Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:43 IRDT on Wednesday September 4th 2019

مقایسه روش‌های MTT، تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک در تعیین بقای رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک انسانی

مرجان قربانی انارکولی[1]
سارا دبیریان[2]
حسن مولادوست[3]
ادیب زنده دل[1]
محمد هادی بهادری[4*]

۱- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۲- گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۳- گروه بیوشیمی و فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۴- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

*نویسنده مسئول: رشت، کیلومتر ۶ جاده تهران، مجتمع دانشگاهی گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.
کدپستی ۳۳۶۳ تلفن: ۰۱۳-۳۳۶۹۰۰۹۹
E-mail: bahadori.mh@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۸ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۰ آنلاین: ۱۳۹۸/۰۱/۳۰

زمینه و هدف: ارزیابی بقای سلولی در مطالعات دارویی و سرطان برای تعیین حساسیت سلولی مهم و تعیین‌کننده نتیجه درمان است. بنابراین روش‌های مختلفی استفاده می‌گردد که نقطه پایانی متفاوتی را ارزیابی می‌کنند. تعیین وجود همبستگی بین روش‌ها دارای اهمیت می‌باشد. در این مطالعه، حساسیت روش‌های رنگ‌سنجی ۳-(٤و٥-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۲و٥-دی فنیل تترازولیوم برماید (MTT)، تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک در تعیین بقای رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک ارزیابی گردید.

روش بررسی: مطالعه تجربی کنونی از مهر تا اسفند ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام پذیرفت. رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک انسانی کشت شده در محیط Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) حاوی ۱۰٪ Fetal bovine serum (FBS)، به‌مدت ۲٤ ساعت با ملاتونین تیمار گردید، سپس بقای سلولی توسط تست‌های MTT، تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک بررسی و از راندمان کشت و درصد کسر بقا جهت رسم منحنی بقا در سنجش کلونوژنیک استفاده گردید.

یافته‌ها: غلظت ملاتونین در نقطه IC_{50} در روش‌های MTT، تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک به‌ترتیب، شامل ٤/۷۹٤±۰/۱۱۷، ٤/۳۷٥±۰/۸۹٤ و ۲/۲٤٦±۰/۳۲٦ میلی‌مولار بود که مقایسه مقادیر IC_{50} در آزمون MTT و تریپان‌بلو اختلاف معناداری را نشان نداده (P=۰/٦٤٤٦)، درحالی‌که بین MTT-سنجش کلونوژنیک (P=۰/۰۰۳۲)، تریپان‌بلو-سنجش کلونوژنیک (P=۰/۰۰۷۸) اختلاف معنادار بود. نتایج تحلیل رگرسیون بقای سلولی، نشان‌دهنده همبستگی خطی، مثبت و معنادار بین روش‌ها بوده که بین روش‌های MTT و تریپان‌بلو همبستگی بیشتر بود (r=۰/۹۹، P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند، هر سه روش برای تعیین سمیّت سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک مؤثر بوده و روش‌های MTT و تریپان‌بلو نسبت به سنجش کلونوژنیک، حساسیت بالاتری دارند.

کلمات کلیدی: بقای سلولی، سنجش واحد کلونی‌زایی، ملاتونین، فورمازان MTT، کارسینومای تیروئید، تریپان‌بلو.

مقدمه

ارزیابی بقای سلولی از ابزارهای مهم در حیطه بالینی و پژوهشی سرطان، جهت تعیین میزان حساسیت سلول‌های توموری در بیماران می‌باشد. در کنار رادیوتراپی و عمل جراحی، استفاده از داروها یکی از روش‌های موثر در درمان بسیاری از سرطان‌ها بوده و حساسیت یا مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر داروها عامل مهمی برای نتیجه درمان است.[1] گسترش روش‌های ترکیبی کارآمد جدید، نیازمند آزمایش‌های پیش‌بالینی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro)، جهت تعیین بقا یا تکثیر سلولی می‌باشد.[2] تعیین بقای سلولی در مطالعات مبتنی بر کشت سلول و بافت، دارای اهمیت بوده و جهت آزمایش مواد و داروهای مختلف و تعیین سمیّت شیمیایی آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.[3] اساس این تست‌ها بر پایه فعالیت‌های مختلف سلولی مانند کنش‌های آنزیمی، نفوذپذیری غشای سلولی، چسبندگی سلول، تولید ATP و محصولات

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:43 IRDT on Wednesday September 4th 2019

کوآنزیمی می‌باشد.[٤] اساس کار رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بر پایه عدم قابلیت نفوذ رنگ به غشای سلولی می‌باشد. تریپان‌بلو به‌طور گسترده جهت رنگ‌آمیزی سلول‌های مرده به‌کار برده می‌شود. در این روش، بقای سلولی با شمارش سلول‌های رنگ‌نگرفته توسط میکروسکوپ یا ابزارهای دیگری مشخص می‌گردد.[٥] سلولی که قادر به تکثیر و تشکیل کلونی باشد، کلونوژنیک است و از دست دادن این توانایی سبب مرگ تجدیدپذیری (Reproductive death) می‌شود. این تعریف در خصوص سلول‌های سرطانی و سلول‌هایی که سرعت تکثیر بالایی دارند، بیان می‌شود و فقدان این توانایی نشان‌دهنده مرگ سلولی است. بر این اساس، پس از قرارگیری سلول در معرض عوامل سمیّت‌زای مختلف، سلول ممکن است هنوز سالم بوده و قادر به تولید پروتیین و ساخت DNA جدید باشد، امّا اگر قابلیت تکثیر خود را از دست دهد مرده در نظر گرفته می‌شود. سنجش کلونوژنیک به‌عنوان روشی برای بررسی حساسیت سلول‌ها به عوامل مختلف و رسم منحنی بقا مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، تعداد کولونی‌ها به‌عنوان شاخص بقای سلولی به‌وسیله میکروسکوپ شمارش می‌گردد.[٦]

از روش‌های مبتنی بر آنزیم می‌توان به‌روش رنگ‌سنجی ۳-(٤و٥-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۲و٥-دی فنیل تترازولیوم برماید (MTT)، اشاره کرد که بر پایه تولید ماده رنگی توسط سلول‌های زنده می‌باشد. استفاده از نمک‌های تترازولیوم مانند ۳-(٤و٥ دی متیل-۲-تیازول)-۲و٥-دی فنیل-۲هیدروژن-تترازولیوم بروماید، از روش‌های گسترده‌ای است که جهت اندازه‌گیری بقا و تکثیر سلولی به‌کار برده می‌شود. آزمایش MTT، قادر به ارزیابی کمّی سلول‌های زنده از طریق تبدیل نمک تترازولیوم به بلورهای بنفش رنگ نامحلول فرومازان، به‌وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد، که این تبدیل تنها در سلول‌های زنده انجام می‌شود. میزان فرومازان تولید شده به‌وسیله اسپکتروفتومتر جهت تخمین میزان بقای سلولی اندازه‌گیری می‌شود.[۷] ملاتونین مولکول کوچک چربی دوست و از مشتقات سروتونین است که به‌وسیله غده پینه‌آل ترشح شده و میزان ساخت آن از ساعت بیولوژیکی بدن پیروی می‌کند.[۸] در بدن بسیاری از گیرنده‌های ملاتونین شناسایی شده‌اند که تنظیم فرآیندهای زیستی مختلفی مانند تنظیم ریتم زیستی و باروری، القای خواب، تنظیمات قطر عروقی و اثرات ضد سرطانی را عهده‌دار هستند.[۸و۹] براساس مطالعات انجام‌گرفته، ملاتونین در رده سلولی گلایوما منجر به کاهش بقای سلولی و کاهش بیان ژن‌های Nestin، Bmi-1 و Sox2 گردیده و در رده سلولی سرطان پستان سبب کاهش تکثیر سلولی و مهار رگ‌زایی می‌گردد.[۱۰] هدف از این مطالعه مقایسه حساسیت و همبستگی میان هر یک از روش‌های MTT، تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک در تعیین بقای رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک انسانی تیمار شده با دوزهای مختلف ملاتونین می‌باشد.

روش بررسی

مطالعه تجربی کنونی از مهر تا اسفند ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام پذیرفت. رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک (ATC, 8305C) از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید و براساس پروتکل استاندارد در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، پنی‌سیلین (۱۰۰ U/mL) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL) به‌صورت تک‌لایه رشد داده و در انکوباتور ۳۷ °C و ٥٪ دی‌اکسیدکربن و رطوبت اشباع، نگهداری شدند. جهت جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک و پاساژ سلولی از محلول ۰/۲٥٪ تریپسین-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) استفاده گردید.

پودر ملاتونین (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) خریداری شده و دوز استوک (٥۰ mg/ml) توسط اتانول تهیه گردید و غلظت‌های نهایی ملاتونین با رقیق کردن دوز استوک با محیط کشت کامل به‌دست آمدند، به‌طوری‌که مقدار نهایی اتانول در غلظت‌های مورد استفاده کمتر از ۱٪ بود. سلول‌های ATC در ششمین پاساژ، به تعداد 5×10^4 Cell/well در هر چاهک از پلیت ۹٦ خانه‌ای، به‌مدت ۱٦ ساعت در دمای ۳۷ °C، رطوبت ۸۰٪ و ٥٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه شدند و سپس سلول‌ها از نظر چسبیدن به کف پلیت توسط میکروسکوپ اینورت (Leica DM IL LED, Wetzlar, Germany) مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های معلق خارج شده و سلول‌های چسبیده توسط غلظت‌های مختلف ملاتونین (۲۸، ۱٦، ٤، ۱، ۰/٦ و ۰/۲ میلی‌مولار) به‌مدت ۲٤ ساعت در شرایط تاریکی تیمار گردیدند. گروه کنترل نیز به‌عنوان گروه Vehicle توسط اتانول ۱٪ تیمار گردید.

ابتدا هر چاهک به‌طور جداگانه پس از تریپسینه شدن، سانتریفیوژ شد. سپس ۲۰ µl از سوسپانسیون سلولی با ۲۰ µl رنگ تریپان‌بلو ۰/٤٪ مخلوط

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:43 IRDT on Wednesday September 4th 2019

شده و ۱۰ µl از مخلوط حاصل بر روی لام نئوبار قرار گرفت و سلول‌ها با غشای آسیب‌دیده به رنگ آبی و سلول‌های زنده بی‌رنگ و کاملاً شفاف، شمارش شده و درصد بقای سلولی به‌صورت ((تعداد کل سلول‌ها – سلول‌های رنگ‌گرفته)/ تعداد کل سلول‌ها)×۱۰۰ محاسبه گردید.

پس از تیمار سلول‌های ATC به‌مدت ۲٤ ساعت جهت انجام تست MTT، محیط رویی خارج گردید و سلول‌ها توسط محلول نمکی بافر فسفات (PBS) شستشو شده و مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر محلول MTT (۵ mg/mL رقیق‌شده در DMEM فاقد فنول قرمز) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به‌مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ °C و شرایط تاریکی انکوبه گردید. پس از آن محلول رویی هر چاهک خارج شده و به‌مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر ایزوپروپرانول به هر چاهک اضافه شده و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. پس از آن جذب نوری به‌وسیله Absorbance microplate reader در ۵۷۰ nm خوانده و درصد بقای سلولی به‌صورت (مقدار جذب نوری گروه تیمار شده/ مقدار جذب نوری گروه کنترل) ×۱۰۰ محاسبه شد. بدین‌منظور تعداد Cell/well 5×10^4 در چاهک‌های پلیت شش خانه‌ای کاشته شده و پس از ۱٦ ساعت سلول‌ها از نظر چسبیدن به کف پلیت زیر میکروسکوپ اینورت بررسی گردیدند. سپس محیط رویی خارج شده و سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ملاتونین به‌مدت ۲٤ ساعت تیمار شدند. پس از آن سلول‌ها تریپسینه و شمارش شده و سلول‌ها درون پلیت شش خانه‌ای به‌مدت هفت روز کشت داده شدند. در نهایت اجتماع سلولی که دارای حداقل ۵۰ سلول باشند به‌عنوان کلونی زنده شمارش شده و راندمان کشت به‌صورت (تعداد کلونی‌های تشکیل‌شده/ تعداد سلول‌های کشت‌داده‌شده) و درصد کسر بقا (تعداد کلونی‌های تشکیل‌شده/ (راندمان کشت گروه کنترل× تعداد سلول‌های کشت‌داده‌شده)×۱۰۰) جهت رسم منحنی بقای سلولی، محاسبه گردید.

تمامی آزمایشات به‌صورت مستقل سه بار تکرار انجام پذیرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار بیان شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش آنالیز واریانس دوطرفه ANOVA و آزمون Tukey و محاسبه میزان IC50 (غلظتی از دارو که سبب کاهش ۵۰ درصدی بقای سلولی می‌گردد)، توسط آزمون Nonlinear regression curve fit چهارپارامتری لوجستیک با GraphPad Prism Software, version 6 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, USA) صورت گرفت. در تمام بررسی‌ها سطح معناداری آزمون‌ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

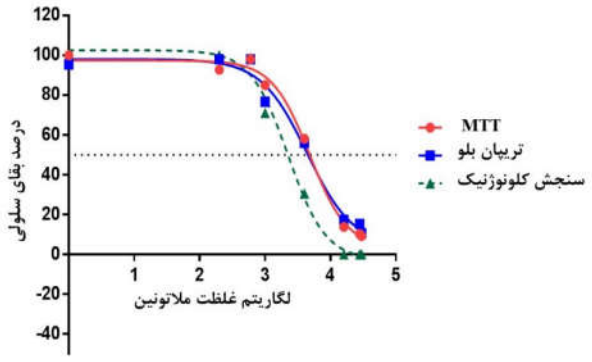
یافته‌ها

در نتایج حاصل از روش MTT میزان بقای سلولی نسبت به گروه کنترل در دوزهای ۰/۲ و ۰/٦ میلی‌مولار ملاتونین تفاوت معناداری را نداشته و بقای سلولی در دوز ۲۸ میلی‌مولار به پایین‌ترین مقدار خود با میانگین ۱۰/۲۵±۰/۸۵٪ رسیده است و این در حالی است که دوز یک میلی‌مولار ۱۵٪ بقای سلولی را کاهش داده بود (جدول ۱). در این روش غلظت ملاتونین در نقطه IC50 به‌عنوان غلظتی که بقای سلولی را ۵۰٪ کاهش می‌دهد ٤/۷۹٤±۰/۱۱۷ میلی‌مولار بوده است (نمودار ۱).

جدول ۱: توزیع فراوانی نسبی بقای سلولی سرطان تیروییـد آناپلاسـتیک انسـانی تیمار شده با ملاتونین به‌دست‌آمده از سه روش

MTT (٪)	تریپان‌بلو (٪)	سنجش کلونوژنیک (٪)	غلظت ملاتونین (mM)
*۱۰۰	۹۵/۳۳±۵/۰۳	۱۰۰	۰
۹۲/۷۰±۵/۲۳	۹۸±۱/۰۱	۱۰۰±۲/۰۰	۰/۲
۹۸/۰٤±۷/۱۹	۹۸±۲/۰۰	۹۸/٦٦±۱/۱۵	۰/٦
۸۵/۰۵±٤/٤۲	۷٦/٦٦±۱۵/۲۷	۷۱/۰۲±۱٤/۱۰	۱
۵۸/۰۵±٦/۷۵	۵٦±٦/۹۲	۳۰/٦۲±٦/٦۸	٤
۱۳/۸۳±۱/۵۸	۱۷/۳۳±۳/۰۵	۰	۱٦
۱۰/۲۵±۰/۸۵	۱۵/۳۳±۷/۵۷	۰	۲۸

* داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار از سه آزمون مستقل بیان شده‌اند.



نمودار ۱: منحنی دوز–پاسخ ATC تیمار شده با ملاتونین در سه روش MTT، رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:43 IRDT on Wednesday September 4th 2019

براساس نتایج به‌دست‌آمده از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، بقای سلولی تفاوت معناداری را در دوزهای ۰/۲ و ۰/٦ میلی‌مولار ملاتونین نسبت به گروه کنترل نشان نداده و بیشترین میزان بقای سلولی نسبت به گروه کنترل مربوط به غلظت یک میلی‌مولار با میانگین ۱۵/۲۷±۷٦/٦٦٪ و کمترین آن مربوط به دوز ۲۸ میلی‌مولار (۷/۵۷±۱۵/۳۳٪) بوده است (جدول ۱).

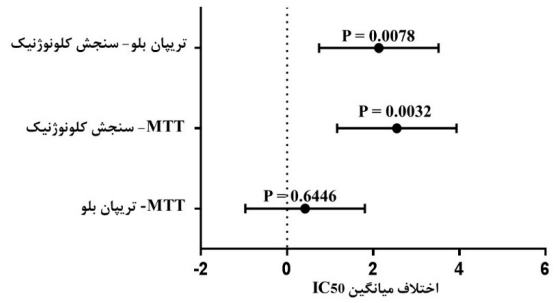
در این روش IC50 به‌دست‌آمده از منحنی دوز-پاسخ برابر ٤/۳۷۵±۰/۸۹٤ میلی‌مولار ملاتونین بوده است (نمودار ۱).

در روش سنجش کلونوژنیک نیز بقای سلولی وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت ملاتونین از بقای سلولی کاسته شده بود. میانگین بقای سلولی به‌دست‌آمده نسبت به گروه کنترل در این روش در غلظت یک میلی‌مولار معادل ۱٤/۱۰±۱۷/۰۲٪ بود، درصورتی‌که در دوزهای ۱٦ و ۲۸ میلی‌مولار بقای سلولی ۱۰۰٪ کاهش داشته و هیچ کلونی به‌عنوان معیار بقای سلولی مشاهده نگردید (جدول ۱).

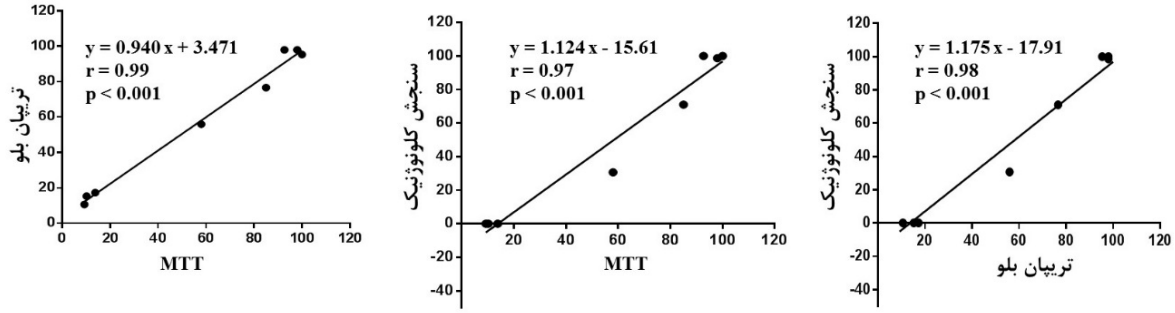
بر این اساس میزان IC50 به‌دست‌آمده در این روش معادل ۲/۲٤٦±۰/۳۲٦ میلی‌مولار بوده است (نمودار ۱).

در مقایسه میزان IC50 به‌دست‌آمده از سه روش، تفاوت معناداری بین روش MTT و تریپان‌بلو مشاهده نشد (P=۰/٦٤) و این در حالی بود که اختلاف معناداری بین روش تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک (P=۰/۰۰۷۸) و همچنین بین روش‌های MTT و سنجش کلونوژنیک (P=۰/۰۰۳۲) مشاهده گردید، به‌طوری‌که می‌توان روش‌های MTT و تریپان‌بلو را نسبت به‌روش سنجش کلونوژنیک حساس‌تر دانست (نمودار ۲).

براساس نتایج به‌دست‌آمده از نمودار رگرسیون بقای سلولی، میزان همبستگی چشمگیری از نوع خطی، مثبت و معنادار بین سه روش موجود می‌باشد و ضریب همبستگی بین روش‌های MTT و تریپان‌بلو نسبت به سنجش کلونوژنیک بیشتر بوده است (r=۰/۹۹، P<۰/۰۰۱) (نمودار ۳).



نمودار ۲: مقایسه میزان IC50 به‌دست‌آمده از سه روش MTT، رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک با تکرار سه آزمون مستقل



نمودار ۳: رگرسیون بقای سلولی ATC تیمار شده با ملاتونین با سه روش MTT، رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک

داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار تکرار سه آزمون مستقل می‌باشند.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:43 IRDT on Wednesday September 4th 2019

بحث

در این مطالعه روش‌های MTT، سنجش کلونوژنیک و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو جهت تعیین بقای رده سلولی سرطان تیرویید آناپلاستیک تیمار شده با دوزهای مختلف ملاتونین مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. یافته‌های به‌دست‌آمده نشان داد که ملاتونین به‌صورت وابسته به دوز می‌تواند سبب کاهش بقای سلولی ATC گردد و این در حالی بود که نتایج حاصل از سه روش مورد مطالعه یکدیگر را تایید کرده‌اند. با اینکه میزان همبستگی بین روش MTT و تریپان‌بلو بالاتر از روش سنجش کلونوژنیک بوده است و همچنین اختلاف معناداری بین این دو روش وجود نداشت، باوجوداین، مشکلات متعددی در این رنگ‌آمیزی‌های معمول تریپان‌بلو وجود دارد که مناسب بودن، هزینه کم و سهولت انجام، آن‌ها را محدود می‌کند و ممکن است در شناسایی سلول‌های مرده مشکلاتی ایجاد نماید، زیرا سلول‌ها می‌بایست بین سه تا پنج دقیقه شمارش شوند، در غیر این صورت تعداد سلول‌های رنگ‌گرفته با افزایش زمان افزایش می‌یابد و از طرفی رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو قادر نیست سلول‌های سالم را از سلول‌هایی که زنده هستند ولی عملکرد خود را از دست داده‌اند، تفکیک نماید.[۵،۱۱]

با توجه به اینکه روش کلونوژنیک دوز پایین‌تری از ملاتونین را به‌عنوان میزان IC50 نشان می‌دهد، نتیجه حاصل را می‌توان به اساس روش کلونوژنیک مرتبط دانست، زیرا در این روش، سلولی که قابلیت تکثیر خود را از دست دهد مرده محسوب می‌گردد و این در حالی است که ممکن است سلول هنوز توانایی تولید محصولات سلولی دیگر را داشته باشد، اما از طرفی وابسته بودن روش به تشکیل کلونی و صرف زمان طولانی از محدودیت‌های انجام آن بوده و لازمه آن حفظ قابلیت تکثیر سلول‌ها تا زمان تشکیل کلونی می‌باشد.[۱۲]

روش MTT، برای تجزیه و تحلیل حجم زیادی از نمونه‌ها با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه، مناسب است، بااین‌وجود، این روش می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند مقدار PH، پلی‌فنول‌ها، آنالوگ‌های پیرووات و نانومواد‌ها قرار گرفته و یا توسط سوپراکسیدها (O-2) کاهش یابد.[۱۳] در تعیین سمیّت نانو مواد مهندسی‌شده از جمله نانودی‌اکسیدتیتانیوم (TiO2) نتایج متناقضی در بقا و تکثیر سلولی با استفاده از تست MTT گزارش شده است که به قابلیت نانودی‌اکسیدتیتانیوم در افزایش سوپراکسیدها در سلول‌های مختلف مرتبط می‌باشد.[۱۴] از دیگر محدودیت‌های این روش وجود کلسترول بالا در سلول مورد مطالعه است. حضور کلسترول در سلول سبب خروج فرومازان از سلول شده و با کاهش میزان جذب نوری، بقا سلولی به‌صورت کاذب کاهش خواهد یافت.[۱۵] بااین‌وجود مطالعات دیگر این یافته را تایید می‌کنند که استفاده از رنگ‌سنجی MTT و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو می‌توانند روش‌های مناسبی در ارزیابی بقای سلولی در سلول‌های کارسینومای سنگفرشی سر و گردن (SCCHN) تیمار شده با سیسپلاتین باشند.[۲] اگرچه در مطالعه دیگر که اثر سمیّت کال پروتکتین را بر سلول‌های سرطانی معده انسان مورد بررسی قرار داده بود، روش MTT نسبت به‌روش تریپان‌بلو از حساسیت بیشتری برخوردار بوده است.[۱۶]

پژوهش کنونی بیان می‌دارد، در سلول‌های ATC تیمار شده با ملاتونین، به‌صورت وابسته به دوز، میزان بقای سلولی کاهش یافته و نتایج به‌دست‌آمده از روش‌های MTT، تریپان‌بلو و سنجش کلونوژنیک تا حد زیادی با یکدیگر همبستگی داشته و نتایج یکدیگر را تایید می‌نمایند. همچنین روش‌های MTT و تریپان‌بلو نسبت به‌روش سنجش کلونوژنیک، دارای حساسیت بالاتری بوده‌اند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "اثرات ملاتونین بر سمیّت و بقای رده سلولی سرطان آناپلاستیک تیروئید انسان" در مقطع کارشناسی ارشد علوم تشریح در سال ۱۳۹۵ و با کد IR.GUMS.REC.1395.161 می‌باشد که با حمایت مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی گیلان انجام گردیده است.

References

1. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screen* 2004;9(6):506-15.

2. Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellström JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2006;42(10):320-3.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:43 IRDT on Wednesday September 4th 2019

3. Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 1985;33(1):77-9.
4. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al, editors. Assay Guidance Manual. vol. 2004. Bethesda: Eli Lilly and Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016. P. 355-86.
5. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2001;Appendix 3:Appendix 3B.
6. Chang DS, Lasley FD, Das IJ, Mendonca MS, Dynlacht JR. Cell death and survival assays. In: Basic Radiotherapy Physics and Biology. Cham: Springer International Publishing; 2014. P. 211-9.
7. Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO2. *Toxicol In Vitro* 2011;25(8):2147-51.
8. Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res* 2006;66(20):9789-93.
9. Asgari Z, Ghasemian F, Ramezani M, Bahadori MH. The effect of melatonin on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos. *Cell J* 2012;14(3):203-8.
10. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander A, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One* 2014;9(1):e85311.
11. Hosseini F, Sam MR, Jabbari N. Radiosensitivity of radioresistant colorectal cancer cells after treatment with docosahexaenoic acid and irradiation. *Tehran Univ Med J* 2014;72(3):139-46.
12. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med* 2005;110:21-8.
13. Han M, Li J, Tan Q, Sun Y, Wang Y. Limitations of the use of mtt assay for screening in drug discovery. *J Chin Pharm Sci* 2010;19(3):195-200.
14. Gurr JR, Wang AS, Chen C-H, Jan K-Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2005;213(1-2):66-73.
15. Ahmad S, Ahmad A, Schneider BK, White CW. Cholesterol interferes with the mtt assay in human epithelial-like (a549) and endothelial (hlmve and hcae) cells. *Int J Toxicol* 2006;25(1):17-23.
16. Shokrgozar MA, Zali H, Rezaei-Tavirani M, Amanzadeh A. Comparison of MTT and Trypan blue colorimetric methods for determining the cytotoxicity of calprotectin on human stomach cancer cells under laboratory conditions. *Kowsar Med J* 2007;12(2):127-37.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:43 IRDT on Wednesday September 4th 2019

TUMJ Tehran University Medical Journal, April 2019; Vol. 77, No. 1: 26-32 Original Article

Comparison of MTT, trypan blue, and clonogenic assay, to determine the viability in human anaplastic thyroid cancer cell line

Marjan Ghorbani-Anarkooli M.Sc.[1]
Sara Dabirian Ph.D.[2]
Hasan Moladoust Ph.D.[3]
Adib Zendedel Ph.D.[1]
Mohammad Hadi Bahadori Ph.D.[4*]

1- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
2- Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
3- Department of Biochemistry and Medical Physics, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
4- Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

[*] Corresponding author: Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Guilan University Campus, Tehran Road Km. 6, Rasht, Iran.
Postal code: 3363
Tel: +98 13 33690099
E-mail: bahadori.mh@gmail.com

Abstract

Received: 09 Sep. 2018 Revised: 16 Sep. 2018 Accepted: 09 Apr. 2019 Available online: 19 Apr. 2019

Background: Evaluation of cell viability is momentous in pharmacologic and oncological research. Cell viability evaluation determines cell sensitivity and consequently treatment outcome. Various methods are available to determine cell survival. Each of these methods evaluates different endpoints. Accordingly, determining the correlation between these methods is important. In this study, in order to determine the viability of human anaplastic thyroid cancer cell line, the sensitivity of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, trypan blue test and clonogenic assay were compared.

Methods: This experimental study was performed in the Cellular and Molecular Research Center at Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran from October 2016 to March 2017. The human anaplastic thyroid cancer cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS). The cultured cells were treated with melatonin, for 24 hours. Then, the viability of the cells was evaluated by MTT assay, trypan blue test and clonogenic assay. Furthermore, plating efficiency and surviving fraction were used in order to draw survival curve in the clonogenic assay.

Results: The concentration of melatonin at IC_{50} point was 4.794±0.117 millimolar (mM) in MTT assay, 4.375±0.894 mM in trypan blue test and 2.246±0.326 mM in clonogenic assay. Comparing the IC_{50} values of these test revealed that C_{50} values obtained from MTT assay and trypan blue test had no significant difference (P=0.6446), while there was a significant difference between IC_{50} values obtained from MTT and clonogenic assays (P=0.0032). Moreover, the IC_{50} values obtained from trypan blue test and clonogenic assay were also significantly different (P=0.0078). The results of the regression analysis of cell viability were shown a linear, positive and significant correlation between these three methods and MTT assay and trypan blue test showed higher correlation (r=0.99, P<0.001).

Conclusion: Based on our results, all these methods were effective to identify cytotoxicity in human anaplastic thyroid cancer cell line, while MTT assay and trypan blue test were more sensitive than clonogenic assay.

Keywords: cell survival, colony-forming units assay, melatonin, MTT formazan, thyroid carcinoma, trypan blue.