

# Badanie aktywności cytotoksycznej produktów leczniczych i wyrobów medycznych



Fot. K. KALINSKI

prof. dr hab. n. farm. ELŻBIETA LIDIA ANUSZEWSKA  
Kierownik Zakładu Biochemii i Biofarmaceutyków  
Narodowego Instytutu Leków w Warszawie

## Streszczenie:

Obowiązujące prawo wymaga, aby nowe związki i materiały potencjalnie mogące mieć zastosowanie w terapii, podlegały badaniom w celu oceny ich aktywności cytotoksycznej. Wprawdzie badania cytotoksyczności *in vitro* nie w pełni oddają działanie toksyczne *in vivo*, lecz mogą być doskonałą wskazówką dotyczącą mechanizmu oddziaływania na komórkę. W celu oceny aktywności cytotoksycznej badanych jest szereg parametrów związanych z żywotnością komórki, takich jak: integralność błony komórkowej, metabolizm, zdolność do replikacji. Wrażliwość komórki na działanie danego czynnika wyrażana jest wartością  $IC_{50}$ .

## Słowa kluczowe:

Cytotoksyczność, testy *in vitro*,  $IC_{50}$

## Summary:

Legislation demands that new therapeutic agents are subjected to rigorous cytotoxicity testing before they are progressed to the clinic. Although *in vitro* cytotoxicity is not necessarily directly related to *in vivo* toxicity, it can indicate a selective mode of action for a compound. For estimation of cytotoxicity a range of parameters can be investigated, including cell viability, cell metabolism and cell replication. Sensitivity of cells to tested agents is defined on the basis of  $IC_{50}$  values obtained in used tests.

## Key words:

Cytotoxicity, *in vitro* tests,  $IC_{50}$

Zatwierdzono do publikacji: marzec 2010 r.

Obowiązujące prawo wymaga, aby wszystkie nowe związki o charakterze potencjalnych leków, podlegały szeroko zakrojonym badaniom w celu oceny aktywności cytotoksycznej, przed skierowaniem ich do badań klinicznych. W zależności od przeznaczenia

leczniczego danego związku, aktywność cytotoksyczna jest aktywnością pożądaną, jak to ma miejsce w przypadku cytostatyków, stosowanych w chorobach nowotworowych lub jest parametrem dyskwalifikującym. Związki chemiczne oddziałują na komórkę w różny sposób zaburzając jej procesy fizjologiczne, a zaistniałe zmiany w tych procesach można obserwować stosując różne techniki pomiarowe jak np.: kolorymetrię, fluorymetrię, bioluminescencję czy pomiar scyntylacyjny w przypadku użycia izotopów promieniotwórczych.

Szybki rozwój hodowli komórek ssaczy, jako alternatywy dla badań z użyciem zwierząt, stworzył możliwość wykonania pierwszych badań przesiewowych z żywą komórką *in vitro*. I chociaż badania *in vitro* aktywności cytotoksycznej nie mogą całkowicie zastąpić badań toksyczności *in vivo*, to jednak przy odpowiednio dobranych testach mogą określić potencjalny mechanizm oddziaływania na komórkę i dalszy kierunek badań.

## Testy aktywności cytotoksycznej

Wybór metody badania aktywności cytotoksycznej zależy w dużym stopniu od informacji o charakterze badanego związku i możliwości interakcji z żywym organizmem lub jego składowymi. Aktywność cytotoksyczną można ocenić poprzez bezpośredni lub pośredni pomiar zmian zachodzących w komórce poddanej działaniu danego związku w odniesieniu do układu kontrolnego – hodowli komórek bez badanego związku lub ze związkiem, o którym wiadomo, że jest cytotoksyczny w określonym zakresie stężeń. Stosowanych jest cały szereg testów do oceny aktywności cytotoksycznej wykorzystujących:

- zmiany w integralności błony komórkowej

- aktywność enzymów związanych z metabolizmem komórki
- zdolność komórki do podziałów, czyli proliferacji
- zmiany w zawartości białka lub materiału genetycznego

Miarą aktywności cytotoksycznej jest wartość stężenia badanego czynnika hamującego żywotność komórki –  $IC_{50}$  (ang. *inhibitory concentration*), czyli takie jego stężenie, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50 proc., w odniesieniu do układu kontrolnego.

## Barwniki...

Jedną z podstawowych metod bezpośredniego pomiaru żywotności komórek w hodowli, jest określenie liczby żywych lub martwych komórek poprzez zastosowanie odpowiednich barwników, które w zależności od stanu błony komórkowej albo wnikają do wnętrza komórki albo pozostają na jej powierzchni. Najczęściej do barwienia przyżyciowego stosowany jest, błękit trypanu lub czerwień obojętna:

- Błękit trypanu (BT) barwi wyłącznie martwe komórki, późnoapoptotyczne lub nekrotyczne, nie wnikając do cytoplazmy komórek żywych, co jest związane ze zmianą w integralności błony komórkowej. Komórki z zabarwioną na ciemnoniebiesko błoną komórkową zliczane są w komorze hemocytometru, w mikroskopie świetlnym<sup>1,2</sup>.

- Czerwień obojętna (NR – *neutral red*) również pozwala na odróżnienie komórki żywej od martwej. Barwnik ten przechodzi na drodze transportu biernego do cytoplazmy jedynie komórek żywych, z wydajnym procesem naprawy uszkodzeń wywołanych przez badany czynnik i nagromadza się w lizosomach. Zabarwione na czerwono komórki zliczane są w komorze hemocytometru lub po odpowiednim przygotowaniu hodowli, intensywność zabarwienia,

proporcjonalną do liczby żywych komórek, mierzy się spektrofotometrycznie<sup>3,4</sup>.

### ... i enzymy

Działanie cytotoksyczne badanych czynników można także określić metodami pośrednimi, np. poprzez aktywność enzymów komórkowych:

– Dehydrogenaza mleczanowa (test LDH), enzym cytoplazmatyczny, na skutek zmian w integralności błony komórkowej przemieszcza się z komórki do pożywki hodowlanej. Obecny w podłożu hodowlanym enzym przekształca sól tetrazoliową w barwny formazan, a intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie<sup>5</sup>.

– N-acetylo-beta-D-glukozaminidaza (test NAG), enzym lizosomalny, który tak jak LDH, w przypadkach uszkodzenia komórki przechodzi do podłoża hodowlanego. Oznaczenie jego aktywności w podłożu może być miarą działania cytotoksycznego<sup>6</sup>.

– Dehydrogenaza bursztynianowa (test MTT), enzym mitochondrialny obecny w żywych komórkach, który redukuje rozpuszczalny w wodzie bromek tetrazoliowy do formazanu, wytrącającego się w podłożu, w postaci nierozpuszczalnych, szaro-fioletowych kryształów. Intensywność zabarwienia roztworu po rozpuszczeniu kryształów, mierzona spektrofotometrycznie, jest miarą żywotności komórek<sup>7,8</sup>.

Test MTT jest obecnie najczęściej stosowany do oceny działania cytotoksycznego i zalecany jako referencyjny, przez międzynarodowe organizacje normotwórcze. Niedawno pojawiła się na rynku modyfikacja tego testu pod nazwą EZ4U, gdzie efektem końcowym reakcji pomiędzy enzymem a solą tetrazoliową nie są kryształy formazanu, a rozpuszczalny w podłożu barwny związek, co upraszcza procedurę i zmniejsza ryzyko popełnienia błędów<sup>9</sup>.

Oszacowanie liczby żywych komórek w hodowli jest możliwe także przy użyciu testu z sulforodaminą (SRB). Podstawą metody jest elektrostatyczne wiązanie białka w środowisku o odpowiednim pH z sulforodaminą i spektrofotometryczny pomiar intensywności zabarwienia. Ilość białka w próbce jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek. Możemy także ocenić liczbę żywych komórek w hodowli poprzez zawartość w nich DNA, większość uszkodzeń powoduje zahamowanie jego syntezy<sup>10</sup>. Najczęściej w tym celu stosuje się wbudowywanie prekursorów syntezy DNA, takich jak try-

towana tymidyna – [<sup>3</sup>H] tymidyna i pomiar scyntylicyjny promieniowania β.

Bardziej wyrafinowaną metodą pozwalającą na ocenę wielkości uszkodzeń powodowanych przez badany czynnik i zapoczątkowania procesów fizjologicznej śmierci, jest barwienie komórek aneksyną V i jodkiem propidyny (PI). We wczesnej apoptozie fosfatydyloseryna usytuowana po wewnętrznej stronie błony komórkowej przemieszcza się na zewnątrz i wiąże z aneksyną V. Jednocześnie jodek propidyny pozwala na obserwację integralności błony komórkowej związanej z procesem nekrozy<sup>11</sup>. Ta procedura umożliwia rozróżnienie komórek:

- we wczesnej apoptozie
- w późnej fazie apoptozy
- żywych, nieapoptotycznych
- komórek nekrotycznych.

### Linie komórkowe

Niezmiernie ważny w badaniach toksyczności *in vitro* jest dobór odpowiedniej linii komórkowej. Tak jak każdy żywy organizm, komórki wywodzące się z różnych tkanek i różnych gatunków, będzie cechowała różna wrażliwość na tę samą substancję. Dlatego też dla właściwej oceny należy użyć jak największej ilości linii komórkowych o zróżnicowanej wrażliwości<sup>12,13</sup>. Należy także zwrócić uwagę na fakt, że testy stosowane do oceny działania cytotoksycznego nie są równoważne. Wartości IC<sub>50</sub> uzyskane w różnych testach dla tej samej linii komórkowej i tej samej substancji, mogą się niekiedy znacznie różnić. Metody oparte na liczeniu zabarwionych komórek dają ocenę dość subiektywną, zależną od wprawnego oka oceniającego, metody oparte np. na pomiarach spektrofotometrycznych są bardziej obiektywne i dają wyniki zbliżone do stanu faktycznego<sup>2,4,14</sup>.

### Wyroby medyczne

Odrębnym działem w badaniach cytotoxiczności jest badanie wyrobów medycznych. W odróżnieniu od produktów leczniczych, gdzie zakres badań jest uzależniony od przeznaczenia terapeutycznego związku i nie ma ograniczeń odnośnie testów i linii komórkowych, zakres badań wyrobów medycznych ściśle określają odpowiednie akty prawne. Monografie dotyczące badania cytotoxiczności znajdują się w farmakopeach: polskiej i amerykańskiej oraz publikacjach NIL<sup>15,16,17</sup>.

Jednakże podstawowym dokumentem obowiązującym przy ocenie toksyczności

wyrobów medycznych jest norma PN-EN ISO 10993-5:2009, Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoxiczności *in vitro*<sup>18</sup>. Norma przewiduje 3 testy dla oceny działania toksycznego wyrobów medycznych, w zależności od rodzaju materiału, z którego jest wykonany i przeznaczenia:

- test bezpośredniego kontaktu
  - test dyfuzji w agarze
  - test na wyciągach
- Norma określa:
- warunki przygotowania hodowli do poszczególnych testów
  - rekomendowane linie komórkowe
  - warunki przygotowania próby badanej i kontroli
  - niezbędne ilości próby badanej
  - rodzaj materiału zastosowanego jako kontrola pozytywna i negatywna
  - warunki ekstrakcji
  - kryteria oceny uzyskanych efektów

Opisane procedury pozwalają na jakościową i ilościową ocenę toksyczności wyrobu medycznego. Zgodnie z normą w teście na wyciągach oceniane są zmiany morfologiczne komórek wywołane przez wyekstrahowane substancje z badanego materiału, w odniesieniu do 5-stopniowej skali toksyczności:

- stopień 0: wyrób nietoksyczny (pojedyncze wewnątrzplazmatyczne ziarnistości)
- stopień 1: wyrób słabo toksyczny (ok. 20 proc. komórek zaokrąglonych i odlepiających się, pojedyncze komórki rozerwane)
- stopień 2: wyrób umiarkowanie toksyczny (ok. 50 proc. zaokrąglonych, umiarkowana liza komórek, zahamowanie proliferacji w ok. 50 proc.)
- stopień 3: wyrób średnio toksyczny (ok. 70 proc. komórek zaokrąglonych i odlepiających się, zaawansowana liza komórek, zahamowanie proliferacji)
- stopień 4: wyrób silnie toksyczny (praktycznie zniszczona hodowla)

Podobnie wygląda ocena jakościowa w przypadku testu bezpośredniego kontaktu i testu dyfuzji w agarze z tym, że oceniany jest zakres uszkodzenia hodowli pod lub poza badanym wyrobem (wielkość strefy zmienionych morfologicznie komórek lub zahamowania wzrostu).

Dla oceny ilościowej zmian w żywotności komórek, norma PN-EN ISO 10993-5:2009 zaleca stosowanie testu z czerwinią obojętną (NR), MTT lub jego odmianą XTT a także testu tworzenia kolonii.

Poprawne przeprowadzenie procedury oceny aktywności cytotoxicznej związku lub wyrobu medycznego, wy-

► maga dysponowania odpowiednio wyposażonym laboratorium i odpowiednio przeszkoloną kadrą. Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków Narodowego Instytutu Leków posiada akredytację Polskiego Centrum Akredytacji, AB 774 i Europejskiego Dyrektoriatu ds. Jakości Leków (*European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care*), EDQM/MJA-032, w zakresie badania cytotoksyczności, jak również w zakresie oceny działania genotoksycznego (test Ames).

prof. **ELŻBIETA LIDIA ANUSZEWSKA**  
e-mail: anuszewska@il.waw.pl

#### Piśmiennictwo:

1. Anuszevska E: Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on adriamycin-induced cytotoxicity in vitro. *Archiv. Immunol. Ther. Eptl.* 42, 281-286, 1994
2. Anuszevska E L, Gruber B M, Koziorowska J H: Studies on adaptation to adriamycin in cells pretreated with hydrogen peroxide. *Biochem. Pharmacol.* 54, 597-603, 1997
3. Borenfreund E, Puerner J A: Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Letters* 24, 119-124, 1985
4. Husøy T, Syversen T, Jenssen J: Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxicol. in Vitro* 7(2), 149-154, 1993
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. Letters* 160(2), 171-177, 2006
6. 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* 251(1-2), 11-19, 2001
7. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63, 1983
8. Gruber B, Anuszevska E: Adaptacja kolorymetrycznego testu do oceny działania cytotoksycznego in vitro. *Biuletyn IL* 38(3), 5-10, 1994
9. Krzysztoń-Russjan J, Książek I, Anuszevska E: Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków. *Farm. Pol.* 65(6), 1-8, 2009
10. Voigt W: Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol. Med.* 110, 39-48, 2005
11. Gruber B M, Anuszevska E L, Skierski J S: Activation of programmed cell death (apoptosis) by adriamycin in human neoplastic cells. *Mutation Res.* 484, 87-93, 2001
12. Isama K, Matsuoka A, Haishima Y, Tsuchiya T: Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells. *Mater. Trans.* 43, 3155-3159, 2002
13. Gruber B M, Anuszevska E L: Ocena działania cytotoksycznego nowych pochodnych antracyklinowych w układzie różnych linii komórkowych. *Biuletyn IL* 45(3), 569-578, 2001
14. Radko L, Cybulski W, Rzeski W: Cytotoksyczność salinomycyny i lazolocydu wobec hepatocytów modelowej linii komórkowej szczura. *Med. Wet.* 63(7), 839-842, 2007
15. *Farmakopea Polska* wyd. VI. Badanie toksyczności tworzyw przy użyciu ustalonych linii komórkowych (badanie in vitro), str. 144, 2002
16. *U.S. Pharmacopeia* 32 / *National Formulary* 27. Biological reactivity tests in vitro, p. 97, 2009
17. Anuszevska E L: Badanie toksyczności tworzyw przy użyciu linii komórkowych in vitro. *Biuletyn IL* 39(3), 23-29, 1995
18. PN-EN ISO 10993-5:2009