

Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro*

О. В. Головинская*, М. Л. Байкова, Н. А. Алпатова, Д. А. Зубков, В. В. Фоменко, Л. А. Гайдерова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

При оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима отечественных и зарубежных производителей биологическим методом *in vitro* применяются различные виды красителей. Для унификации методики с использованием клеточной культуры, позволяющей оценивать специфическую активность филграстима, важен выбор одного из красителей, используемых для окрашивания клеток. **Цель работы:** сравнительное изучение красителей тетразолиевого и резазуринового рядов в испытаниях по определению способности филграстима активировать пролиферацию чувствительных клеток. **Материалы и методы:** использовали клеточную линию NFS-60 (клетки миелобластома мышей), 2-й Международный стандарт гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (МСО), красители МТТ, МТС, WST-1, alamarBlue. Оценку пролиферативной активности клеток проводили в условиях *in vitro*. Уровень пролиферации клеток учитывали по интенсивности флуоресценции или абсорбции. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Origin Pro 9.1. и приложения Microsoft Excel. **Результаты:** приведена сравнительная характеристика наиболее часто используемых красителей. Описана процедура выбора оптимальных условий проведения испытания с некоторыми из изучаемых красителей. Для анализа потенциальной возможности влияния на конечный результат рассмотрены такие факторы, как продолжительность инкубации клеточной суспензии с МСО и с красителем, состав лизирующего буфера (для окрашивания с помощью МТТ) и различные режимы считывания. Несмотря на то что все изученные красители в заданных условиях испытания позволили получить воспроизводимые кривые «доза–эффект», значения 50% эффективных концентраций статистически значимо не отличались только между испытаниями с использованием трех красителей: МТТ, МТС и alamarBlue ($p > 0,05$). **Выводы:** лучшая воспроизводимость результатов была получена в испытаниях с использованием МТТ и alamarBlue. Более простая и менее продолжительная процедура испытания с alamarBlue, отсутствие стадии лизиса клеток и необходимости применения дополнительных реагентов позволяет рекомендовать этот краситель для унификации методики, проводимой в связи с разработкой проекта общей фармакопейной статьи.

Ключевые слова: анализ пролиферации клеток; МТТ-тест; специфическая биологическая активность филграстима; соли тетразолия; alamarBlue; резазурин; МТС; WST-1; клеточная линия NFS-60; гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

Для цитирования: Головинская ОВ, Байкова МЛ, Алпатова НА, Зубков ДА, Фоменко ВВ, Гайдерова ЛА. Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(3):193–201. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-193-201>

***Контактное лицо:** Головинская Ольга Вячеславовна; golovinskaya@expmed.ru

Comparative Analysis of Dyes Used in the Assessment of Filgrastim Products Specific Activity by Biological *in vitro* Methods

O. V. Golovinskaya*, M. L. Baykova, N. A. Alpatova, D. A. Zubkov, V. V. Fomenko, L. A. Gayderova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Assessment of specific activity of Russian and foreign-made filgrastim products by biological *in vitro* methods is performed using different types of dyes. It is important to choose one cell staining dye in order to align the procedure of filgrastim specific activity assessment using cell culture. **The aim of this study** was to perform comparative assessment of tetrazolium and resazurin dyes in tests determining filgrastim ability to activate proliferation of sensitive cells. **Materials and methods:** NFS-60 (mouse myelogenous leukemia) cell line, 2nd International Standard for Granulocyte Colony Stimulating Factor (IS), as well as MTT, MTS, WST-1, and alamarBlue dyes were used in the study. Proliferative activity of cells was assessed *in vitro*. The level of cell proliferation was assessed by fluorescence or absorbance intensity. Origin Pro 9.1. and Microsoft Excel applications were used for statistical processing of the obtained results. **Results:** the paper compares characteristics of the most widely used dyes.

It describes the procedure for choosing optimal test conditions for some of the studied dyes. The authors analysed the potential of some factors, such as duration of cell suspension incubation with IS and with a dye, composition of the lysis buffer (for MTT staining), and different readout modes, to influence the final results. Despite the fact that all the studied dyes gave reproducible dose–response curves under the given test conditions, 50% effective concentrations showed no statistically significant differences in tests with only three dyes: MTT, MTS, and alamarBlue ($p > 0.05$). **Conclusions:** better reproducibility of results was obtained in tests using MTT and alamarBlue. The test procedure using alamarBlue is easier to perform and less time-consuming, it does not include the cell lysis stage and does not require additional reagents, therefore this dye may be recommended for harmonisation of the test procedure to be elaborated for the Russian Pharmacopoeia.

Key words: cell proliferation assay; MTT test; filgrastim specific biological activity; tetrazolium salts; alamarBlue; resazurin; MTS; WST-1; NFS-60 cell line; granulocyte colony stimulating factor

For citation: Golovinskaya OV, Baykova ML, Alpatova NA, Zubkov DA, Fomenko VV, Gayderova LA. Comparative analysis of dyes used in the assessment of filgrastim products specific activity by biological *in vitro* methods. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):193–201. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-193-201>

Corresponding author: Olga V. Golovinskaya; golovinskaya@expmed.ru

Разработка методов оценки эффективности биотехнологических лекарственных препаратов тесно связана с культивированием клеток, поскольку под влиянием биологически активных веществ клетки могут претерпевать изменения в морфологии, скорости клеточного роста, времени гибели и степени дезинтеграции [1]. Использование соответствующих культур клеток позволяет установить механизм действия биотехнологических препаратов непосредственно на клеточном уровне и учесть их сложные синергические и (или) разнонаправленные эффекты [2].

При изучении биологических эффектов указанных препаратов оценка степени пролиферации клеток нередко является основной целью эксперимента [3, 4]. Существует множество способов определения количества и оценки жизнеспособности клеток, однако в биотехнологии, клеточной биологии, гистохимии, а также при проведении биомедицинских исследований особенно часто используются методы определения метаболической активности. При этом интенсивность считываемого сигнала прямо пропорциональна количеству пролиферирующих клеток [1, 3, 5].

Активность гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) проявляется за счет связывания со специфическим трансмембранным рецептором различных гемопозитических клеток (стволовые клетки, предшественники мультипотентных клеток, предшественники миелоидных клеток, нейтрофилов и моноцитов). В клинической практике используются препараты Г-КСФ, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим) или в системе клеток яичника китайского хомячка (СНО) (ленограстим). Специфическую активность препаратов филграстима оценивают биологическим методом *in vitro* по стимулирующему действию на пролиферацию клеток (линий NFS-60 или M-NFS-60), рост которых зависит от присутствия гемопозитических факторов [6].

Сравнительный анализ методик оценки специфической активности с использованием биологического метода в условиях *in vitro*, включенных в нормативную документацию лекарственных средств на основе филграстима отечественных и зарубежных производителей, а также методики, изложенной в Европейской фармакопее¹, выявил наиболее существенные различия в процедурах проведения испытаний и позволил сделать вывод о необходимости унификации указанной методики. Исследования, проведенные нами ранее (данные не представлены), позволили выбрать наиболее чувствительную к фил-

грастиму линию клеток мышинного миелолейкоза (NFS-60), установить оптимальный диапазон концентраций международного стандартного образца Г-КСФ для определения активности лекарственных средств на основе филграстима (от 104,0 до 0,05 МЕ/мл), а также определить оптимальное значение плотности клеточной суспензии ($1,5 \times 10^5$ кл/мл).

В качестве красителей, используемых для идентификации клеток, пролиферирующих под влиянием филграстима в условиях *in vitro*, согласно нормативной документации на зарегистрированные препараты, применяются такие, как MTT, WST-1, alamarBlue, ХТТ, MTS; в соответствующей монографии Европейской фармакопее² рекомендовано использование MTS. На завершающем этапе унификации методики требовалось сравнить особенности и условия использования разных видов красителей.

Цель работы — сравнительное изучение красителей тетразолиевого и резазуринового рядов в испытаниях по определению способности филграстима активировать пролиферацию чувствительной линии клеток.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: подбор экспериментальным путем оптимальных условий для проведения испытания с использованием каждого из красителей (MTT, WST-1, alamarBlue, MTS); на основании результатов проведенных испытаний определение красителя, наилучшим образом подходящего для унифицированной методики.

Перечень и характеристика используемых красителей

В данном исследовании для оценки степени пролиферации культур клеток в качестве красителей использовали различные коммерчески доступные реактивы, такие как MTT, WST-1, alamarBlue, MTS.

Первым и, вероятно, наиболее известным метаболическим красителем является 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (MTT) [3, 4].

MTT-тест — количественный колориметрический анализ, в котором растворимая желтая тетразолиевая соль МТТ проникает через мембрану живых клеток и восстанавливается митохондриальными дегидрогеназами до нерастворимых синих кристаллов формазана [5, 7].

Ранее предполагалось, что тетразолиевая соль восстанавливается только в митохондриях, но позже было показано, что в образовании формазана также участвуют восстановители и ферменты, расположенные в других органеллах [4, 5, 8, 9].

¹ 07/2019:2206 Filgrastim concentrated solution. European Pharmacopoeia 10.0.

² Там же.

Образование игольчатых кристаллов нарушает целостность и метаболизм клетки. Поскольку кристаллы образуются внутриклеточно, протоколы анализа с использованием МТТ включают такие процедуры, как лизис клеток и растворение кристаллов формазана перед этапом считывания результатов [3]. Кристаллы формазана растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) или в смеси HCl–изопропанол [1]. Также могут быть использованы и другие органические растворители, например раствор натрия додецилсульфата [7], диоксан, циклогексан, тетрагидрофуран, диметилформамид и т. д. [5].

При лизисе происходит разрушение живых клеток, то есть МТТ-тест является конечной точкой исследования и не позволяет выполнять анализы в режиме реального времени [1, 3].

Преимуществами указанного теста считают простоту, экономичность и отличную воспроизводимость результатов [1], однако очевидными недостатками являются неизбежная гибель клеток и дополнительная стадия растворения, необходимая для последующего измерения поглощения формазана [3].

Для исключения этапа растворения кристаллов были разработаны тетразолиевые красители второго поколения (сульфированные соли тетразолия), такие как MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфобензил)-2Н-тетразолий), ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфобензил)-2Н-тетразолий-5 карбоксанилид) и производные WST (водорастворимые соли тетразолия) [4, 5, 10]. Клеточное поглощение этих красителей ограничено, поскольку их гидрофильный характер и отрицательный заряд делают их в значительной степени непроницаемыми для клеток, следовательно, механизмы восстановления сульфированных тетразолиевых солей значительно отличаются от восстановления МТТ [5]. Научные данные свидетельствуют о том, что их восстановление происходит на поверхности клетки или на уровне плазматической мембраны посредством трансмембранного переноса электронов [10]. Как правило, все сульфированные соли тетразолия используются в сочетании с акцепторами электронов, такими как mPMS (5-метилфеназин метилсульфат) [10], PMS (метилсульфат 5-метил-феназина), PES (этилсульфат феназина) [3] или менадион, и производят водорастворимые сульфированные формазаны [5, 9]. Это позволяет выполнять анализы в реальном времени [3].

Краситель MTS обычно используется в сочетании с акцепторами электронов PMS или PES, что повышает его чувствительность [4, 10].

Краситель WST-1 (натрия 5-(2,4-дисульфобензил)-2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-2Н-тетразолий) — отрицательно заряженная дисульфированная внутренняя соль, содержащая йодный остаток, которая, предположительно, накапливается в плазматической мембране из-за ее амфифильного характера [5, 10]. Поскольку WST-1 более устойчива в присутствии акцептора электронов mPMS, была создана коммерческая система для оценки пролиферации клеток, содержащая одновременно WST-1 и mPMS [10].

По сравнению с МТТ красители MTS и WST добавляются в культуру клеток без дополнительных стадий, показывают лучшую воспроизводимость и более высокую чувствительность [11]. Кроме того, некоторые протоколы тестов с использованием МТТ требуют полного удаления культуральной среды на стадии растворения кристаллов формазана, что трудновыполнимо при использовании суспензионных культур [1].

Еще одной разновидностью красителей, которые аналогично тетразолиевым используются в качестве индикаторов клеточной метаболической активности, являются резазури-

новые красители [4, 8, 9]. Методы определения с их участием основаны на способности живых клеток восстанавливать водорастворимый темно-синий нефлуоресцирующий резазуридин до водорастворимого розового флуоресцентного резорурфина, который диффундирует из клеток в культуральную среду, в которой его можно определить колориметрически или флуориметрически, при этом последний способ признан более чувствительным [1, 4, 8, 12]. Образование этого водорастворимого флуоресцентного продукта является главным преимуществом указанных красителей по сравнению с красителями на основе соли тетразолия [3, 8].

Кроме того резазуридин, в отличие от МТТ, восстанавливается более широким спектром ферментов: митохондриальными или микросомальными ферментами, ферментами дыхательной цепи. Также в восстановлении могут участвовать акцепторы электронов, предпочтительно PMS [1, 3].

Методологические особенности эксперимента с резазурином позволяют использовать в исследовании суспензионные культуры и не требуют лизиса исследуемых клеток, т.е. измерение степени пролиферации клеток при использовании резазурина может быть первой, но не конечной точкой эксперимента [1, 8]. Сообщается также, что анализы на основе резазурина более чувствительны и надежны, чем анализы с использованием тетразолиевых красителей [3].

Краситель alamarBlue — это коммерческий реагент для измерения жизнеспособности клеток на основе резазурина. Его преимуществом является простота использования, нетоксичность для клеток, а также стабильность результатов и легко различимое визуальное изменение цвета окрашивания [13].

Материалы и методы

Материалы

1. Клеточная линия: NFS-60 (цитокинзависимые клетки лимфобластного миелолейкоза мышей) из коллекции культур клеток CLS (Cell Line Service, код 400301, Германия).
2. Культуральная среда: RPMI-1640 без глутамина (ПанЭко, Россия, кат. № с330п), содержащая инактивированную фетальную бычью сыворотку (HyClone, США, кат. № SH30070.03), GlutaMAX (Gibco, США, кат. № 35050061), NEPEP (Gibco, США, кат. № 15630-080) и раствор гентамицина 50 мг/мл (ПанЭко, Россия, кат. № A011).
3. Фактор роста при рутинном культивировании клеток: интерлейкин-3 (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № 14144).
4. Красители:
 - МТТ, 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (Sigma-Aldrich, США, кат. № M2128);
 - MTS, реагент для определения степени пролиферации клеток, содержащий MTS и PES в одном растворе (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, США, кат. № G3580);
 - WST-1, реагент для определения степени пролиферации клеток, содержащий предварительно смешанные WST-1 и реагент — переносчик электронов (Premix Cell Proliferation Assay, Takara Bio, Германия, кат. № MK400);
 - alamarBlue™, реагент для определения жизнеспособности клеток (Cell Viability Reagent, Invitrogen, США, кат. № DAL1100);
 - раствор трипанового синего 0,4% (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № T8154).
5. 2-й международный стандартный образец филграстима (MCO), (WHO 2nd International Standard for Granulocyte Colony Stimulating Factor, Human rDNA-derived, NIBSC code 09/136).

6. Буферный раствор для отмывания клеток от ростового фактора: DPBS, фосфатно-солевой буферный раствор в модификации Дульбекко (Gibco, США, кат. № 141190-144).

7. Реагенты: натрия додецилсульфат, натрия ацетат безводный, N,N-диметилформамид, кислота соляная — аналитического класса.

Методы

Активность МСО Г-КСФ оценивали биологическим методом, основанным на способности филграстима стимулировать пролиферацию клеток линии NFS-60 *in vitro*.

Клетки культивировали в ростовой среде (RPMI-1640 без глутамина, 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 2 ммоль GlutaMAX, 25 ммоль HEPES, 50 мкг/мл раствора гентамицина), содержащей в качестве фактора роста интерлейкин-3 (концентрация 2 нг/мл), в CO₂-инкубаторе (IG 150 JOUAN SA, Франция) в увлажненной атмосфере 4–6% CO₂ при температуре 37 °С. Для поддержания жизнеспособности пересевов клеток проводили каждые 2–3 сут. Плотность клеточной суспензии составляла (2,5–5) × 10⁴ кл/мл в зависимости от интервала между пассажами.

Для подготовки к испытанию клеточную суспензию центрифугировали (Erpendorf, Германия, AG 5804R) при ускорении 250 g в течение 5 мин, удаляли супернатант и ресуспендировали клетки в 15 мл DPBS. Трижды повторяли процедуру центрифугирования для тщательной отмывки клеток от ростового фактора. Затем ресуспендировали осадок в 5 мл среды для анализа (состав среды для анализа аналогичен составу ростовой среды, но не содержит ростовой фактор) и определяли количество и жизнеспособность клеток методом окрашивания с помощью 0,4% раствора трипанового синего [3]. В испытаниях использовали суспензию с плотностью 1,5 × 10⁵ кл/мл и жизнеспособностью не менее 90%.

Отдельное испытание для каждого набора исследуемых параметров включало минимум 6 независимых определений, для каждого из которых готовили отдельные разведения МСО с активностью 208 МЕ/мл (концентрация 2 нг/мл). Далее производили 12 последовательных двукратных разведений от 208 до 0,1 МЕ/мл (0,001 нг/мл). Образцы каждой серии независимых разведений в трех повторностях вносили в 96-луночный культуральный планшет (Corning, США, кат. № 3599). Затем в лунки, содержащие разведения МСО, вносили равные объемы ранее приготовленной клеточной суспензии с концентрацией 1,5 × 10⁵ кл/мл (конечная концентрация МСО в лунках, таким образом, снижалась в 2 раза).

В качестве контрольных на каждом планшете дополнительно использовали по 5 лунок (контроль среды и контроль отмывания клеток от ростового фактора), в которые перед добавлением клеточной суспензии вносили среду для анализа и ростовую среду, содержащую филграстим соответственно.

Поскольку для некоторых красителей требовалось подобрать оптимальные экспериментальные условия, дальнейшая процедура анализа включала комбинацию нескольких параметров. Сравнивали различные периоды инкубации клеток с МСО, периоды инкубации с красителями, различные лизирующие буферные растворы для растворения кристаллов формазана (краситель МТТ), а также варианты регистрации сигнала.

Планшеты для испытания после внесения клеток инкубировали в CO₂-инкубаторе во влажной атмосфере 4–6% CO₂ при температуре 37 °С в течение 48 или 72 ч. За несколько часов до внесения красителей аликвоты WST-1 и MTS размораживали. Для МТТ-теста готовили 0,5% раствор МТТ (150 мг МТТ рас-

творяли в 30 мл раствора DPBS). Все красители перед использованием выдерживали при комнатной температуре.

В случае использования тетразолиевых красителей по окончании периода инкубации во все лунки планшетов вносили МТТ, MTS или WST-1 в соответствующих объемах (20% от объема содержимого лунки для MTS и 10% от объема содержимого лунки для других реагентов/красителей) и продолжали инкубацию в тех же условиях в течение 3,5 ч. Учет результатов проводили на планшетном многофункциональном анализаторе (EnSpire, PerkinElmer, Inc., США), при этом в испытаниях с MTS и WST-1 регистрировали абсорбцию при длине волны 490 нм (MTS) или длине волны 450 нм (WST-1).

Испытания с МТТ отличались необходимостью растворения кристаллов формазана в лизирующем буферном растворе. Проведено сравнительное изучение двух растворов, различающихся по составу:

- лизирующий буфер № 1, содержащий 40 г натрия додецилсульфата, 100 мл ацетатного буфера (2,05 г натрия ацетата безводного до 500 мл воды для инъекций, pH 4,7), 100 мл N,N-диметилформамида (DMFA), pH 4,7;

- лизирующий буфер № 2, содержащий 50 г натрия додецилсульфата, 200 мл 0,02 М раствора соляной кислоты.

Инкубация с каждым из используемых для лизиса буферных растворов продолжалась в течение 20 ч, после чего регистрировали уровень абсорбции двумя способами: при длине волны 490 или 550 нм с корректировкой оптической плотности при 690 нм.

В случае использования резазуринового красителя по окончании периода инкубации клеточной суспензии с МСО во все лунки планшетов вносили alamarBlue (10% от объема содержимого лунки) и продолжали инкубацию в тех же условиях в течение 4 и 6 ч. Затем регистрировали уровень флуоресценции при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны эмиссии 620 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation, США), используя регрессионный анализ и 4-параметрическую логарифмическую логистическую модель (4PL) (как рекомендовано в монографии Statistical analysis Европейской фармакопеи³). Диаграммы строили с помощью приложения Microsoft Excel (версия 14.6.4).

Для каждой отдельной серии разведений МСО строили кривые зависимости «доза–эффект». В качестве параметров приемлемости кривой использовали коэффициент детерминации R², характеризующий степень зависимости между регрессионной моделью и исходными данными, а также динамический диапазон анализа, определяемый самым низким и самым высоким сигналами, полученными для серии разведений МСО. Для оценки динамического диапазона определяли отношение максимального значения сигнала (верхняя асимптота) к минимальному значению (нижняя асимптота). Средние значения указанных параметров рассчитывали для всех независимых определений в рамках испытания с одинаковым набором условий.

Эффективные концентрации (EC₅₀), приводящие к 50% усилению пролиферативной активности клеток, определяли исходя из экспериментальных данных, полученных для каждой серии независимых разведений МСО, внесенных на планшет в трех повторностях.

Средние значения EC₅₀ вычисляли исходя из минимум шести независимых определений в рамках опыта с одинаковым набором условий.

³ 01/2020:50300 Statistical analysis. European Pharmacopeia 10.0.

На основе значений EC_{50} оценивали вариабельность между испытаниями. Для этого определяли коэффициенты вариации (CV, %) как минимум шести отдельных значений EC_{50} для испытаний с одинаковым набором параметров.

Результаты и обсуждение

О правильно подобранных условиях эксперимента свидетельствует возможность получения надежных и воспроизводимых результатов. Приемлемыми считали следующие характеристики кривой зависимости «доза–эффект»: наличие линейного участка, включающего минимум 3 точки; соотношение асимптот ≥ 2 ; коэффициент детерминации $\geq 0,95$.

Оптимальные параметры проведения испытаний для красителей MTT и alamarBlue установили экспериментальным путем. В анализах с применением коммерческих наборов тетразолиевых красителей (MTS и WST-1) использовали рекомендации

производителей. В таблице 1 приведены обобщенные условия по этапам каждого испытания.

Средние значения коэффициентов детерминации и соотношений верхней и нижней асимптот для графиков зависимости «доза–эффект» каждого испытания приведены в таблице 2.

Все данные, представленные в таблице 2, удовлетворяют установленным критериям приемлемости. Коэффициенты детерминации $>0,95$ свидетельствуют о низкой вероятности ошибки в каждой отдельно взятой экспериментальной модели. Однако результаты испытаний, проведенных в разных условиях, имеют отличия.

При использовании красителя MTT оценивали влияние продолжительности инкубации клеточной суспензии с MCO в течение 48 и 72 ч (испытания 1 и 3 соответственно) на изменение зависимости «доза–эффект». Измерение оптической плотности проводили при длине волны 490 нм. При инкубации в течение 72 ч значение R^2 было выше ($p = 0,008$) по

Таблица 1. Условия проведения испытаний по выбору оптимальных параметров
Table 1. Test conditions for selection of optimal parameters

Номер опыта Test number	Количество независимых испытаний Number of independent tests	Время инкубации MCO* с клетками, ч Time of incubation of IS* with cells, h	Краситель Dye	Время инкубации с красителем, ч Time of incubation with dye, h	Лизирующий буфер Lysis buffer	Время инкубации с лизирующим буфером, ч Time of incubation with lysis buffer, h	Длина волны для учета результатов, нм Wave length, nm	
							Флуоресценция Fluorescence	Абсорбция Absorbance
1	6	48	MTT	3,5	№ 1	20	–	490
2	6	48	MTT	3,5	№ 1	20	–	550–690
3	6	72	MTT	3,5	№ 1	20	–	490
4	6	72	MTT	3,5	№ 1	20	–	550–690
5	6	72	MTT	3,5	№ 2	20	–	490
6	6	72	MTT	3,5	№ 2	20	–	550–690
7	12	48	MTS	3,5	–	–	–	490
8	6	72	WST1	3,5	–	–	–	450
9	6	48	aB	4	–	–	530/620	–
10	6	48	aB	6	–	–	530/620	–
11	6	72	aB	4	–	–	530/620	–

Примечание. «–» неприменимо; aB — alamarBlue.

*2-й Международный стандартный образец Г-КСФ.

Note. – not applicable; aB—alamarBlue.

*WHO 2nd International Standard for Granulocyte Colony Stimulating Factor.

Таблица 2. Средние значения коэффициентов детерминации и соотношений верхней и нижней асимптот для каждого испытания
Table 2. Mean values of determination coefficients and upper to lower asymptote ratios for each test

Номер опыта Test number	Краситель Dye	Количество независимых испытаний Number of independent tests	Количество точек линейного участка Number of points in the line segment	Среднее значение коэффициента детерминации Mean determination coefficient	Среднее значение соотношений верхней и нижней асимптот Mean upper to lower asymptote ratio
1	MTT	6	3	0,96	2,05
2	MTT	6	3	0,96	2,44
3	MTT	6	3	0,98	2,90
4	MTT	6	3	0,99	3,77
5	MTT	6	3	0,97	2,47
6	MTT	6	3	0,96	3,42
7	MTS	12	3	0,98	2,40
8	WST1	6	3	0,98	2,05
9	aB	6	3	0,99	2,67
10	aB	6	3	0,99	3,19
11	aB	6	3	0,99	2,84

Примечание. aB — alamarBlue.

Note. aB—alamarBlue.

сравнению со значением при 48-часовом периоде инкубации. Значение соотношения верхней и нижней асимптот графика в первом случае также было выше ($p = 0,00002$). Изменение параметров считывания результатов на 550 нм с корректировкой оптической плотности при 690 нм (испытания 2 и 4) не привело к существенному изменению параметров кривой в обоих испытаниях, различия оставались статистически значимыми ($p < 0,05$). В дальнейших испытаниях с красителем МТТ инкубацию клеток с МСО проводили в течение 72 ч.

Проведено изучение потенциальной возможности использования альтернативных лизирующих буферных растворов в испытаниях с МТТ. При сравнении результатов испытаний, проведенных с растворами № 1 и 2 (испытания 3 и 5 соответственно), установлено, что в обоих случаях характеристики кривой зависимости «доза–эффект» были приемлемыми: $R^2 > 0,95$, отношение максимального значения сигнала к минимальному >2 (табл. 2). Однако при изменении параметров считывания с 490 нм на 550 нм с корректировкой при 690 нм (испытания 4 и 6) отмечены более высокие значения коэффициента детерминации и более широкий динамический диапазон ($p < 0,05$) в случае использования для лизиса клеток буферного раствора с DMFA (буфер № 1).

На основании полученных данных были выбраны оптимальные условия проведения испытания при применении красителя МТТ, а именно: инкубация клеток с МСО в течение 72 ч, использование для растворения кристаллов формазана лизирующего буфера № 1 и регистрация сигнала поглощения при 550 нм с корректировкой при 690 нм (табл. 3).

В испытаниях при использовании для окрашивания пролиферирующих клеток реагентов MTS CellTiter 96® (испытание 7, проведено 12 независимых определений) и WST-1 (испытание 8, проведено 6 независимых определений) получены результаты, свидетельствующие о том, что воспроизводимые кривые зависимости «доза–эффект» имеют выраженный линейный участок, средний коэффициент детерминации равен 0,98, отношение максимального значения оптической плотности к минимальному >2 в обоих случаях.

В испытаниях с использованием alamarBlue изучали влияние разной продолжительности инкубации клеток с МСО (в течение 48 и 72 ч) (испытания 9 и 11), а также определяли оптимальную продолжительность инкубации суспензии клеток с красителем (в течение 4 и 6 ч) (испытания 9 и 10 соответственно).

Как видно из данных, представленных в таблице 2, значения R^2 при 48- и 72-часовом периодах инкубации оказались равными (0,99). Отношения максимального значения флуо-

ресценции к минимальному также существенно не отличались ($p > 0,05$). Полученные данные позволили выбрать 48-часовой период инкубации для последующих испытаний и таким образом сократить их продолжительность. Наблюдение за развитием окрашивания в течение 4 и 6 ч после внесения alamarBlue показало, что с увеличением периода инкубации коэффициент детерминации не изменялся, а динамический диапазон увеличился незначительно ($p = 0,052$) за счет повышения значений флуоресценции «верхнего плато», т. е. только для используемых высоких концентраций МСО. Поэтому далее применяли 4-часовую продолжительность инкубации с alamarBlue.

Следует отметить, что для красителя alamarBlue приемлемо считывание сигнала колориметрически и флуориметрически, однако по данным литературы последний способ признан более чувствительным [1, 4, 8, 12]. В связи с этим в данном исследовании измерение абсорбции не проводили.

По результатам проведенного этапа испытаний для исследуемых красителей определены оптимальные условия их использования в методике оценки способности филграстима стимулировать пролиферацию клеток линии NFS-60 *in vitro*. Обобщенные результаты представлены в таблице 3.

В биологических методах анализа с использованием клеточных культур одной из ключевых характеристик кривой «доза–эффект» является полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}), т. е. концентрация вещества, приводящая к 50% активации уровня пролиферации клеток.

На следующем этапе исследования оценивали, использование какого из красителей позволяет получить наиболее достоверные и воспроизводимые результаты, для этого учитывали средние значения EC_{50} и коэффициенты вариации CV (%).

Расчетные значения EC_{50} , приведенные на рисунке 1, являются средними значениями для 6 (12) независимых определений \pm стандартное отклонение, полученными в испытаниях с подобранными условиями для красителей МТТ и alamarBlue, а также в испытаниях с MTS и WST-1 (табл. 3). Данные наглядно демонстрируют, что в экспериментах с использованием МТТ, MTS и alamarBlue точки перегиба кривой находились на одном уровне и статистически значимо не отличались друг от друга ($p > 0,05$). Значение полумаксимальной эффективной концентрации, полученное при использовании красителя WST-1, оказалось самым высоким, что свидетельствует о его меньшей чувствительности в примененной экспериментальной модели по сравнению с другими красителями ($p < 0,05$) и требует тщательного подбора условий проведения испытания.

Таблица 3. Оптимальные условия проведения испытания для каждого красителя
Table 3. Optimal test conditions for each dye

Краситель Dye	Номер опыта* Test number*	Время инкубации МСО** с клетками, ч Incubation time of 2nd IS** with cells, h	Время инкубации с красителем, ч Time of incubation with dye, h	Лизирующий буфер Lysis buffer	Время инкубации с лизирующим буфером, ч Time of incubation with lysis buffer, h	Длина волны для учета результатов, нм Wave length, nm	
						Флуоресценция Fluorescence	Абсорбция Absorbance
МТТ	4	72	3,5	№ 1	20	–	550–690
aB	9	48	4	–	–	530/620	–
МТS	12	48	3,5	–	–	–	490
WST-1	14	72	3,5	–	–	–	450

Примечание. «–» неприменимо; aB — alamarBlue.

*В соответствии с таблицами 1 и 2.

**2-й Международный стандартный образец Г-КСФ.

Note. – not applicable; aB—alamarBlue.

*According to tables 1 and 2.

**WHO 2nd International Standard for Granulocyte Colony Stimulating Factor.

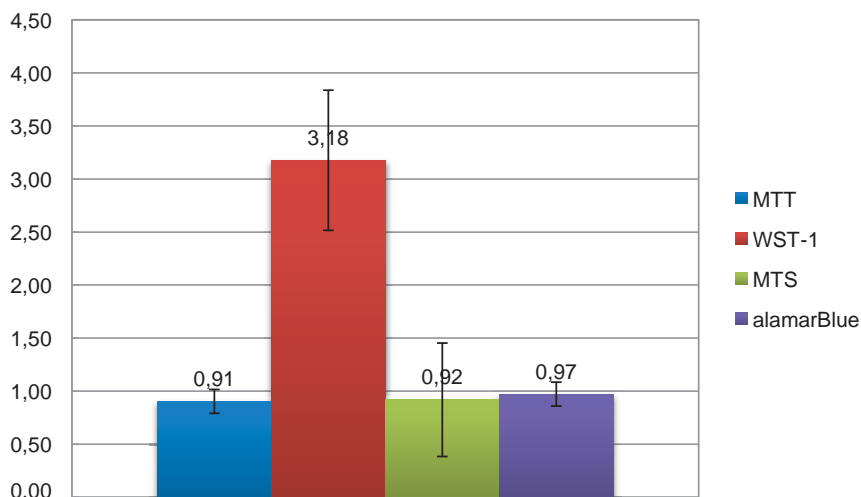


Рис. 1. Средние значения EC₅₀ для испытаний с MTT, WST-1, MTS и alamarBlue. Ось ординат — значения EC₅₀ (ME); ось абсцисс — красители.

Fig. 1. Mean EC₅₀ values for tests with MTT, WST-1, MTS and alamarBlue. Y axis—EC₅₀ values (IU); X axis—dyes.

Далее сравнивали результаты испытаний с применением красителей MTT, MTS и alamarBlue.

Прецизионность аналитической методики характеризует степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях, и выражается коэффициентом вариации.

В таблице 4 приведены значения коэффициентов вариации между значениями EC₅₀, полученными для независимых определений в рамках испытания с одинаковым набором условий (в соответствии с таблицей 3). Так, наиболее низкая вариабельность между значениями EC₅₀ получена в испытании 4 с красителем MTT, что соответствует результатам других исследователей [1, 8, 9]. Сходимость результатов в испытании 9 была приемлемой, однако в испытании 7 значение коэффициента вариации было неудовлетворительным. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения дополнительных исследований для подбора оптимальных условий испытания с использованием красителя MTS.

Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало потенциальное применение таких известных красителей, как MTT, alamarBlue, MTS и WST-1, в испытаниях по оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro*. Подобраны оптимальные условия проведения испытания для части проанализированных красителей.

К биологическим методикам применяются строгие требования: они должны быть достаточно чувствительными для

выявления небольших различий, но достаточно надежными для получения воспроизводимых результатов в различных контролируемых экспериментальных условиях. В испытаниях с применением всех красителей получены результаты, свидетельствующие о воспроизводимости кривых зависимости «доза–эффект» и приемлемости значений исследуемых параметров кривых заданным требованиям.

При сравнении значений полумаксимальных эффективных концентраций было выявлено, что в MTT-тесте, а также при использовании красителей MTS и alamarBlue наблюдались значительно более низкие средние значения EC₅₀, чем при применении WST-1 (0,91 ± 0,06; 0,92 ± 0,53; 0,97 ± 0,11 и 3,18 ± 0,77 ME соответственно), что позволяет сделать вывод о большей чувствительности испытаний с MTT, MTS и alamarBlue. Небольшая вариабельность значений EC₅₀ в рамках одного испытания свидетельствует о повышении устойчивости методики при окрашивании с помощью MTT и alamarBlue (6,29 и 11,55% соответственно). При окрашивании клеток MTS вариабельность полученных результатов была значительно выше (58,04%).

Учитывая, что в испытаниях с использованием WST-1 и MTS в заданных условиях наблюдалась более низкая чувствительность и высокая вариабельность между значениями EC₅₀ соответственно, требуется подбор оптимальных экспериментальных условий для каждого из указанных красителей.

Стабильная воспроизводимость методики способствует тому, что для получения достоверных результатов снижается вероятность проведения повторных испытаний, что сокращает сроки исследований, количество используемых реагентов и расходных материалов.

Таблица 4. Средние значения 50% эффективных концентраций (EC₅₀) и значения коэффициентов вариации (CV) между независимыми определениями

Table 4. Mean 50% effective concentrations (EC₅₀) and coefficients of variation (CV) between independent tests

Номер опыта* Test number*	Краситель Dye	Количество независимых испытаний Number of independent tests	Среднее значение EC ₅₀ , ME Mean EC ₅₀ , IU	CV, %
4	MTT	6	0,91 ± 0,06	6,29
7	MTS	12	0,92 ± 0,53	58,04
9	aB	6	0,97 ± 0,11	11,55

Примечание. aB — alamarBlue.

* В соответствии с таблицами 1 и 2.

Note. aB—alamarBlue.

* According to tables 1 and 2.

Несмотря на то что существенной разницы между результатами, полученными с использованием красителей МТТ и alamarBlue, не выявлено, следует отметить, что более простая и менее продолжительная процедура испытания с alamarBlue, отсутствие стадии лизиса клеток и необходимости применения дополнительных реагентов позволяет рекомендовать этот краситель для использования в испытаниях по определению специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом на клетках линии NFS-60.

Вклад авторов. **О. В. Головинская** — сбор, анализ и обобщение данных литературы, проведение сравнительного анализа красителей, интерпретация результатов исследования, оформление рукописи; **М. Л. Байкова** — культивирование клеток, проведение экспериментальных исследований в полном объеме, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **Н. А. Алпатова** — планирование и разработка дизайна экспериментального исследования, формулировка темы исследования, редактирование и критический пересмотр содержания текста, формулирование выводов; **Д. А. Зубков** — сбор данных литературы, работа с графическим материалом, интерпретация результатов; **В. В. Фоменко** — пробоподготовка образцов и реагентов, культивирование клеток, обобщение и систематизация результатов исследования; **Л. А. Гайдерова** — обоснование концепции исследования, утверждение темы и плана экспериментального исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. **Olga V. Golovinskaya**—collection, analysis, and systematisation of literature data, comparative analysis of dyes, interpretation of the study results, formatting of the paper; **Marina L. Baykova**—cell culturing, performing experiments, obtaining, analysis and systematisation of experimental data; **Natalia A. Alpatova**—planning and development of the design of experiments, elaboration of the study idea, revision and editing of the text, preparation of conclusions; **Dmitry A. Zubkov**—collection of literature data, preparation of the graphic material, interpretation of the study results; **Victoria V. Fomenko**—sample preparation and preparation of reagents, cell culturing, summarizing and systematisation of the study results; **Lidia A. Gayderova**—substantiation of the concept of the study, approval of the idea and plan of the experimental part of the study, approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Аникина ЛВ, Пухов СА, Дубровская ЕС, Афанасьева СВ, Ключков СГ. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина. *Фундаментальные исследования*. 2014;(12-7):1423–7. [Anikina LV, Pukhov SA, Dubrovskaya ES, Afanaseva SV, Klochkov SG. Comparative definition of cell viability by MTT and resazurin. *Fundamental'nyye issledovaniya = Fundamental Research*. 2014;(12-7):1423–7 (In Russ.)]
2. Лягоскин ИВ, Берестовой МА, Потеряев ДА, Зейналова ЭС, Вишнеvский АЮ, Казаров АА. Валидация ХТТ-теста для оценки антипролиферативной активности препаратов на основе моноклональных антител. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(1):45–50. [Lyagoskin IV, Berestovoy MA, Poteryaev DA, Zeinalova ES, Vishnevskiy AY, Kazarov AA. Validation of the XTT-test for assessing the antiproliferative activity of biologics on the basis of monoclonal antibodies. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(1):45–50 (In Russ.)]
3. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: Gilbert FD, Friedrich O. *Cell Viability Assays (Methods and Protocols)*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1601. New York: Humana Press; 2017. P. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
4. Stoddart JM. Cell viability assays: Introduction. In: Stoddart JM, eds. *Mammalian Cell Viability (Methods and Protocols)*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 740. New York: Humana Press; 2011. P. 1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
5. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159–67. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
6. Мотузова ЕВ, Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Рунова ОБ, Волкова РА, Мыца ЕД и др. Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца активности филграстима. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(3):172–8. [Motuzova EV, Alpatova NA, Gayderova LA, Runova OB, Volkova RA, Mytsa ED, et al. Development and certification of an industrial reference standard for determination of filgrastim activity. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(3):172–8 (In Russ.)]
7. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018:095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
8. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol*. 2008;8:8. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-8-8>
9. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*. 2015;8:47. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>
10. Berridge MV, Herst PM, Tan An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Bio-technol Annu Rev*. 2005;11:127–52. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
11. Tiwari K, Wavdhane M, Haque S, Govender T, Kruger GH, Mishra M, et al. A sensitive WST-8-based bioassay for PEGylated granulocyte colony stimulating factor using the NFS-60 cell line. *Pharm Biol*. 2015;53(6):849–54. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.943248>
12. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the alamarBlue assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018:095489. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095489>
13. Lall N, Henley-Smith CJ, De Canha MN, Oosthuizen CB, Berrington D. Viability reagent, PrestoBlue, in comparison with other available reagents, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays. *Int J Microbiol*. 2013;2013:420601. <https://doi.org/10.1155/2013/420601>

Об авторах / Authors

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук. *Olga V. Golovinskaya*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Байкова Марина Леонидовна. *Marina L. Baykova*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9889-4038>

Алпатова Наталья Александровна, канд. биол. наук. *Natalia A. Alpatova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Зубков Дмитрий Анатольевич. *Dmitry A. Zubkov*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6970-1732>

Фоменко Виктория Валерьевна. *Viktoria V. Fomenko*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8677-0927>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук. *Lidia A. Gayderova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Поступила 30.04.2020

После доработки 27.07.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Received 30 April 2020

Revised 27 July 2020

Accepted 28 August 2020