160, 2, 171-177.
6. Crouch S.P., Kozłowski R., Slater K.J. i wsp.: The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 1993, 160, 1, 81-88.
7. Boojar M.M., Goodarzi F.: Cytotoxicity and the levels of oxidative stress parameters in W138 cells following 2 macrocyclic crown ethers treatment. *Clin. Chim. Acta* 2006, 364, 1-2, 321-327.
8. Jaszczyszyn A., Gąsiorowski K.: Limitations of the MTT assay in cell viability testing. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2008, 17, 5, 525-529.
9. Voigt W.: Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods. Mol. Med.* 2005, 110, 39-48.
10. Mossman T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application for proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983, 65, 55-63.
11. Vistica D.T., Skehan P., Scudiero D. i wsp.: Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991, 51, 10, 2515-20.
12. Anuszewska E., Gruber B., Koziarowska J.: Studies on adaptation to adriamycin in cells pretreated with hydrogen peroxide. *Biochem. Pharmacol.* 1997, 54, 5, 597-603.
13. Ermer J., McB. Miller J.H.: Method validation in pharmaceutical analysis. A guide to best practice. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2005, S. 21-51.
14. Gruber B., Anuszewska E.: Adaptacja testu do oceny działania cytotoksycznego *in vitro*. *Biuletyn Instytutu Leków* 1994, 38, 3, 5-10.