

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc312198>

Методы оценки жизнеспособности клеток, культивируемых *in vitro* в 2D- и 3D-структурах

А.В. Еремеев, А.С. Пикина, Т.В. Владимирова, А.Н. Богомазова

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

На протяжении последних десятилетий методы оценки жизнеспособности клеток являются важным исследовательским инструментом в клеточной биологии, тканевой инженерии и регенеративной медицине. Кроме того, оценка жизнеспособности клеток обязательна при производстве и контроле качества клеточных продуктов для биомедицинских нужд.

Методы оценки жизнеспособности клеток можно широко классифицировать по механизму, лежащему в их основе, а также по способу оценки полученных результатов. Представлены варианты наиболее часто используемых тестов и протоколов для оценки жизнеспособности клеток. Приведены их преимущества и недостатки, которые необходимо учитывать при планировании экспериментов, например, при разработке клеточных препаратов для регенеративной медицины.

Показаны основные факторы, влияющие на выбор метода оценки жизнеспособности клеток: эффективность, быстрота исполнения, безопасность, воспроизводимость, сохранность/целостность образца, совместимость протокола исследования с биоматериалом и типом клеточной линии. Отдельно рассмотрены тесты, которые можно применять не только для 2D-клеточных структур, но и для 3D-клеточных конструкций, получивших в последнее время широкое распространение благодаря более точному моделированию биологических процессов.

Ключевые слова: анализ жизнеспособности клеток; 2D-клеточные структуры; 3D-клеточные структуры; анализ исключения красителя; колориметрический метод; флуоресцентные красители; люцинометрические анализы; проточная цитометрия.

Для цитирования:

Еремеев А.В., Пикина А.С., Владимирова Т.В., Богомазова А.Н. Методы оценки жизнеспособности клеток, культивируемых *in vitro* в 2D- и 3D-структурах // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 1. С. 5–21. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc312198>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc312198>

Methods for assessing the viability of cells cultured *in vitro* in 2D and 3D structures

Artem V. Ereemeev, Arina S. Pikina, Tatyana V. Vladimirova, Alexandra N. Bogomazova

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Over the past decades, cell viability tests have been an essential research tool in cell biology, tissue engineering, and regenerative medicine. Assessment of cell viability is mandatory in the production and quality control of cell products for biomedical applications.

Methods of viability assessment can be broadly classified according to the underlying mechanism and how the results obtained are evaluated. This article presents variants of the most commonly used tests and protocols for assessing cell viability. Their advantages and disadvantages are presented, which should be considered when planning experiments, e.g., when developing cell preparations for regenerative medicine.

The authors point out the main factors influencing the choice of viability assessment method: efficiency, speed, safety, reproducibility, sample integrity, compatibility with biomaterial, and cell line type. Finally, the authors discuss separately cell viability tests that can be applied not only to 2D cell structures but also to 3D cell structures, which have recently become widespread due to more accurate modeling of biological processes.

Keywords: viability analysis of cells; 2D cell structures; 3D cell structures; dye exclusion assay; colorimetric method; fluorescent dyes; luminometric assays; flow cytometry.

To cite this article:

Ereemeev AV, Pikina AS, Vladimirova TV, Bogomazova AN. Methods for assessing the viability of cells cultured *in vitro* in 2D and 3D structures. *Genes & cells*. 2023;18(1):5–21. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc312198>

Received: 05.03.2023

Accepted: 27.03.2023

Published: 11.04.2023

ВВЕДЕНИЕ

Оценка жизнеспособности и пролиферации клеток — необходимый этап многих биомедицинских исследований. Такая оценка используется, например, в фармакологии для определения возможного цитотоксического эффекта препаратов и химических веществ. Жизнеспособность и пролиферация оцениваются также после различных манипуляций с клетками, например криохранения, пересева или долгого культивирования. Результаты современных тестов могут предоставлять информацию не только о количестве клеток, доле живых клеток, но об их пролиферативной активности и метаболическом состоянии. В связи со всё большим распространением трёхмерных систем культивирования возрастает необходимость разработки точных методов для анализа жизнеспособности клеток в 3D-структурах и разнообразных биоматериалах. Выбор подхода к оценке жизнеспособности зависит от целей исследования, клеточной линии и других особенностей, с которыми предстоит работать, поскольку некоторые методы дают ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Надёжный метод анализа жизнеспособности клеток должен точно определять и отличать процессы, сопровождающие их гибель. Потребность в простых, быстрых, точных и универсальных тестах для разных клеточных линий и структур обусловила появление разнообразных подходов для определения жизнеспособности клеток *in vitro*. В данном обзоре систематизированы сведения по некоторым методам оценки жизнеспособности клетки с описанием специфики и ограничений каждого метода, а также способов оптимизации их использования.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

Клетки считают жизнеспособными, если они могут пролиферировать, дифференцироваться, демонстрировать нормальную и характерную для них метаболическую активность. Гибель клеток сопровождается определёнными изменениями в структуре плазматической мембраны, цитоплазмы, ядра и митохондрий. Эти признаки можно детектировать *in vitro* и использовать для определения жизнеспособности клеток в исследуемой 2D- или 3D-клеточной культуре. На данный момент существует большое разнообразие методов оценки жизнеспособности клеток, которые варьируют по сложности, точности и области применения. Часть подходов основана на детекции живых и мёртвых клеток, что позволяет определить долю живых клеток [1]. При анализе также используют физические свойства клеток, например оценку целостности мембраны или потока цитоплазмы. Ряд методов оценивают метаболическую активность клеток: например, измеряют митохондриальную активность или количество аденозинтрифосфата

(АТФ) [2]. Есть протоколы, которые предоставляют возможность исследовать отдельные популяции клеток или отдельные клетки. Для оценки результатов широко используются микроскопическая техника, счётчики клеток, планшет-ридеры или цитометры. Результаты теста на жизнеспособность клеток могут быть представлены в виде показателей концентрации полумаксимального ингибирования (IC50), кривых «доза–эффект», кривых скорости роста или скорости реакции на определённое активное вещество [3].

В целом существующие методы оценки жизнеспособности клеток можно разделить на шесть групп: анализ исключения красителя; методы колориметрического анализа; методы флуориметрического анализа; методы люцинометрического анализа; анализ с помощью точной цитометрии; безметочные методы [4]. Тесты на жизнеспособность будут рассмотрены ниже в соответствии с данной классификацией (рис. 1, 2). В отдельной главе мы опишем особенности проведения тестов на жизнеспособность в 3D-клеточных структурах.

Методы, связанные с анализом исключения красителя

Наиболее часто используемые методы основываются на пропускной способности мембран. В норме клеточная мембрана служит барьером для прохождения крупных заряженных молекул, но если её целостность нарушена, внутрь повреждённой клетки способны проходить различные светопоглощающие или флуоресцентные красители. В свою очередь живые клетки способны исключать краситель из своей среды. Проникновение красителей внутрь клетки можно идентифицировать с помощью микроскопа или спектрометрически, также можно провести подсчёт окрашенных и неокрашенных клеток в камере Горяева или с помощью автоматических счётчиков клеток.

Классический пример анализа исключения красителя — метод с использованием трипанового синего [5]. В данном случае при микроскопии в светлом поле мёртвые клетки окрашены в синий цвет, в то время как живые кажутся прозрачными. Подобный принцип действия имеют и другие нефлуоресцентные красители, например синий Эванса [6]. Процедура окрашивания проста, но из-за низкого коэффициента экстинкции может быть затруднительным выделение окрашенных клеток на фоне синего красителя, что делает оценки неточными [7]. Кроме того, для подобного рода анализов используют суспензию отдельных клеток, что не позволяет применять такие методы для оценки жизнеспособности клеток в составе 2D- и 3D-клеточных структур, состоящих из разных типов клеток и внеклеточного матрикса.

Колориметрические методы

С целью исключения описанных для вышеуказанных красителей ограничений используют тесты, которые

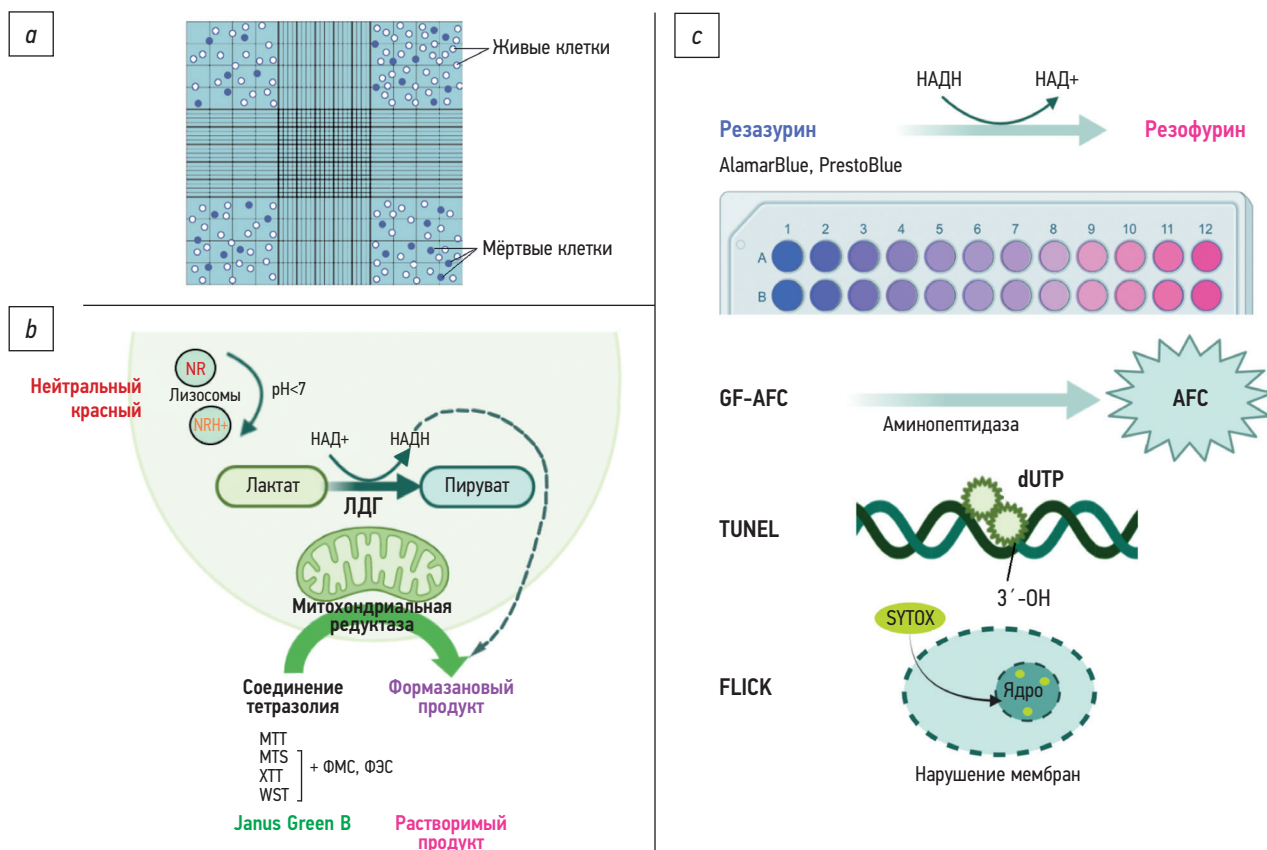


Рис. 1. Широко распространённые (рутинные) методы оценки жизнеспособности клеток: *a* — анализ исключения красителя; *b* — методы колориметрического анализа; *c* — методы флуориметрического анализа. Здесь: NR — нейтральный красный, NRH⁺ — протонированная форма нейтрального красного, НАД⁺ — никотинамидадениндинуклеотид (кофермент витамина В3), НАДН — никотинамидадениндинуклеотид, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТС — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий, ХТТ — 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфенил)-(2Н)-тетразолий-5-карбоксанилид, WST — натрий 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2Н-тетразолат, ФМС — феназинметилсульфат, ФЭС — феназин-этилсульфат, AFC — аминифторкумарин, GF-AFC — глицилфенилаланил-аминифторкумарин, TUNEL — метод анализа фрагментации хроматина, FLICK — лизис-зависимый метод (fluorescence-based and lysis-dependent inference of cell death kinetics), dUTP — (2'-дезоксидуридин-5'-трифосфат), 3'-ОН — свободные 3'-ОН группы дезоксиридина, конъюгированные с мечеными dUTP.

Fig. 1. Widely used (routine) methods for assessing cell viability: *a* — dye exclusion assay; *b* — methods of colorimetric analysis; *c* — methods of fluorometric analysis. Here: NR — neutral red, NRH⁺ — protonated form of neutral red, НАД⁺ — nicotinamide adenine dinucleotide (vitamin B3 coenzyme), НАДН — nicotinamide adenine dinucleotide, ЛДГ — lactate dehydrogenase, МТТ — 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, МТС — 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, ХТТ — 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide, WST — sodium 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolate, ФМС — phenazine methyl sulfate, ФЭС — phenazine ethyl sulfate, AFC — aminofluorocoumarin, GF-AFC — glycyphenylalanyl-aminofluorocoumarin, TUNEL — chromatin fragmentation analysis method, FLICK — lysis-dependent method (fluorescence-based and lysis-dependent inference of cell death kinetics), dUTP — (2'-deoxyuridine-5'-triphosphate), 3'-OH — free 3'-OH groups of deoxyuridine conjugated with labeled dUTP.

позволяют не разрушать структуры биомедицинского клеточного продукта и основаны на измерении метаболической активности клеток. Маркёром жизнеспособности клеток в данном случае служит, например, восстановление тетразолия или резазурина. Для этих анализов требуется инкубация клеточного материала с реагентом с целью получения окрашенного продукта, который можно обнаружить с помощью спектроскопического мультипланшетного ридера, при этом интенсивность сигнала будет пропорциональна количеству клеток.

Среди соединений тетразолия часто используемыми являются МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] [8–10]; INT [йодонитротетразолий или 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенил-2Н-тетразолий] [1]; МТС [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий] [11]; ХТТ [2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфенил)-(2Н)-тетразолий-5-карбоксанилид] [12]; WST [натрий 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2Н-тетразолат] [13]. Последние три часто применяют

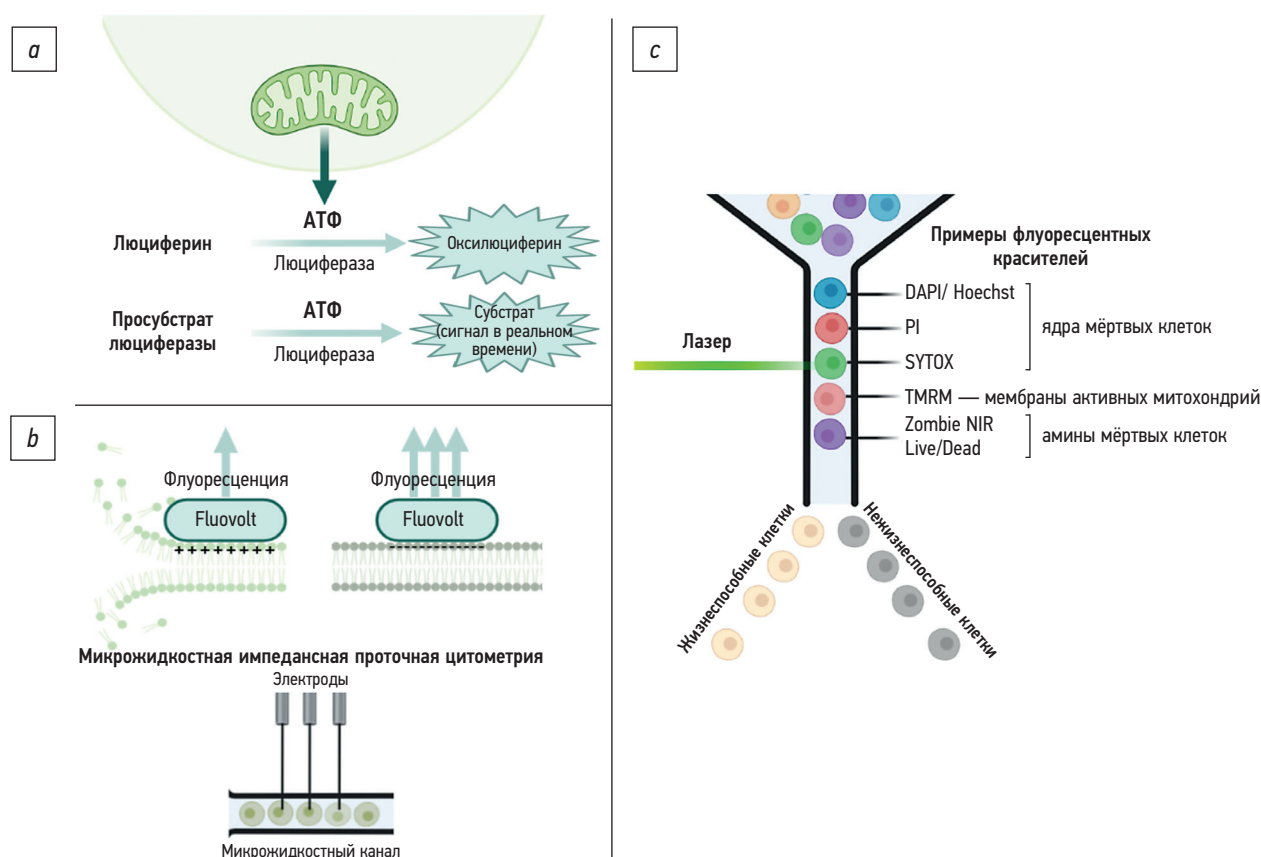


Рис. 2. Высокотехнологичные (нерутинные) методы оценки жизнеспособности клеток: *a* — методы люминиметрического анализа; *b* — безметочные методы; *c* — анализ с помощью проточной цитометрии. Здесь: АТФ — аденозинтрифосфат, PI — пропидия иодид, TMRM — метиловый эфир тетраметилродамина.

Fig. 2. High-tech (non-routine) methods for assessing cell viability: *a* — methods of luminometric analysis; *b* — labelless methods; *c* — analysis by flow cytometry. Here: АТФ — adenosine triphosphate, PI — propidium iodide, TMRM — tetramethylrhodamine methyl ester.

с добавлением промежуточных переносчиков электронов дыхательной цепи для облегчения восстановления тетразолия.

Метод на основе анализа восстановления тетразолия разработан зарубежными учёными [14] в качестве безопасной альтернативы метода, основанного на оценке включения радиоактивно-меченого тимидина в ДНК. Данный подход представляет собой простой колориметрический тест на жизнеспособность клеток. Он был одним из первых тестов, который стало возможным проводить в 96-луночном планшете, удобном для высокопроизводительного скрининга. Принцип анализа основан на способности живых клеток с активным метаболизмом превращать тетразолий в нерастворимый формазановый продукт фиолетового цвета с помощью митохондриальной редуктазы. Таким образом, методы, использующие соединения тетразолия, фактически измеряют метаболическую активность клеток.

Среди других методов оценки жизнеспособности, основанных на превращении субстрата в хромогенный продукт, анализ с помощью МТТ является наиболее популярным и универсальным. Для детекции кристаллы продукта растворяют в солюбилизующем растворе

и измеряют поглощение при 570 нм [15]. В качестве солюбилизующего агента используются диметилсульфоксид, диметилформамид, додецилсульфат натрия и комбинации детергента и органического растворителя [16]. Точный механизм реакции восстановления тетразолия пока не изучен, но предполагается, что она происходит за счёт переноса электронов с никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и других восстановительных агентов [17] при участии системы переносчика электронов митохондрий [18].

Есть несколько параметров, которые существенно влияют на интенсивность получаемого сигнала, и поэтому их следует учитывать при оптимизации процесса: концентрация МТТ, продолжительность инкубации, количество жизнеспособных клеток и их метаболическая активность. Необходимо также учитывать, что часть веществ, например аскорбиновая кислота, дикумарол или некоторые химиотерапевтические агенты, способствуют завышению значений интенсивности поглощения [19–21]. Кроме того, ошибочным результатам может способствовать присутствие в среде для культивирования сывороточного альбумина, ионов металлов и витаминов [22]. А также количество клеток и время экспозиции

клеток с МТТ влияют на количество образовавшегося формазана [23].

На результаты может повлиять и токсичность МТТ, вследствие чего после добавления и инкубации с МТТ клетки способны менять морфологию, а образуемые при восстановлении МТТ кристаллы могут повредить клетку [24]. Динамика этого процесса хорошо показана в работе с использованием кита IncuCyte™ FLR от Essen Biosciences [25].

Для предотвращения повреждения большими (относительно размеров клетки) кристаллами тетразолия разработаны методы анализа с использованием агентов, которые при восстановлении жизнеспособными клетками переходят в растворимый в культуральной среде формазановый продукт. К подобного рода соединениям относятся MTS, ХТТ и WST. Данные вещества используют вместе со вспомогательными промежуточными реагентами-акцепторами электронов (например, феназинметилсульфат или феназинэтилсульфат), которые сами восстанавливаются внутри клетки. В свою очередь передача электрона на тетразолий происходит вне клетки [3, 26].

Данные методы удобны тем, что по сравнению с МТТ-тестом не требуют дополнительного шага — солиubilизации выпавшего осадка, а измерения можно проводить несколько раз. Однако как и основные действующие вещества, так и промежуточные акцепторы могут быть токсичны, поэтому существуют рекомендации по предварительной оптимизации и подбору индивидуальных условий для конкретной клеточной линии [25].

Для восстановления тетразолия до нерастворимого формазана можно использовать и другое свойство клеток. Так, из повреждённых клеток быстро выделяется лактатдегидрогеназа (ЛДГ) — стабильный фермент, который присутствует в клетках любого типа и обеспечивает реакцию превращения лактата в пируват с выделением НАДН. Именно НАДН можно использовать для восстановления тетразолия и таким образом количественно оценивать активность ЛДГ. Для оптимизации метода исследователи рекомендуют учитывать вклад самопроизвольной выработки ЛДГ, фон питательной среды из-за влияния фенолового красного или сыворотки, а также проводить сравнение с максимальной выработкой ЛДГ в клеточном лизате. Кроме того, необходимо учитывать тип клеток и предварительно экспериментально определить оптимальное количество клеток для минимизации фонового шума [1]. Преимущество данного подхода перед анализом с использованием МТТ или MTS заключается в том, что метод позволяет в большей степени получить информацию о количестве мёртвых, а не утративших пролиферативную активность, стареющих или ранних апоптотических клеток.

Ещё один популярный тест на цитотоксичность — анализ поглощения нейтрального красного [27]. Принцип действия отличается от описанных выше подходов и основан на свойстве жизнеспособных клеток

поглощать и связывать суправитальный нейтральный красный в лизосомах. По своей структуре это вещество является производным феназина и имеет близкий к нейтральному заряд при физиологическом pH, за счёт чего проникает в клетки вследствие неионогенной пассивной диффузии. Пройдя через мембраны, краситель локализуется в лизосомах с pH=4,5–5,0, где приобретает слабopоложительный заряд и связывается с анионными (фосфатными) группами матрикса. Затем нейтральный красный экстрагируют, используя подкисленный этанол, и измеряют поглощение при 540 нм, при этом количество удерживаемого красителя прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток. За счёт своих физических свойств нейтральный красный может быть использован в широком диапазоне pH и достаточно точно определяет снижение жизнеспособности при апоптозе и аутофагии [28]. Однако, несмотря на преимущества, у данного анализа есть свои ограничения: анализ становится менее точным и эффективным при работе с образцами из криобанков из-за влияния криоконсервантов и особенностей метаболической активности клеток после разморозки.

Для визуализации митохондрий в метаболически активных клетках можно также применять катионный суправитальный краситель зелёного цвета Janus green В с максимумом поглощения 595 нм. Краситель Janus green В связывается с интактной митохондриальной мембраной с отрицательным потенциалом и расщепляется в водорастворимый продукт розового цвета с максимумом поглощения при 550 нм [22].

Флуоресцентный анализ

Флуоресцентные красители можно считать более точными и надёжными индикаторами жизнеспособности [29]. Главные плюсы анализа с их использованием — высокие воспроизводимость и чувствительность данных тестов по сравнению с колориметрическими методами и методами исключения красителя, что доказывают сообщения об использовании методов восстановления резазурина, в том числе в миниатюрном формате, для приложений высокопроизводительного скрининга [30].

Один из самых популярных подходов в этой категории анализа — восстановление резазурина, который применяют уже на протяжении более 50 лет для оценки количества метаболически активных клеток [31]. Данное вещество может проникать в клетку и за счёт действия окислительно-восстановительных ферментов превращаться в резазурин, тем самым меняя окраску с синего на красный. При этом количество образующегося резозурина пропорционально количеству жизнеспособных, метаболически активных клеток, которое можно зафиксировать колориметрически или флуориметрически [32]. Детекция проводится как на спектрофотометрах, так и на флуорометрах для микропланшетов, оснащённых набором фильтров ($\lambda_{em}=560$ нм, $\lambda_{ex}=590$ нм) [33].

Невосстановленные формы не флуоресцируют или не поглощают при определённом диапазоне спектра.

Тесты на основе восстановления резазурина наиболее часто применяют для мониторинга реакции клеток на присутствие активного вещества. Важно, что этот метод анализа позволяет отличать цитотоксическое действие препарата от цитостатического. Так, цитостатическое действие при данном подходе выглядит как характерное плато на нижней границе, не достигающее значений отрицательного контроля с отсутствием живых клеток. В случае, когда соединения имеют смешанный профиль действия, исследователи рекомендуют проводить эксперимент в отсутствие фетальной бычьей сыворотки (FBS): для цитостатического действия в этих условиях будут характерны низкие показатели IC50, для цитотоксического — более высокие [34].

С начала 2000-х гг. для исследователей стал доступен краситель AlamarBlue [35]. С его использованием разработан простой и быстрый тест, высокая чувствительность которого позволяет обнаруживать от 20 клеток на лунку [36]. Эффективность этого теста успешно проверена на различных типах клеточных линий [37–41] для большого круга исследовательских целей [42–44].

Среди недостатков выделяют токсическое действие резазурина на клетки, что отражается в изменении их морфологии, а также в снижении под его воздействием количества выделяемого клеткой АТФ. Однако в ряде экспериментов сообщают об обратном [45, 46]. Кроме того, при изучении эффекта какого-либо препарата на клетку авторы рекомендуют добавлять реагент после периода инкубации с соединением и использовать контроль, в противном случае можно получить искажённые оценки [31]. Сообщается также, что динамический

диапазон анализа на основе восстановления резазурина сильно зависит от клеточной линии, поэтому необходимо проводить оптимизацию теста для конкретного типа клеток [34], сам же резазурин может не только влиять на морфологию клеток, что показано в кинетических экспериментах с использованием клеток линии NIH-3T3, но и изменять содержание АТФ [25].

Не уступает по ряду параметров и достаточно новый краситель PrestoBlue. Метод с использованием PrestoBlue, как и при использовании AlamarBlue, обладает высокой чувствительностью по сравнению с широко используемым МТТ-тестом [47]. Хотя действующим веществом красителей AlamarBlue и PrestoBlue является резазурин и с точки зрения механизма химической реакции между ними различий нет, тесты на основе PrestoBlue, как утверждает производитель, имеют некоторые преимущества. Так, по данным производителя, PrestoBlue способен измерить жизнеспособность клеток всего за 10 мин инкубации и обнаружить 12 клеток Jurkat после 16-часовой инкубации, что говорит о высокой чувствительности и быстром действии реагента [48]. Поэтому перед началом эксперимента необходимо определить плотность покрытия для конкретной клеточной линии, так как каждый тип клеток обладает различной метаболической активностью и есть вероятность выйти за пределы линейной зависимости (рис. 3).

Среди других преимуществ PrestoBlue можно выделить его нетоксичность и стабильность при условии защиты реагента от света. На данный момент разработан новый высокочувствительный анализ hsPrestoBlue, который содержит резазурин высокой степени очистки и буфер с физиологическим pH. Данный тест более эффективен в определении жизнеспособности клеток

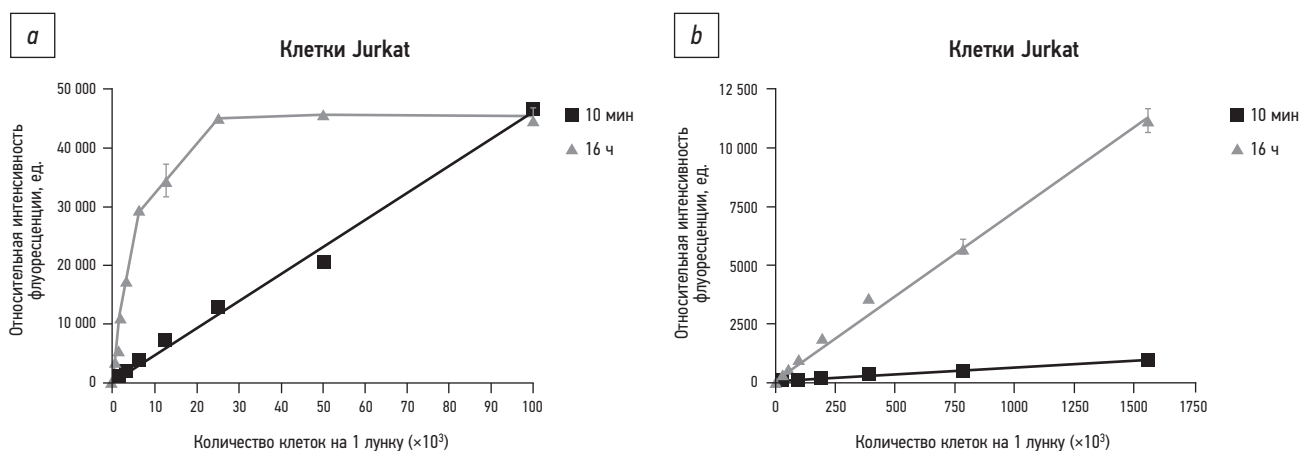


Рис. 3. Влияние количества клеток и времени инкубации с реагентом PrestoBlue на формирование флуоресцентного сигнала [48]: *a* — 10-минутный инкубационный период демонстрирует линейную корреляцию ($r_2=0,99$) между флуоресценцией и числом клеток для $0-10 \times 10^4$ клеток; *b* — в течение 16-часового инкубационного периода снова наблюдается повышение чувствительности анализа, но потеря линейности выше $10\,000$ клеток на лунку.

Fig. 3. The effect of the number of cells and the incubation time with the PrestoBlue reagent on the formation of a fluorescent signal [48]: *a* — the 10-minute incubation period demonstrates a linear correlation ($r_2=0.99$) between fluorescence and the number of cells for $0-10 \times 10^4$ cells; *b* — during the 16-hour incubation period, an increase in the sensitivity of the analysis is again observed, but the loss of linearity is higher than 10,000 cells per well.

и позволяет получить более сильный сигнал по сравнению с привычным аналогом. Показано [32], что новый метод близко подходит к решению проблемы искажения результатов, полученных с помощью других тестов на основе восстановления резазурина, из-за аутофлуоресценции и низкого соотношения сигнал–фон вследствие загрязнения реагентов резозурином или наличия дополнительных стабилизирующих веществ. Так, hsPrestoBlue демонстрирует значительное снижение аутофлуоресценции и 1,4-кратное увеличение отношения сигнальной флуоресценции к фоновой по сравнению с обычным анализом PrestoBlue [32]. Однако и для классического анализа PrestoBlue, и для других тестов на основе восстановления резазурина исследователи предлагают ряд мер по оптимизации метода: например, учитывая разницу значений измеряемой интенсивности флуоресценции, оценить изменение коэффициента поглощения при длинах волн для резазурина и резозурина.

Есть и другие варианты флуоресцентного анализа. Например, разработан новый субстрат протеазы — глицилфенилаланил-аминофторкумарин (GF-AFC), который при действии фермента метаболически активных клеток превращается в аминофторкумарин (AFC), в результате чего генерируется флуоресцентный сигнал, интенсивность которого пропорциональна количеству жизнеспособных клеток [47]. Кроме того, GF-AFC практически не токсичен для клеток, что является большим преимуществом на фоне методов с восстановлением тетразолия и резазурина [25].

Широко используется метод анализа фрагментации хроматина TUNEL, в котором места разрывов ДНК метят при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы и меченого dUTP (2'-дезоксидиридин-5'-трифосфат). Этот подход позволяет обнаруживать в апоптотических клетках деградирующую ДНК путём присоединения к свободным 3'-ОН-группам дезоксирибина, конъюгированного с биотином или флуоресцином. При флуоресцентном мечении апоптотические клетки выглядят как клетки с гетерогенно окрашенными ядрами. Для мечения разрывов ДНК можно использовать также 5-бром-2-дезоксидиридин-5-трифосфат (BrdUTP) и флуоресцентные антитела к нему — этот подход более чувствителен и приводит к усилению флуоресценции [3].

Иммуноцитохимическое окрашивание также используется для визуализации продуктов активности каспазы-3 (ключевого участника терминальных процессов апоптоза) или фрагментов расщепления её предшественника — прокаспазы-3. Такое иммуноокрашивание можно совмещать с методом TUNEL, что позволяет количественно оценить процент апоптотических клеток.

С помощью измерения интенсивности флуоресценции также возможно изучение кинетики клеточной гибели или реакции клеток на активное вещество с помощью лизис-зависимого метода FLICK (fluorescence-based and lysis-dependent inference of cell death kinetics). Разработчики рекомендуют проводить несколько измерений

интенсивности флуоресценции красителя SYTOX или любого другого красителя мёртвых клеток во времени, завершая эксперимент фиксированием значения флуоресценции в пермеабелизованных детергентом Triton X-100 клетках [49].

Изучение состояния митохондрий методом флуоресцентного анализа также может быть инструментом оценки жизнеспособности клеток. Для этого существуют специальные зонды, например тетраметилродамин, BODIPY и другие. Такие зонды демонстрируют эффективность в динамическом отслеживании митохондрий, но их применение ограничено из-за цитотоксичности и невысокой фотостабильности. В связи с этим исследователи рекомендуют использовать кумарин-хинолиновые конъюгаты (CQC), которые обладают высоким квантовым выходом и достаточной фотостабильностью, а также алкалоидоподобными, липофильными свойствами, способствующими надёжному связыванию с мембраной митохондрий за счёт гидрофобного взаимодействия [50].

Люминометрический анализ

В люминометрических тестах на жизнеспособность используют реакции, эффектом которых является генерация света. Существует два популярных метода: один позволяет оценить количество АТФ, второй — наблюдать за количеством жизнеспособных клеток в режиме реального времени. Протоколы усовершенствованы для использования одного реагента, а сигнал можно получить после 10 мин инкубации, что делает люминометрический анализ одним из самых быстрых тестов. Детекция сигнала проводится с помощью люциметров [51].

Использование люциферазы светлячка для определения количества АТФ — один из самых распространённых методов в высокопроизводительном скрининге [51, 52]. Принцип анализа базируется на том, что АТФ является важным компонентом для реакции окисления люциферина люциферазой, в ходе которой можно наблюдать явление люминесценции. АТФ служит надёжным маркером для определения жизнеспособности клеток, так как при гибели клетки синтез АТФ останавливается, а остатки молекул элиминируются АТФазами. Поэтому стандартные наборы для данного анализа включают смесь, в состав которой входят детергент для лизиса клеток, ингибиторы АТФаз для стабилизации количества АТФ и люциферин — субстрат и стабильная форма люциферазы для катализа реакции [25]. Метод имеет высокую чувствительность: сообщается о линейной зависимости между люминесцентным сигналом и количеством клеток от 0 до 50 000 клеток на лунку 96-луночного планшета [53]. Однако, несмотря на чувствительность и быстроту получения сигнала, данный тип анализа подразумевает разрушение клеток, что делает невозможным дальнейшее исследование данной культуры — измерение в конечной точке. Для случаев, когда необходимы кинетический анализ или проверка токсичности соединений

на протяжении нескольких часов или дней, исследователи прибегают к анализу жизнеспособности в режиме реального времени.

В методе люминометрического анализа в режиме реального времени так же, как и в методе с оценкой количества АТФ, используют реакцию люциферазы с субстратом. Для этого требуется очищенная люцифераза и её просубстрат, который способен проходить в клетки и под действием восстановительного потенциала фермента превращаться в полноценный субстрат [54]. Данные реагенты нетоксичны для клеток, а расход просубстрата зависит от активности клеток. Таким образом можно добиться непрерывного свечения сигнала длительностью до 72 ч и наблюдать за жизнеспособностью клеток в течение нескольких дней [55].

Анализ с помощью проточной цитометрии

Метод проточной цитометрии широко используется для количественного анализа отдельных клеток и предусматривает сложный анализ, позволяющий изучать несколько характеристик благодаря комбинации соответствующих красителей в одном образце [56]. Каждая клетка проходит через световой пучок одного или более лазеров, в результате фиксируют светорассеяние и различные параметры флуоресценции. Для измерения флуоресценции на данный момент существует множество различных подходов к подготовке образцов: использование антител с флуоресцентными метками, окрашивание флуоресцентными красителями (например, ДНК-связывающими или красителями-индикаторами ионов), экспрессия флуоресцентных белков [57].

В случае применения проточной цитометрии для анализа жизнеспособности используются флуоресцентные красители, окрашивание которыми зависит от целостности плазмолеммы. Среди них можно выделить следующие:

- пропидий йодид (PI) — популярный красный флуоресцентный краситель для хромосом и ядер, который не способен проникать в живые клетки [58];
- DAPI, который обеспечивает синее флуоресцентное окрашивание ДНК и используется в основном для окраски фиксированных клеток, однако при высоких концентрациях проникает для клеток [59, 60];
- SYTOX [61, 62];
- Hoechst 33342, который в отличие от вышеописанных красителей способен проникать в живые клетки, что облегчает процедуру окрашивания [54];
- метиловый эфир тетраметилродамина (TMRM), который накапливается на мембране активных митохондрий жизнеспособных клеток [63].

Существуют также красители, которые связываются с аминами разрушенных клеток:

- Zombie NIR (BioLegend, США) — полярный водный краситель, обеспечивающий красную флуоресценцию [64];

- красители серии Live/Dead (Thermo Fisher Scientific, США), цвет которых варьирует в достаточно широких пределах от синего до ближнего ИК-излучения [65];
- BD Horizon Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences, Индия), который ковалентно связывается с аминами клетки, увеличивая значение флуоресценции в 10–20 раз на фоне жизнеспособных клеток [66].

Меченные подобными красителями клетки можно фиксировать, что позволяет проводить внутриклеточное окрашивание, обеззараживание культуры, замораживание без потери флуоресцентного сигнала. Флуоресцентные красители также можно использовать в сочетании с красителями на основе резазурина — это позволяет получить сигнал от двух отдельных популяций живых и мёртвых клеток [34]. Существенным недостатком перечисленных флуоресцентных красителей является их токсичность. Так, для PI отмечаются негативное влияние на клеточный цикл и повреждающее действие на ДНК, а для TMRM — фототоксичность при высокой концентрации [63].

Используют также метод сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). В этом случае можно эффективно применять меченные флуорохромом соединения в сочетании с витальными красителями. Например, с помощью меченого аннексина V можно провести детекцию апоптотических клеток, поскольку он обладает высоким сродством к мембранному фосфолипиду фосфатидилсерину, который экспонируется на внешнюю сторону плазматической мембраны в процессе апоптоза клетки. При использовании аннексина V совместно с витальным красителем, например пропидием йодидом, можно провести сортировку живых, мёртвых или подвергающихся апоптозу клеток [3].

Однако, несмотря на главное преимущество проточной цитометрии — мультипараметричность анализа, для её проведения необходимым является этап приготовления клеточной суспензии, что ограничивает использование данного метода в оценке жизнеспособности клеток 3D-конструкций.

Безметочные методы

Клеточная мембрана жизнеспособных клеток с нормальным метаболизмом имеет ограниченный транспорт. Значительную роль в барьерной функции плазматической мембраны при этом играет мембранный потенциал. Необратимая потеря целостности плазмалеммы приводит к увеличению мембранного потенциала и деполаризации, что можно использовать для определения мёртвых клеток в популяции. Сообщается, что некоторые флуоресцентные красители, например Fluovolt, способны реагировать на повышение мембранного потенциала благодаря чувствительному к напряжению компоненту-донору в структуре [67]. Однако есть вероятность ложноположительных результатов вследствие фиксации увеличения

разности потенциалов при изменениях в структуре клеточной мембраны, не приводящих к гибели клетки. Кроме того, необходимо учитывать, что для некоторых типов клеток, например нейрональных, характерна способность к деполяризации [67].

Ещё одно свойство клеточной мембраны, которое можно использовать для анализа жизнеспособности, — поляризация при воздействии на клетку переменным электрическим полем. Поскольку диэлектрические свойства живых и мёртвых клеток различны, это позволяет дифференцировать их по «электрическому фенотипу». На этом основании разработаны методы определения импеданса. Например, микрожидкостная импедансная проточная цитометрия (μ IFC), позволяющая получить величину импеданса, вычислить отношение высокочастотных его значений к низкочастотным (непрозрачность импеданса) и выделить популяции живых и мёртвых клеток [63]. Однако движение клеток на электроде способно привести к колебаниям импеданса и детекции шума. Эту проблему может преодолеть исследование нормализованного по площади импеданса (ANIS), которое является более стабильным и минимизирует вклад ошибки измерения, но в то же время представляет собой односторонний анализ, поскольку проводит детекцию только живых клеток [68].

Большое преимущество безметочных методов оценки жизнеспособности с помощью измерения мембранного потенциала или импеданса — их относительная безопасность, что позволяет использовать клеточный материал для дальнейших исследований [63].

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК В 3D-СТРУКТУРАХ

В настоящее время для моделирования различных заболеваний, а также тестирования токсичности или лекарственной эффективности препаратов всё чаще отдаётся предпочтение 3D-клеточным структурам, которые точнее имитируют биологические реакции тканей живого организма. Органоиды и трёхмерные конструкции на основе клеток, помещённых в экзогенный внеклеточный матрикс или синтетический гидрогель, имеют более сложную архитектуру, что затрудняет использование ряда традиционных методов оценки жизнеспособности клеток. Размер 3D-конструкций, неоднородный состав, большая клеточная плотность могут являться барьером для проникновения стандартных красителей, что приведёт к искажению результатов [69, 70]. Таким образом, существует потребность в анализе, отличающемся простотой воспроизведения и подходящем для сложного трёхмерного окружения.

В настоящее время большинство исследователей, работающих с 3D-конструкциями, по-прежнему прибегают к протоколам определения жизнеспособности, разработанным для 2D-культуры, что может быть связано

с относительно недавним началом развития новых подходов оценки для 3D-конструкций. Тем не менее в связи с изменением фокуса исследований с 2D- на 3D-культуры необходима оценка привычных методов анализа жизнеспособности клеток применительно к 3D-системам. Так, на криосрезах метод с трипановым синим показал наиболее точные результаты в сравнении с окрашиванием реакций ЛДГ либо кальцеином АМ или гомодимером этидия-1 [71, 72]. Традиционные методы оценки жизнеспособности применительно к 3D-требуют дополнительных манипуляций, а в случае метода с трипановым синим — разрушения каркаса, что увеличивает время эксперимента, приводит к непригодности клеточного продукта для дальнейших исследований и неточной оценке. Решить эту проблему авторы работы [73] предлагают с помощью измерения различия в аутофлуоресценции, которая возникает из-за изменений метаболической активности (уровня НАДН) в клетках. В данном исследовании полученные данные аутофлуоресцентного излучения живых и мёртвых клеток отличались как по интенсивности, так и по спектру. Для такого типа исследований необходимо специальное дорогостоящее оборудование (двухфотонный и/или конфокальный микроскоп), которое не всегда имеется в распоряжении лабораторий либо биотехнологических площадок. Ограничение по доступу к конфокальному микроскопу может возникнуть при определении жизнеспособности клеток 3D-структур с помощью флуоресцентных красителей, таких как PI или Hoechst 33342 [74, 75].

В других случаях используют стандартные автоматизированные для 2D-структур колориметрические, флуориметрические и люмометрические методы. Среди них более подходящим для 3D-клеточных конструкций считается анализ на основе АТФ с люминесцентными показаниями [76]. Для данного рода исследований существуют готовые наборы производства Promega Corporation (США), отдельные как для 2D- (CellTiter-Glo) [53], так и для 3D-структур (CellTiter-Glo 3D) [77]. Разработчики продемонстрировали более высокую способность буфера для 3D-структур лизировать небольшие сфероиды, что может свидетельствовать о получении более надёжных результатов, однако в ряде работ опровергается данный факт и говорится о сопоставимых результатах, получаемых с использованием обоих наборов [77]. Для клеточных систем с 3D-коллагеновыми каркасами исследователи советуют использовать наборы реагентов с литическим компонентом. Например, при растворении такого каркаса к получаемой клеточной суспензии эффективно применять метод FACS с использованием BrdUTP, однако в этом случае выявить расположение жизнеспособной клеточной популяции внутри трёхмерной структуры не представляется возможным. Для получения такой информации рекомендуют использовать красители Live/Dead и визуализировать результат с помощью конфокальной микроскопии и создания Z-стэков, но при этом следует учитывать ряд ограничений, таких как рабочее

расстояние микроскопа и пропускная оптическая способность каркаса или гидрогеля [78].

Неоднозначные результаты получаются также при сравнении методов, основанных на восстановлении резазурина и тетразолия [79]. Для данного типа анализов существенным критерием служит выбор каркаса. Так, при использовании коллагеновых матриц возможно искажение результатов тестов на основе резазурина в сравнении с 2D-структурами, так как молекулы резазурина застревают в порах носителя [69]. Данные неточности можно предотвратить, если учитывать диффузию красителей через поры каркаса или увеличить время инкубации.

В лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России продемонстрировано успешное определение жизнеспособности мозговых сфероидов без синтетических каркасов с использованием одного из самых распространённых флуоресцентных красителей PrestoBlue, а также предложен протокол оценки качества полученного биомедицинского клеточного продукта, который представляет собой имплант хряща из аутологичных слоёв хондроцитов (3–5 слоёв) — мультихондропласт или сфероиды из хондроцитов [80].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данный момент существует множество технологий анализа, которые можно применять для оценки жизнеспособности клеток, цитотоксичности и пролиферативной активности. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки, что необходимо иметь в виду при проведении эксперимента. Можно выделить несколько методов для оценки жизнеспособности клеток. Безусловно, одним из самых чувствительных и быстрых тестов является анализ измерения АТФ, однако стоит принять во внимание, что измерения в конечной точке проводятся с разрушением клеточных структур. Не уступают по чувствительности и менее дорогие аналоги — анализы восстановления тетразолия и резазурина, последний из которых является наиболее современным, безопасным и эффективным красителем. Тем не менее при выборе метода оценки жизнеспособности клеток в 2D- и 3D-структурах стоит опираться на ряд факторов, таких как эффективность, быстрота, безопасность,

воспроизводимость, сохранность образца, совместимость с биоматериалом, типом клеточной линии. В соответствии со спецификой метода и эксперимента необходимо подбирать уникальные для данной клеточной системы условия теста на жизнеспособность, чтобы на выходе получить релевантные результаты.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Данная обзорная публикация выполнена в рамках государственного задания «Опора-2», номер государственного учета НИОКТР 121101500075-7.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов: А.В. Еремеев — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, редактирование статьи; А.С. Пикина — подготовка и написание текста статьи; Т.В. Владимирова — сбор и анализ литературных источников, подготовка графического материала; А.Н. Богомазова — финальное редактирование и правка. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This publication was carried out with state funding for the «Opора-2» project, state registration number of R&D 121101500075-7.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution: A.V. Eremeev — literature review, collection and analysis of literary sources, editing of the article; A.S. Pikina — preparation and writing of the text of the article; T.V. Vladimirova — collection and analysis of literary sources, preparation of graphic material, A.N. Bogomazova — final editing and editing. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of cell viability by the MTT assay // *Cold Spring Harb Protoc.* 2018. Vol. 2018, N 6. doi: 10.1101/pdb.prot095505
2. Castro-concha L.A., Escobedo R.M., Miranda-Ham Mde L. Measurement of cell viability // *Methods Mol Biol.* 2012. Vol. 877. P. 49–56. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_5
3. Kabakov E., Gabai V.L. Cell death and survival assays // *Methods Mol Biol.* 2018. Vol. 1709. P. 107–127. doi: 10.1007/978-1-4939-7477-1_9
4. Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays // *Food Frontiers.* 2020. Vol. 1, N 3. P. 332–349. doi: 10.1002/fft2.44

5. Strober W. Trypan Blue exclusion test of cell viability // *Curr Protoc Immunol*. 2001. Suppl 3. P. 3B. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21
6. Huang C.N., Cornejo M.J., Bush D.S., Jones R.L. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining // *Protoplasma*. 1986. Vol. 135. P. 80–87. doi: 10.1007/BF01277001
7. Babakhanova G., Zimmerman S.M., Pierce L.T., et al. Quantitative, traceable determination of cell viability using absorbance microscopy // *PLoS One*. 2022. Vol. 17, N 1. P. e0262119. doi: 10.1371/journal.pone.0262119
8. Alamoudi W.A., Ahmad F., Acharya S. A simplified colorimetric method for rapid detection of cell viability and toxicity in adherent cell culture systems // *J BUON*. 2018. Vol. 23, N 5. P. 1505–1513.
9. Boncler M., Rózalski M., Krajewska U., et al. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells // *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2014. Vol. 69, N 1. P. 9–16. doi: 10.1016/j.vascn.2013.09.003
10. Bopp S.K., Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line // *BMC Pharmacol*. 2008. Vol. 8. P. 8. doi: 10.1186/1471-2210-8-8
11. Cory H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture // *Cancer Commun*. 1991. Vol. 3, N 7. P. 207–212. doi: 10.3727/095535491820873191
12. Goodwin J., Holt S.J., Downes S., Marshall N.J. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS // *J Immunol Methods*. 1995. Vol. 179. P. 95–103. doi: 10.1016/0022-1759(94)00277-4
13. Lutter A.H., Scholka J., Richter H., Anderer U. Applying XTT, WST-1, and WST-8 to human chondrocytes: a comparison of membrane-impermeable tetrazolium salts in 2D and 3D cultures // *Clin Hemorheol Microcirc*. 2017. Vol. 67, N 3-4. P. 327–342. doi: 10.3233/CH-179213
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods*. 1983. Vol. 65. P. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
15. Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S., Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and Resazurin: basic color proliferative assays MTT, WST, Resazurin // *Methods Mol Biol*. 2017. Vol. 1601. P. 1–17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1
16. Hall M.D., Martin C., Ferguson D.J., et al. Comparative efficacy of novel platinum (IV) compounds with established chemotherapeutic drugs in solid tumour models // *Biochem Pharmacol*. 2004. Vol. 67, N 1. P. 17–30. doi: 10.1016/j.bcp.2003.07.016
17. Berridge M.V., Tan A.S. Characterization of the cellular reduction of (MTT) subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction // *Arch Biochem Biophys*. 1993. Vol. 303, N 2. P. 474–482. doi: 10.1006/abbi.1993.1311
18. Bernas T., Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes // *Cytometry*. 2002. Vol. 47, N 4. P. 236–242. doi: 10.1002/cyto.10080
19. Chakrabarti R., Kundu S., Kumar S., Chakrabarti R. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C // *J Cell Biochem*. 2000. Vol. 80, N 1. P. 133–138. doi: 10.1002/1097-4644(20010101)80:1<133::AID-JCB120>3.0.CO;2-T
20. Collier C., Pritsos C.A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay // *Biochem Pharmacol*. 2003. Vol. 66, N 2. P. 281–287. doi: 10.1016/S0006-2952(03)00240-5
21. Ulukaya E., Colakogullari M., Wood E.J. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay // *Chemotherapy*. 2004. Vol. 50, N 1. P. 43–50. doi: 10.1159/000077285
22. Vistica D.T., Skehan P., Scudiero D., et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production // *Cancer Res*. 1991. Vol. 51, N 10. P. 2515–2520.
23. Promega Corporation. CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Instructions use of products G4000 and G41000. Technical Bulletin. USA, 2012.
24. Lü L., Zhang L., Mun Wai M., et al. Toxicology in vitro exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury // *Toxicol In Vitro*. 2012. Vol. 26, N 4. P. 636–644. doi: 10.1016/j.tiv.2012.02.006
25. Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., et al. Cell viability assays // *Assay Guid Man*. 2004. C. 1–25.
26. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction // *Biotechnol Annu Rev*. 2005. Vol. 11. P. 127–152. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7
27. Repetto G., del Peso A., Zurita J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity // *Nat Protoc*. 2008. Vol. 3, N 7. P. 1125–1131. doi: 10.1038/nprot.2008.75
28. Gomez-gutierrez J.G., Bhutiani N., McNally M.W., et al. During autophagy or in an acidic microenvironment in vitro // *Biotech Histochem*. 2022. Vol. 96, N 4. P. 302–310. doi: 10.1080/10520295.2020.1802065
29. Altman S.A., Randers L., Rao G. Comparison of Trypan Blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations // *Biotechnol Prog*. 1993. Vol. 9, N 6. P. 671–674. doi: 10.1021/bp00024a017
30. Shum D., Radu C., Kim E., et al. A high density assay format for the detection of novel cytotoxic agents in large chemical libraries // *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2008. Vol. 23, N 6. P. 931–945. doi: 10.1080/14756360701810082
31. O'Brien O., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // *Eur J Biochem*. 2000. Vol. 267, N 17. P. 5421–5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
32. Luzak B., Siarkiewicz P., Boncler M. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells // *Toxicol In Vitro*. 2022. Vol. 83. P. 105407. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105407
33. Ahmed S.A., Gogal R.M., Walsh J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H] thymidine incorporation assay // *J Immunol Methods*. 1994. Vol. 170, N 2. P. 211–224. doi: 10.1016/0022-1759(94)90396-4
34. Lavogina D., Lust H., Tahk M.J., et al. Revisiting the Resazurin-based sensing of cellular viability: widening the application horizon // *Biosensors (Basel)*. 2022. Vol. 12, N 4. P. 196. doi: 10.3390/bios12040196
35. Patent USA N 5501959/26.03.1996. Lancaster M.V., Fields R.D. Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. Режим доступа: <https://patentimages.storage.googleapis.com/e5/b8/74/fadfc8c037ebbc/US5501959.pdf>

36. <https://www.thermofisher.com/> [Internet]. Invitrogen Corporation. AlamarBlue™ HS cell viability reagent. Доступ по ссылке: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A50100>
37. Voytik-Harbin S.L., Brightman A.O., Waisner B., et al. Application and evaluation of the alamarblue assay for cell growth and survival of fibroblasts // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998. Vol. 34, N 3. P. 239–246. doi: 10.1007/s11626-998-0130-x
38. Nakayama G.R., Caton M.C., Nova M.P., Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro // *J Immunol Methods.* 1997. Vol. 204, N 2. P. 205–208. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00043-4
39. Hamid R., Rotshteyn Y., Rabadi L., et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening // *Toxicol in Vitro.* 2004. Vol. 18, N 5. P. 703–710. doi: 10.1016/j.tiv.2004.03.012
40. Shahan T.A., Siegel P.D., Sorenson W.G., et al. A sensitive new bioassay for tumor necrosis factor // *J Immunol Methods.* 1994. Vol. 175, N 2. P. 181–187. doi: 10.1016/0022-1759(94)90361-1
41. Dayeh V.R., Bols N.C., Schirmer K. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants: an update following OECD's fish toxicity testing framework No. 171 // *Curr Protoc Toxicol.* 2013. Chapter 1. Unit1.5. doi: 10.1002/0471140856.tx0105s56
42. White M.J., DiCaprio M.J., Greenberg D.A. Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures // *J Neurosci Methods.* 1996. Vol. 70, N 2. P. 195–200. doi: 10.1016/S0165-0270(96)00118-5
43. Yu S.Y., Sales K.M., Fuller B.J., et al. Inducing apoptosis of human colon cancer cells by an IGF-I D domain analogue peptide // *Mol Cancer.* 2008. Vol. 7. P. 17. doi: 10.1186/1476-4598-7-17
44. Yajko M., Madej J.J., Lancaster M.V., et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis* // *J Clin Microbiol.* 1995. Vol. 33, N 9. P. 2324–2327. doi: 10.1128/jcm.33.9.2324-2327.1995
45. Xu M., Mccanna D.J., Sivak J.G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells // *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2015. Vol. 71. P. 1–7. doi: 10.1016/j.vascn.2014.11.003
46. Yu H.G., Chung H., Yu Y.S., et al. A new rapid and non-radioactive assay for monitoring and determining the proliferation of retinal pigment epithelial cells // *Korean J Ophthalmol.* 2003. Vol. 17, N 1. P. 29–34. doi: 10.3341/kjo.2003.17.1.29
47. Niles L., Moravec R.A., Hesselberth P., et al. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers // *Anal Biochem.* 2007. Vol. 366. P. 197–206. doi: 10.1016/j.ab.2007.04.007
48. <https://assets.thermofisher.com/> [Internet]. Invitrogen. PrestoBlue® Cell Viability Reagent. Режим доступа: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018370-PrestoBlueCellViabilityReagent-PI.pdf>
49. Richards R., Honeywell M.E., Lee M.J. FLICK: an optimized plate reader-based assay to infer cell death kinetics // *STAR Protoc.* 2021. Vol. 2, N 1, P. 100327. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100327
50. Yang N., Hui W., Dong S., et al. Temperature tolerance electric cell-substrate impedance sensing for joint assessment of cell viability and vitality // *ACS Sens.* 2021. Vol. 6, N 10. P. 3640–3649. doi: 10.1021/acssensors.1c01211
51. Lundin A. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites // *Methods Enzymol.* 2001. Vol. 305, N 1975. P. 346–370. doi: 10.1016/s0076-6879(00)05499-9
52. Auld S., Zhang Y.Q., Southall N.T., et al. A basis for reduced chemical library inhibition of firefly luciferase obtained from directed evolution // *J Med Chem.* 2009. Vol. 52, N 5. P. 1450–1458. doi: 10.1021/jm8014525
53. Promega Corporation. CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay. [Internet]. Madison, USA, 2023. Доступ по ссылке: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf?rev=0d95c232094b41daa06d0c110d1d916f&sc_lang=en
54. <https://worldwide.promega.com/> [Internet]. RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay. Доступ по ссылке: https://no.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/realtime_glo-mt-cell-viability-assay/?catNum=G9711
55. Duellman S.J., Zhou W., Meisenheimer P., et al. Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening // *Assay Drug Dev Technol.* 2015. Vol. 13, N 8. P. 456–465. doi: 10.1089/adt.2015.669
56. Ibrahim S.F., van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007. Vol. 106. P. 19–39. doi: 10.1007/10_2007_073
57. Mckinnon K.M. Flow cytometry: an overview // *Curr Protoc Immunol.* 2018. Vol. 120. P. 5.1.1–5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40
58. Wagner T., Guber S.E., Stubenrauch M.L. Low propidium iodide intensity in flow cytometric white blood cell counting as a marker of cell destruction? // *Transfusion.* 2005. Vol. 45, N 2. P. 228–233. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.04213.x
59. Moravvej H., Memariani H., Memariani M., et al. Evaluation of fibroblast viability seeded on acellular human amniotic membrane // *Biomed Res Int.* 2021. Vol. 2021. P. 5597758. doi: 10.1155/2021/5597758
60. <https://www.thermofisher.com/> [Internet]. ThermoFisher Scientific. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Доступ по ссылке: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>
61. Richards R., Schwartz H.R., Honeywell M.E. Drug antagonism and single agent dominance result from differences in death kinetics // *Nat Chem Biol.* 2020. Vol. 16, N 7. P. 791–800. doi: 10.1038/s41589-020-0510-4
62. Masuda S., Shimizu S., Matsuo J., et al. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry // *Cytom Part A.* 2017. Vol. 91, N 8. P. 822–829. doi: 10.1002/cyto.a.23169
63. Zhong J., Yang D., Zhou Y., et al. Multi-frequency single cell electrical impedance measurement for label-free cell viability analysis // *Analyst.* 2021. Vol. 146, N 6, P. 1848–1858. doi: 10.1039/d0an02476g
64. <https://d1spb2x7qk4bg.cloudfront.net/> [Internet]. BioLegend Corporation. Zombie NIR™ Fixable Viability Kit. Доступ по ссылке: <https://d1spb2x7qk4bg.cloudfront.net/fr-lu/products/zombie-nir-fixable-viability-kit-8657?pdf=true&displayInLine=true&leftRightMargin=15&topBottomMargin=15&filename=Zombie%20NIR%E2%84%A2%20Fixable%20Viability%20Kit.pdf&v=20220831123135>
65. <https://www.thermofisher.com/> [Internet]. ThermoFisher Scientific. Live/Dead cell viability assays. Доступ по ссылке: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cell-analysis/>

cell-viability-and-regulation/cell-viability/live-dead-cell-viability-assays.html

66. <https://www.bdbiosciences.com/> [Internet]. BD Biosciences. *Fixable Viability Stain 780*. Доступ по ссылке: <https://www.bdbiosciences.com/content/bdb/paths/generate-tds-document.au.565388.pdf>

67. Madorran E., Stožer A., Arsov Z., et al. A promising method for the determination of cell viability: the membrane potential cell viability assay // *Cells*. 2022. Vol. 11, N 15. P. 2314. doi: 10.3390/cells11152314

68. Zhang R., Wei M., Chen S., et al. A cell viability assessment method based on area-normalized impedance spectrum (ANIS) // *Biosens Bioelectron*. 2018. Vol. 110. P. 193–200. doi: 10.1016/j.bios.2018.03.041

69. Bonnier F., Keating M.E., Wróbel T.P., et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models // *Toxicol In Vitro*. 2015. Vol. 29, N 1. P. 124–131. doi: 10.1016/j.tiv.2014.09.014

70. Walzl A., Unger C., Kramer N., et al. The resazurin reduction assay can distinguish cytotoxic from cytostatic compounds in spheroid screening assays // *J Biomol Screen*. 2014. Vol. 19, N 7. P. 1047–1059. doi: 10.1177/1087057114532352

71. Gantenbein-Ritter B., Potier E., Zeiter S., et al. Accuracy of three techniques to determine cell viability in 3D tissues or scaffolds // *Tissue Eng Part C Methods*. 2008. Vol. 14, N 4. P. 353–358. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0313

72. Sanfilippo S., Canis M., Ouchchane L., et al. Viability assessment of fresh and frozen/thawed isolated human follicles: reliability of two methods (Trypan blue and Calcein AM/ethidium homodimer-1) // *J Assist Reprod Genet*. 2011. Vol. 28, N 12. P. 1151–1156. doi: 10.1007/s10815-011-9649-y

73. Dittmar R., Potier E., Van Zandvoort M., Ito K. Assessment of cell viability in three-dimensional scaffolds using cellular auto-fluores-

cence // *Tissue Eng Part C Methods*. 2012. Vol. 18, N 3. P. 198–204. doi: 10.1089/ten.tec.2011.0334

74. Kessel S., Cribbes S., Bonasu S., et al. Real-time viability and apoptosis kinetic detection method of 3D multicellular tumor spheroids using the Celigo Image Cytometer // *Cytom Part A*. 2017. Vol. 91, N 9. P. 883–892. doi: 10.1002/cyto.a.23143

75. Chabert C., Laporte C., Fertin A., et al. New automatized method of 3D multiculture viability analysis based on confocal imagery: application to islets and mesenchymal stem cells co-encapsulation // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018. Vol. 9. P. 272. doi: 10.3389/fendo.2018.00272

76. Forsythe S.D., Devarasetty M., Shupe T., Bishop C. Environmental toxin screening using human-derived 3D bioengineered liver and cardiac organoids // *Front Public Heal*. 2018. Vol. 6. P. 1–10. doi: 10.3389/fpubh.2018.00103

77. <https://worldwide.promega.com/> [Internet]. 3D Cell Viability Assay. Доступ по ссылке: https://www.promega.co.uk/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-glo-3d-cell-viability-assay/?catNum=G9681&gclid=CjwKCAjw6raYBhB7EiwABge5KvC1d1YNEzYbQfDa-H3Uh_Jjlc72nBKlq9QbNN4Jd-h3Ap5H079TG9RoCY1EQAvD_BwE

78. Dominijanni A.J., Devarasetty M., Forsythe S.D., et al. Cell viability assays in three-dimensional hydrogels: a comparative study of accuracy // *Tissue Eng Part C Methods*. 2021. Vol. 27, N 7. P. 401–410. doi: 10.1089/ten.tec.2021.0060

79. Spreda M., Hauptmann N., Lehner V., et al. Porous 3D scaffolds enhance msc vitality and reduce osteoclast activity // *Molecules*. 2021. Vol. 26, N 20. P. 6258. doi: 10.3390/molecules26206258

80. Еремеев А.В., Зубкова О.А., Ручко Е.С., и др. Ключевые характеристики аутологичного биомедицинского продукта для коррекции дефекта хрящевой ткани // *Медицина экстремальных ситуаций*. 2020. Т. 22, № 4. С. 59–66. doi: 10.47183/mes.2020.014

REFERENCES

1. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6). doi: 10.1101/pdb.prot095505

2. Castro-concha LA, Escobedo RM, Miranda-Ham Mde L. Measurement of cell viability. *Methods Mol Biol*. 2012;877:49–56. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_5

3. Kabakov AE, Gabai VL. Cell death and survival assays. *Methods Mol Biol*. 2018;1709:107–127. doi: 10.1007/978-1-4939-7477-1_9

4. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 2020;1(3):332–349. doi: 10.1002/fft2.44

5. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001; Suppl. 3:3B. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21

6. Huang CN, Cornejo MJ, Bush DS, Jones RL. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma*. 1986;135:80–87. doi: 10.1007/BF01277001

7. Babakhanova G, Zimmerman SM, Pierce LT, et al. Quantitative, traceable determination of cell viability using absorbance microscopy. *PLoS One*. 2022;17(1):e0262119. doi: 10.1371/journal.pone.0262119

8. Alamoudi WA, Ahmad F, Acharya S, et al. A simplified colorimetric method for rapid detection of cell viability and toxicity in adherent cell culture systems. *J BUON*. 2018;23(5):1505–1513.

9. Boncler M, Rózsalski M, Krajewska U, et al. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2014;69(1):9–16. doi: 10.1016/j.vascn.2013.09.003

10. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol*. 2008;8:8. doi: 10.1186/1471-2210-8-8

11. Cory AH, Owen TC, Bartrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*. 1991;3(7):207–212. doi: 10.3727/095535491820873191

12. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods*. 1995;179(1):95–103. doi: 10.1016/0022-1759(94)00277-4

13. Lutter AH, Scholka J, Richter H, Anderer U. Applying XTT, WST-1, and WST-8 to human chondrocytes: a comparison of membrane-impermeable tetrazolium salts in 2D and 3D cultures. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2017;67(3-4):327–342. doi: 10.3233/CH-179213

14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

15. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and Resazurin: basic color proliferation assays MTT, WST, Resazurin. *Methods Mol Biol.* 2017;1601:1–17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1
16. Hall MD, Martin C, Ferguson DJ, et al. Comparative efficacy of novel platinum (IV) compounds with established chemotherapeutic drugs in solid tumour models. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(1):17–30. doi: 10.1016/j.bcp.2003.07.016
17. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of (MTT) subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993;303(2):474–482. doi: 10.1006/abbi.1993.1311
18. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry.* 2002;47(4):236–242. doi: 10.1002/cyto.10080
19. Chakrabarti R, Kundu S, Kumar S, Chakrabarti R. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *J Cell Biochem.* 2000;80(1):133–138. doi: 10.1002/1097-4644(20010101)80:1<133::AID-JCB120>3.0.CO;2-T
20. Collier AC, Pritsos CA. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(2):281–287. doi: 10.1016/S0006-2952(03)00240-5
21. Ulukaya E, Colakogullari M, Wood EJ. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. *Chemotherapy.* 2004;50(1):43–50. doi: 10.1159/000077285
22. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991;51(10):2515–2520.
23. Promega Corporation. *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Instructions use of products G4000 and G41000. Technical Bulletin.* USA, 2012.
24. Lü L, Zhang L, Sen M, et al. Toxicology in vitro exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol In Vitro.* 2012;26(4):636–644. doi: 10.1016/j.tiv.2012.02.006
25. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell viability assays. *Assay Guid Man.* 2004:1–25.
26. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127–152. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7
27. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1125–1131. doi: 10.1038/nprot.2008.75
28. Gomez-Gutierrez JG, Bhutiani N, McNally MW, et al. During autophagy or in an acidic microenvironment in vitro. *Biotech Histochem.* 2022;96(4):302–310. doi: 10.1080/10520295.2020.1802065
29. Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of Trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog.* 1993;9(6):671–674. doi: 10.1021/bp00024a017
30. Shum D, Radu C, Kim E, et al. A high density assay format for the detection of novel cytotoxic agents in large chemical libraries. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2008;23(6):931–945. doi: 10.1080/14756360701810082
31. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5421–5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
32. Luzak B, Siarkiewicz P, Boncler M. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells. *Toxicol In Vitro.* 2022;83:105407. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105407
33. Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods.* 1994;170(2):211–224. doi: 10.1016/0022-1759(94)90396-4
34. Lavogina D, Lust H, Tahk MJ, et al. Revisiting the Resazurin-based sensing of cellular viability: widening the application horizon. *Biosensors (Basel).* 2022;12(4):196. doi: 10.3390/bios12040196
35. Patent USA N 5501959/26.03.1996. Lancaster MV, Fields RD. *Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents.* Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/e5/b8/74/fadfc8c037ebbc/US5501959.pdf>
36. <https://www.thermofisher.com/> [Internet]. Invitrogen Corporation. *AlamarBlue™ HS cell viability reagent.* Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A50100>
37. Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Waisner B, et al. Application and evaluation of the alamarblue assay for cell growth and survival of fibroblasts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998;34(3):239–246. doi: 10.1007/s11626-998-0130-x
38. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods.* 1997;204(2):205–208. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00043-4
39. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, et al. Comparison of Alamar Blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro.* 2004;18(5):703–710. doi: 10.1016/j.tiv.2004.03.012
40. Shahan TA, Siegel PD, Sorenson WG, et al. A sensitive new bioassay for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods.* 1994;175(2):181–187. doi: 10.1016/0022-1759(94)90361-1
41. Dayeh VR, Bols NC, Schirmer K. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants: an update following OECD's fish toxicity testing framework No. 171. *Curr Protoc Toxicol.* 2013;Chapter 1:Unit1.5. doi: 10.1002/0471140856.tx0105s56
42. White MJ, DiCaprio MJ, Greenberg DA. Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *J Neurosci Methods.* 1996;70(2):195–200. doi: 10.1016/S0165-0270(96)00118-5
43. Yu SY, Sales KM, Fuller BJ, et al. Inducing apoptosis of human colon cancer cells by an IGF-1 D domain analogue peptide. *Mol Cancer.* 2008;7:17. doi: 10.1186/1476-4598-7-17
44. Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2324–2327. doi: 10.1128/jcm.33.9.2324-2327.1995
45. Xu M, Mccanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2015;71:1–7. doi: 10.1016/j.vascn.2014.11.003
46. Yu HG, Chung H, Yu YS, et al. A new rapid and non-radioactive assay for monitoring and determining the proliferation of retinal pigment epithelial cells. *Korean J Ophthalmol.* 2003;17(1):29–34. doi: 10.3341/kjo.2003.17.1.29

47. Niles AL, Moravec RA, Hesselberth P, et al. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem.* 2007;366:197–206. doi: 10.1016/j.ab.2007.04.007
48. <https://assets.thermofisher.com/> [Internet]. Invitrogen. *Presto-Blue® cell viability reagent*. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018370-PrestoBlue-CellViabilityReagent-Pl.pdf>
49. Richards R, Honeywell ME, Lee MJ. FLICK: an optimized plate reader-based assay to infer cell death kinetics. *STAR Protoc.* 2021;2(1):100327. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100327
50. Yang N, Hui W, Dong S, et al. Temperature tolerance electric cell-substrate impedance sensing for joint assessment of cell viability and vitality. *ACS Sens.* 2021;6(10):3640–3649. doi: 10.1021/acssensors.1c01211
51. Lundin A. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods Enzymol.* 2000;305(1975):346–370. doi: 10.1016/s0076-6879(00)05499-9
52. Auld DS, Zhang YQ, Southall NT, et al. A basis for reduced chemical library inhibition of firefly luciferase obtained from directed evolution. *J Med Chem.* 2009;52(5):1450–1458. doi: 10.1021/jm8014525
53. Promega Corporation. *CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay*. [Internet]. Madison, USA, 2023. Available from: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf?rev=0d95c232094b41daa06d0c110d1d916f&sc_lang=en
54. <https://worldwide.promega.com/> [Internet]. *RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay*. Available from: https://no.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/realtime_glo-mt-cell-viability-assay/?catNum=G9711
55. Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, et al. Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay Drug Dev Technol.* 2015;13(8):456–465. doi: 10.1089/adt.2015.669
56. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;106:19–39. doi: 10.1007/10_2007_073
57. Mckinnon KM. Flow cytometry: an overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.1–5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40
58. Wagner T, Guber SE, Stubenrauch ML, et al. Low propidium iodide intensity in flow cytometric white blood cell counting as a marker of cell destruction? *Transfusion.* 2005;45(2):228–233. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.04213.x
59. Moravvej H, Memariani H, Memariani M, et al. Evaluation of fibroblast viability seeded on acellular human amniotic membrane. *Biomed Res Int.* 2021;2021:5597758. doi: 10.1155/2021/5597758
60. <https://www.thermofisher.com/> [Internet]. ThermoFisher Scientific. *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)*. Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>
61. Richards R, Schwartz HR, Honeywell ME. Drug antagonism and single agent dominance result from differences in death kinetics. *Nat Chem Biol.* 2020;16(7):791–800. doi: 10.1038/s41589-020-0510-4
62. Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, et al. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytom Part A.* 2017;91(8):822–829. doi: 10.1002/cyto.a.23169
63. Zhong J, Yang D, Zhou Y, et al. Multi-frequency single cell electrical impedance measurement for label-free cell viability analysis. *Analyst.* 2021;146(6):1848–1858. doi: 10.1039/d0an02476g
64. <https://d1spbj2x7qk4bg.cloudfront.net/> [Internet]. BioLegend Corporation. *Zombie NIR™ Fixable Viability Kit*. Available from: <https://d1spbj2x7qk4bg.cloudfront.net/fr-lu/products/zombie-nir-fixable-viability-kit-8657?pdf=true&displayInline=true&leftRightMargin=15&topBottomMargin=15&filename=Zombie%20NIR%E2%84%A2%20Fixable%20Viability%20Kit.pdf&v=20220831123135>
65. <https://www.thermofisher.com/> [Internet]. ThermoFisher Scientific. *Live/Dead cell viability assays*. Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cell-viability/live-dead-cell-viability-assays.html>
66. <https://www.bdbiosciences.com/> [Internet]. BD Biosciences. *Fixable Viability Stain 780*. Available from: <https://www.bdbiosciences.com/content/bdb/paths/generate-tds-document.au.565388.pdf>
67. Madorran E, Stožer A, Arsov Z, et al. A promising method for the determination of cell viability: the membrane potential cell viability assay. *Cells.* 2022;11(15):2314. doi: 10.3390/cells11152314
68. Zhang R, Wei M, Chen S, et al. A cell viability assessment method based on area-normalized impedance spectrum (ANIS). *Biosens Bioelectron.* 2018;110:193–200. doi: 10.1016/j.bios.2018.03.041
69. Bonnier F, Keating ME, Wróbel TP, et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(1):124–131. doi: 10.1016/j.tiv.2014.09.014
70. Walz A, Unger C, Kramer N, et al. The resazurin reduction assay can distinguish cytotoxic from cytostatic compounds in spheroid screening assays. *J Biomol Screen.* 2014;19(7):1047–1059. doi: 10.1177/1087057114532352
71. Gantenbein-Ritter B, Potier E, Zeiter S, et al. Accuracy of three techniques to determine cell viability in 3D tissues or scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008;14(4):353–358. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0313
72. Sanfilippo S, Canis M, Ouchchane L, et al. Viability assessment of fresh and frozen/thawed isolated human follicles: reliability of two methods (Trypan blue and Calcein AM/ethidium homodimer-1). *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(12):1151–1156. doi: 10.1007/s10815-011-9649-y
73. Dittmar R, Potier E, Van Zandvoort M, Ito K. Assessment of cell viability in three-dimensional scaffolds using cellular autofluorescence. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(3):198–204. doi: 10.1089/ten.tec.2011.0334
74. Kessel S, Cribbes S, Bonasu S, et al. Real-time viability and apoptosis kinetic detection method of 3D multicellular tumor spheroids using the Celigo Image Cytometer. *Cytom Part A.* 2017;91(9):883–892. doi: 10.1002/cyto.a.23143
75. Chabert C, Laporte C, Fertin A, et al. New automatized method of 3D multiculture viability analysis based on confocal imagery: application to islets and mesenchymal stem cells co-encapsulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:272. doi: 10.3389/fendo.2018.00272
76. Forsythe SD, Devarasetty M, Shupe T, Bishop C. Environmental toxin screening using human-derived 3d bioengineered liver and cardiac organoids. *Front Public Heal.* 2018;6:1–10. doi: 10.3389/fpubh.2018.00103
77. <https://worldwide.promega.com/> [Internet]. *3D Cell Viability Assay*. Available from: <https://www.promega.co.uk/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-glo-3d-cell-viability-assay/?catNum=G9681&glcid=CjwKCAjw6raY>

BhB7EiwABge5KvC1d1YNEzYbQfDa-H3Uh_Jjlc72nBKlq9QbNN4Jd-h3Ap5H079TG9RoCY1EQAvD_BwE

78. Dominijanni AJ, Devarasetty M, Forsythe SD, et al. Cell viability assays in three-dimensional hydrogels: a comparative study of accuracy. *Tissue Eng Part C Methods*. 2021;27(7):401–410. doi: 10.1089/ten.tec.2021.0060

79. Spreda M, Hauptmann N, Lehner V, et al. Porous 3D scaffolds enhance msc vitality and reduce osteoclast activity. *Molecules*. 2021;26(20):6258. doi: 10.3390/molecules26206258

80. Ereemeev AV, Zubkova OA, Ruchko ES, et al. Key parameters of autologous biomedical product for cartilage tissue repair. *Medicine of Extreme Situations*. 2020;22(4):59–66. doi: 10.47183/mes.2020.014

ОБ АВТОРАХ

* **Еремеев Артём Валерьевич**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 119435, Москва, Малая Пироговская ул., д. 1а;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3428-7586>;
eLibrary SPIN: 4825-5440;
e-mail: art-eremeev@yandex.ru

Пикина Арина Сергеевна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8967-2318>;
e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Владимирова Татьяна Викторовна;
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-9266-2065>;
e-mail: tat.vlad24@gmail.com

Богомазова Александра Никитична, канд. биол. наук;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1549-1984>;
eLibrary SPIN: 8093-8009;
e-mail: abogomazova@rcpcm.org

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* **Artem V. Ereemeev**, Cand. Sci. (Biol.);
address: 1a Malaya Pirogovskaya street, 119435 Moscow, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3428-7586>;
eLibrary SPIN: 4825-5440;
e-mail: art-eremeev@yandex.ru

Arina S. Pikina;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8967-2318>;
e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Tatyana V. Vladimirova;
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-9266-2065>;
e-mail: tat.vlad24@gmail.com

Alexandra N. Bogomazova, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1549-1984>;
eLibrary SPIN: 8093-8009;
e-mail: abogomazova@rcpcm.org