

УДК 612.014

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

**Батог К.А.**

**ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им.  
акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия**

**(614000, Пермь, ул. Петропавловская, 26), e-mail: kirill\_batog18@mail.ru**

**Батог К.А. (Batog K.A.) – студент стоматологического факультета ФГБОУ  
ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.  
Вагнера” Минздрава России**

**Для корреспонденции: Батог К.А., 614000, г. Пермь, пр-кт Парковый 33-41,  
e-mail: kirill\_batog18@mail.ru тел: +79068775017.**

**Специальность 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.**

**Резюме. Статья посвящена сравнительному анализу методов определения жизнеспособности клеток человека. Показана необходимость изучения жизнеспособности клеток в процессе борьбы с заболеваниями, вызванными микроорганизмами, дана сравнительная характеристика таких методов, как МТТ-тест, метод суправитальной окраски раствором трипановой сини, метод проточной цитометрии, биолюминесцентный метод определения внутриклеточного АТФ. Подробно излагается способ применения каждого метода в определенных условиях, необходимое оборудование, особенности применения того или иного метода для клеток с различным уровнем метаболизма, энергетическим состоянием и размером. Описаны положительные и отрицательные стороны методов изучения жизнеспособности клеток, что даёт возможность исследователю сделать выбор методики согласно целям и задачам исследования. В заключении приводятся рекомендации по использованию рассмотренных методов в лабораторных исследованиях.**

**Ключевые слова: жизнеспособность, эукариотическая клетка, методы, трипановый синий, МТТ, проточная цитометрия.**

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF METHODS FOR STUDYING**

## VIABILITY OF HUMAN CELLS

**Batog K.A.**

*Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia*

**Abstract.** The article is devoted to comparative analysis of methods for determining the viability of human cells. It is shown the necessity of studying the viability of cells in the fight against diseases caused by micro-organisms, given the comparative characteristic of methods such as MTT-test, method of supravital coloring solution trypan blue, flowing cytometry, bioluminescence method for the determination of intracellular ATP. It is outlined in detail how to use each method under certain conditions, necessary equipment, particularly the use of a particular method for cells with different levels of metabolism, energy state, and size. We describe the positive and negative sides of studying cell viability method that enables the researcher to make a selection procedure in accordance with the goals and objectives of the study. It concludes with recommendations on the use of the methods considered in laboratory studies.

**Keywords:** Viability, eukariotic cell, methods, trypan blue, MTT, flowing cytometry.

В настоящее время существует множество нерешенных биологических проблем, связанных с микроорганизмами, которые способны, как помогать жизнедеятельности человека, так и наносить вред. Созданы различные средства по борьбе с заболеваниями, которые вызывают микроорганизмы. Однако, прежде чем использовать эти разработки для борьбы с микробами, нужно исследовать их влияние на клетки человека. Это возможно благодаря методам определения жизнеспособности клеток. Данные методы можно применять как к микроорганизмам, так и к клеткам человека.

Цель исследования – провести сравнительную оценку методов определения жизнеспособности клеток.

**МТТ-тест.** Это колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток. НАДФ-Н-зависимые клеточные оксидоредуктазные ферменты могут, при определенных условиях, отражать количество жизнеспособных клеток. Эти ферменты способны восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в нерастворимый формазан, который имеет пурпурное окрашивание.

**ХТТ** - (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-

карбоксамид) был предложен в качестве замены МТТ, давая большую чувствительность и более высокий динамический диапазон. Образующийся формазановый краситель растворим в воде, это позволяет избежать последнюю стадию растворения. Растворимые в воде соли тетразолиума – более поздние альтернативы МТТ: они были разработаны путём введения позитивного или негативного заряда и гидроксильных групп в бензольное кольцо тетразолиевой соли или, ещё лучше, сульфонатных групп, которые добавляют бензольное кольцо прямо или опосредованно [9]. Восстановление тетразолиевого красителя зависит от НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктазных ферментов большей частью в цитозоле клетки. Именно поэтому восстановление МТТ и других тетразолиевых красителей зависит от клеточной метаболической активности из-за тока НАДФ-Н. Клетки с низким уровнем метаболизма, как, например, тимоциты (клетки вилочковой железы) и селезёночные макрофаги восстанавливают очень мало МТТ. Напротив, быстро делящиеся клетки показывают высокую степень восстановления МТТ. МТТ-тесты обычно выполняются в темноте, так как реагенты МТТ чувствительны к свету [2, 8].

#### **Метод суправитальной окраски раствором трипановой сини.**

Суправитальная окраска – окраска тканей, выделенных из организма и помещенных в условия, обеспечивающих протекание в них основных жизненных процессов. На предметное стекло наносят каплю взвеси клеток и 1 каплю 0,1% раствора трипановой сини. Через 30-60 с окрашенную каплю взвеси покрывают покровным стеклом. Избыток суспензии удаляют промокиванием фильтровальной бумагой и под микроскопом подсчитывают число живых (неокрашенных) и погибших (синих) клеток на 100 кариоцитов. Выводят процент гибели клеток. Раствор трипановой сини готовят заранее. Порошок растворяют в бидистиллированной воде из расчета получения 0,2% раствора, который фильтруют. Это маточный раствор. Рабочий раствор готовят перед опытом: маточный раствор разбавляют 4,25% раствором хлористого натрия до нужной концентрации (1 капля гипотонического физиологического раствора и 3 капли трипановой сини) [3, 4].

**Метод проточной цитометрии.** Проточная цитометрия – это уникальный метод определения жизнеспособности клеток, обеспечивающий качественный анализ клеток, который получил широкое применение в таких областях медицины, как иммунология, фармакология, цитология и др. Для изучения физиологического состояния клеток применяется оценка степени апоптоза. Данный метод позволяет проводить количественный подсчет апоптотических клеток. Поскольку не все типы клеток проявляют классические особенности апоптоза для того, чтобы проанализировать и определить механизм гибели, необходимо исследование множественных аспектов. Тем более, мультипараметрическая природа проточной цитометрии предусматривает сложный анализ, который предполагает возможность изучения нескольких апоптотических характеристик путем комбинирования соответствующих красителей в одном образце [1]. Проточная цитометрия осуществляется на специальных аппаратах – сортерах и проточных цитометрах. При проведении проточной цитометрии суспензия, приготовленная из клеток, предварительно помеченных флуоресцирующими моноклональными антителами или флуорохромами, помещается в поток дисперсионной среды, пропускаемый через проточную ячейку. Гидродинамическое фокусирование струи клеточной суспензии в струе дисперсионной среды приводит к тому, что исследуемые клетки или их ядра выстраиваются поодиночке и в таком порядке пересекают пучок сфокусированных световых лучей (обычно лазерных). Под воздействием определенных световых волн происходит одновременное возбуждение молекул разных флуоресцирующих красителей, что делает возможным анализ сразу нескольких параметров клеточных структур. Свет, исходящий из флуорохромов, фокусируют при помощи оптической системы, состоящей из нескольких зеркал и линз, а затем раскладывают на определенные компоненты. Полученные световые сигналы подвергают анализу и преобразованию в электрические импульсы, а затем – в определенные формы, приемлемые для компьютерной обработки и хранения полученной информации [5,7].

**Биолюминесцентный метод определения внутриклеточного АТФ.**

Аденозинтрифосфат (систематическое название 9-β-D-рибофуранозиладенин-5'-трифосфат) – нуклеотид, трифосфорный эфир аденозина, который является производным аденина и рибозы, служит главным носителем химической энергии в клетках всех живых организмов. Содержание внутриклеточного АТФ является основным индикатором жизнеспособности клеток. При гибели клеток, в первую очередь, прекращается синтез АТФ, в то время как гидролиз АТФ может некоторое время продолжаться, поэтому содержание внутриклеточного АТФ быстро падает вплоть до нулевых значений. Существуют различные методы измерения концентрации АТФ: ферментативные со спектрофотометрической детекцией, радиоактивные, хроматографические и др. Однако, наиболее чувствительным, быстрым и специфичным является метод билюминесцентной АТФ-метрии. Для регистрации билюминесценции используются специальные приборы – люминометры. В современных приборах используется счетчик фотонов в комбинации с высокопроизводительными фотоумножителями (ФЭУ). Важно отметить, что сигнал, регистрируемый люминометром, пропорционален, но не равен числу фотонов, испускаемых образцом [6]. Следует отметить, что концентрация внутриклеточного АТФ в клетке может варьировать в зависимости от природы и размера клеток, и энергетического состояния. В зависимости от условий содержания культуры концентрация АТФ также может изменяться.

**Заключение.** Таким образом, среди рассмотренных методов самым простым в использовании является метод суправитальной окраски 0,1% раствором трипановой сини, т.к. он не требует наличия определенного оборудования, специальных навыков и позволяет получить результат в данный момент времени. Однако он не свидетельствует об истинной жизнеспособности клеток, а лишь отражает проницаемость плазматических мембран для этого красителя. Следовательно, метод суправитальной окраски 0,1% раствором трипановой сини нельзя применить ко всем клеткам и ко всем видам исследования. Также при проведении исследования с помощью МТТ-теста важно помнить, что, условия проведения теста могут изменять метаболическую

активность клетки и таким образом получать восстановление тетразолиевых красителей без влияния на жизнеспособность клетки. Следует также отметить, что при использовании метода биолюминесцентного определения внутриклеточного АТФ важно помнить, что любые стрессовые факторы, например, температура, будут сильно влиять на количество внутриклеточного АТФ. Для наиболее точного определения жизнеспособности клеток желательно комбинировать различные методы и учитывать специфику каждого из них.

#### Литература:

1. Войткова В.В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – №6 (76), часть 1. – С. 220-224.

2. Годовалов А.П., Быкова Л.П., Шипилина Е.Д. некоторые особенности лабораторной диагностики дисбиотических состояний полости рта // В мире научных открытий. – 2010. – № 4-14. – С. 7-8.

3. Ковальчук Л.В., Игнатьева Г.А., Ганковская Л.В. Иммунология. Практикум. Изд. ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 22-23.

4. Колущинский В.Э., Гуляева А.И., Быкова Л.П., Годовалов А.П. Изучение действия инфракрасного лазерного излучения на чувствительность *Staphylococcus aureus* к антибиотикам // Теоретические и прикладные аспекты современной науки. – 2014. – № 5-2. – С. 46-49.

5. Логинова Н.П., Четвертных В.А., Лебединская О.В., Шилов Ю.И., Годовалов А.П., Шилов Д.Ю., Суханцева И.В. Функциональные особенности т-лимфоцитов у детей с врожденными пороками сердца // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9. № 2 (18). – С. 216-221.

6. Ломакина Г.Ю., Модестова Ю.А., Угарова Н.Н. Биолюминесцентная детекция жизнеспособности клеток // Биохимия. – 2015. – Т. 80, вып. 6. – С. 829-832.

7. Сапко О.А., Михалев А.Н., Утарбаева А.Ш., Жаббаева Д.Б, Кунаева Р.М. Спектрофотометрический метод определения жизнеспособности

культивируемых клеток суспензии *solanum tuberosum* // Известия НАН РК, серия биологическая. – 2008. – №5. – С. 34-36.

8. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction // *Biotechnology Annual Review*. – 2005. – Vol. 11. – P. 127-152.

9. Berridge M.V., Tan A.S. Characterisation of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction // *Archives Biochem Biophys*. – 1993. – Vol. 303. – P. 474-482.