

# Tetrasoolium- (MTT) metoodika võimaldab uurida potentsiaalselt aktiivsete ühendite kemosensitiivsust ja -resistentsust

Katrin Sak<sup>1</sup>, Helen Lust<sup>1</sup>, Hele Everaus<sup>1</sup>

Eesti Arst 2015;  
94(8):472–477

Saabunud toimetusse:  
09.02.2015  
Avaldamiseks vastu võetud:  
06.03.2015  
Avaldatud internetis:  
30.09.2015

<sup>1</sup> TÜ hematoloogia-  
onkoloogia kliinik

Kirjavahetajaautor:  
Katrin Sak  
katrin.sak.001@mail.ee

Võtmesõnad:  
MTT-metoodika,  
kemosensitiivsus,  
vähiravimite arendus

3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiidi (MTT) kolorimeetriline analüüs on viimase paari aastakümne jooksul leidnud laialdast rakendust nii sünteetiliste kui ka looduslike ainete ja ekstraktide vähivastaste omaduste skriinimisel, et hinnata uuritavate ühendite võimalikku antiproliferatiivset ja tsütotoksilist toimet. Lühülevaates on välja toodud metoodika põhiprintsiibid, analüüsitud selle eeliseid ja piiranguid ning kirjeldatud ka potentsiaalseid rakendusvõimalusi.

Kemoterapiat on vähiravis kasutatud juba ligikaudu 70 aastat, mõjutades kasvaja-rakkude proliferatsiooni ja metastaatilist levikut. Nii on tänapäevases praktikas olevate vähivastaste ravimite spekter pärast 1940. aastatel sinepigaasist eraldatud toksiliste alküleerivate ainete (sh meklore-tamiini) ja veidi hiljem tuvastatud anti-folaatide (aminopteriini ja ametopteriini, praegu tuntud metotreksaadina) avastamist ja katsetamist oluliselt laienu-d (1, 2). Vaatamata edusammudele uute ravimite arengus on praegused kemoterapiilised võimalused siiski vaid piiratud tõhususega ning toksiline toime normaalsele kude-dele ja resistentsus toimeaine suhtes on peamiseks takistusteks edukas kliinilises rakenduses (1, 3). Seega on uute senistest tõhusamate ja vähem toksiliste ühendite leidmine ning nende toime uurimine kasvaja märklaudmolekulide suhtes kriitilise täht-susega.

Uute potentsiaalselt aktiivsete loodus-like või sünteetiliste vähivastaste ühendite farmakoloogilise aktiivsuse hindamine, et määrata nende tsütotoksilist või tsütostaatilist või apoptoosi indutseerivat toimet, ehk teisisõnu kemosensitiivsuse testimine algab tavaliselt *in vitro* uuringutest raku-kultuuris (3, 4). Arvestades käsitletavate ühendite mahtu (ainuüksi Ameerika riik-likus vähiinstituudis viiakse igal aastal läbi miljoneid rakuteste), on ilmne, et vastavad meetodid peavad olema kiired, tundlikud

ja ökonoomsed (3). Väikestel kontsentrat-sioonidel avalduva aktiivsuse korral järgneb vastavate ainete uurimine *in vivo* süsteemis loomudelites, millele on siiratud kasvaja, ning edasi juba kliinilistes katsetustes. Seejuures on seos *in vitro* kemosensitiiv-suse ja *in vivo* ravimi vastuse vahel leidnud veenvat tõendust (4).

Kemosensitiivsuse hindamiseks on välja arendatud mitmeid metoodikaid, mis põhinevad klonogeensetel testidel, rakkude loendamisel, radioaktiivsete nukleotiidide kasutamisel või kolorimeetrilistel analüü-sidel (3, 4). Kuigi üldjoontes peetakse kolooniate moodustamise efektiivsust elujõuliste rakkude arvu hindamisel kõige usaldusväärsemaks meetodiks, on tegemist aeganõudva ja seetõttu ka ebapraktilise analüüsiga; tekkinud kolooniaid loenda-takse tavaliselt 2–3 nädala möödudes. Nii-samuti on teada, et paljude vähi rakuliinide efektiivsus on kolooniate moodustamisel väga vähene, olles oluliseks piiranguks selle meetodi rakendamisel (3, 4). Üheks esimeseks meetodiks rakkude elujõulisuse testimisel oli nende loendamine, mis tugines elusrakkude võimel ära hoida trüpaansinise tungimist läbi rakumembraani, samal ajal kui surnud rakud muutuvad värvi sisene-mise järel siniseks (5). Vastav tehnoloogia on laialt levinud veel ka tänapäeval, sõltudes siiski olulisel määral analüüsi läbiviija koge-mustest mikroskoopilise rakuloenduse alal. Mõistetavatel põhjustel (eelkõige ohutus,

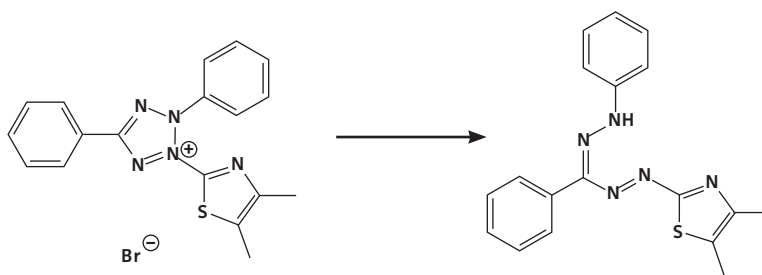
aga ka keskkonnaküsimused) eelistatakse radioaktiivsete materjalidega töötamisele kolorimeetrilisi teste ehk värvuse muutuse hindamist lahuses rakkude elujõulisuse ja proliferatsiooni määramiseks uuritavate ühendite juuresolekul (3). Sellised meetodid põhinevad rakkude metaboolsel võimel muundada biokeemiliselt eri värvusega kemikaale ning nende muutuste kvantifitseerimisel kindlatel lainepikkustel. Tuntumad sellised testid hõlmavad näiteks resasuriini, kristallvioleti, 5-bromo-2'-deoksüuridiini (BrdU), sulforodamiin B (SRB) ja 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasoolium-bromiidi (MTT) lülitumist rakuainevahetusse (3, 6).

Aja jooksul on rakkude elujõulisust määravaid meetodikaid järjest täiendatud. Samas on selge, et mitte ükski rakukultuuri kemosensitiivsuse analüüs ei võimalda üksühest usaldusväärset hinnangut testitavate ainete toime kohta *in vivo* süsteemis, kuna *in vitro* tingimustes ei arvestata kehvast vaskularisatsioonist tingitud probleeme ravimi imendumises ja jaotuses, farmakoloogilisi barjääre, detoksifikatsiooni ega kasvaja heterogeensust. Nii on onkoloogiliste ravimikandidaatide ebaõnnestumise määr kliinilistes katsetes olnud suhteliselt suur (4, 6). Sellest hoolimata annavad *in vitro* tsütotoksilised meetodid olulist infot lähteainete toime võrdlemiseks ja järjestamiseks ning selektsiooniks edasiste uuringute tarvis.

### MTT-MEETOD RAKU PROLIFERATSIOONI JA TSÜTOTOKSILISUSE HINDAMISEKS

MTT-analüüs on praegu kogu maailmas üks kõige sagedamini kasutatavaid meetodeid, millega hinnata uuritavate ainete põhjustatud muutusi rakkude elujõulisuspotsiaalis (7, 8). Kolorimeetrilist MTT-analüüsi kirjeldati esimest korda 1983. aastal ja hiljem on seda pidevalt täiendatud (3, 6, 9).

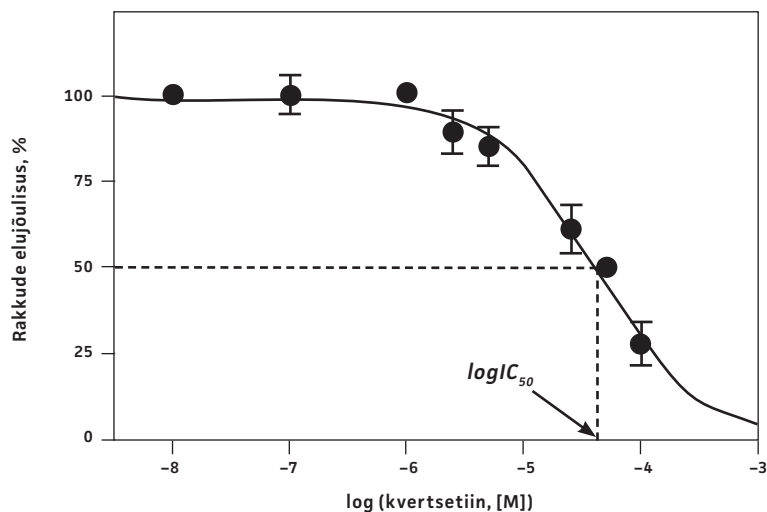
Meetod põhineb kahvatukollase tetrasooliumsoola redutseerimisel tumesinisteks vees lahustumatuteks formasaanikristallideks, lõhkudes nelja lämmastikuaatomi sisaldavat positiivselt laetud tetrasooliringi (vt joonis 1) (3, 4, 8–14). Vastav reaktsioon toimub rakusiseselt, ja kuigi aastaid oldi arvamisel, et seda protsessi reguleerivad aktiivsed mitokondrid, on nüüdseks näidatud, et märksa olulisemat rolli mängivad siin siiski raku tsütoplasma



Joonis 1. Värvusetu (kahvatukollase) MTT rakusisene muundamine tumesiniseks formasaaniks.

ensüümid (5, 8, 10, 11, 13). Nii osalevad MTT reduktsioonis peamiselt endoplasmaatilise retiikulumi oksüreduktaasid ja dehüdrogenaasid, mille aktiivsus sõltub glükoosi ja püridiinnukleotiidide NAD(P)H kontsentratsioonist rakukeskkonnas; vähemal määral (alla 10%) mõjutab reaktsiooni kulgu ka mitokondriaalne suksinaadi dehüdrogenaas (8, 10, 11, 13). Seega peegeldab tetrasooliumsoola muundamine formasaaniks elusrakkude metaboolset aktiivsust ja tekkinud formasaanühik on võrdeline elujõuliste rakkude arvuga (4, 9). Tumesiniste formasaanikristallide lahustamiseks kasutatakse erinevaid orgaanilisi solvente ning lahuse optilist tihedust määratakse spektrofotomeetriliselt (12–14). Siinkohal on siiski oluline rõhutada, et selle meetodika abil ei mõõdetata elujõuliste rakkude arvu otseselt, vaid määratakse raku metabolismiga seonduvat ensümaatiliste aktiivsuste kompleksset signaali, mis võimaldab hinnata rakkude elujõulisust (11).

Uuritavate ainetega töödeldud rakkude optilise tiheduse väärtuste võrdlemisel kontrollrakkude vastavate näitajatega on võimalik konstrueerida kõveraid, mis seostavad ühendi kontsentratsiooni rakkude elujõulisust inhibeeriva toimega ehk nn doosivastuse kõveraid. Erinevate ainete tõhususe võrdlemiseks ühes kasvaja rakuliinis või ka sama ühendi toime analüüsimiseks erinevates rakusüsteemides kasutatakse molaarset doosi, mis vastab 50%-le vähenemisele rakkude elujõulisuspotsiaalis ( $IC_{50}$ ) (4, 12). Näide vastavast andmetöötlusest on autorite mõõdetud lähtematerjalide põhjal esitatud joonisel 2, mille kujutatakse flavonoid kvartsetiini doosi-vastuse kõverat inimese ägeda lümfoidse leukeemia rakuliinis Jurkat. Vastav keskmine pärssiv kontsentratsioon  $IC_{50}$  41,9  $\mu$ M on heas kooskõlas kirjanduses varem avaldatud aktiivsuse näitajatega (15–18).



Joonis 2. Flavonoid kvartsetiini doosi-vastuse kõver ägeda lümfoitse leukeemia rakuliinis Jurkat (inkubatsiooniaeg 48 tundi, autorite andmed).

## MTT-MEETODI PLUSSID JA MIINUSED

MTT-analüüsil on teiste tsütotoksiliste meetodite ees mitmeid eeliseid ning see seletab ühtlasi ka vastava meetodika väga laialdast kasutust. See test on tehniliselt lihtne, kvantitatiivne ja täpne ning tema peamised tugevad küljed teiste kemosen-sitiivsusmeetodite ees on järgmised:

- teostamislihtsus, s.o meetodi kasutajal ei pea olema erioskusi, selle rakendamiseks ei ole vaja spetsiifilist aparatuuri ning tulemus ei sõltu analüüsi läbiviija eelnevast mikroskoopilise rakuloenduse kogemusest (3, 7, 11, 14, 19);
- lisaks tavapärasele laboratoorsele varustusele kasutatakse spetsiaalsete lisareaktiividena vaid MTTd, radioisotoope selles meetodis ei rakendata ning tegemist on suhteliselt ökonoomse analüüsiga (3, 7, 9, 14);
- meetod on tundlik, andes tulemuse ka väga väikese rakkude arvu korral (alates 200 rakust) (7, 9, 13);
- analüüs on kiire, sõltuvalt kasvajakarakudest saadakse tulemused 2–4 päeva jooksul (7, 9, 11, 14, 19);
- kuna tegemist on kolorimeetrilise meetodiga, on värvuse muutused nähtavad ka visuaalselt, võimaldades esmast kvalitaatiivset hinnangut (9);
- meetod pakub võimalusi suuremahulisteks uuringuteks, olles läbi viidud 96-augulistest ELISA-plaatides ning saadud tulemused on spektrofotomeetriliselt automaatselt mõne minuti

vältel loetavad. Seega on ühel ajal ja sarnastes eksperimentaalsetes tingimustes võimalik testida kindla aine mitmeid kontsentratsioone või erinevaid ühendeid ja nende kombinatsioone (5, 9, 11, 14);

- analüüsitulemused on usaldusväärsed, kajastades mitte ainult jagunevaid rakke nagu mitmete teiste meetodite korral, vaid kogu metaboolselt aktiivset raku-populatsiooni. Selle meetodikaga on võimalik eristada elusaid rakke surnud rakuosistest ning tulemused on hästi reprodutseeritavad (3, 11, 14, 19);
- lisaks on leukeemiliste patsientide korral näidatud head kliinilist korrelatsiooni ravimite tundlikkuse vahel *in vivo* ja *in vitro* tingimustes. MTT-meetodi peamiseks rakendusvõimaluseks on siiski uute ja potentsiaalselt aktiivsete ainete uurimine erinevates rakuliinides; analüüsi teostamine ravimite kemosen-sitiivsuse hindamiseks kasvaja-koest eraldatud rakkudes on leidnud väga piiratud kasutamist. Võimalik on analüüsida nii suspensioonis kasvavaid kui ka kinnituvaid rakke ning erinevad rakuliinid vajavad eksperimentaalsetes tingimustes vaid minimaalseid kohandusi (5, 9, 11–14).

Siiski peab MTT-metoodika praktilisel rakendamisel arvestama ka mõningate takistuste ja piirangutega. Nii ei suuda see test eristada ühendite tsütotoksilisi ja tsütostaatilisi toimeid (4, 7). Niisamuti võivad analüüsitulemusi mõjutada rakkude kasvukeskkonna happelisus ja glükoosisisaldus ning tegurid, mis sekkuvad MTT metaboolsesse reduktsiooniprotsessi (3, 4, 11, 14). Apoptoetilistes rakkudes võib algselt esineda ka mõningast rakulise kahjustuse alahindamist, kuna MTT-test töötab kõige tõhusamalt programmeeritud rakusurma hilistes staadiumides, mil rakkude ainevahetuse aktiivsus on oluliselt vähenenud (7, 14). Kuna analüüsi käigus rakud hävivad, ei ole rakukultuuri edasist kulgu võimalik hinnata (3).

## TEISED OLULISEMAD RAKKUDE ELUJÕULISUST MÄÄRAVAD KOLORIMEETRIILISED TESTID NING NENDE PLUSSID JA MIINUSED

Kõrvuti MTT-metoodikaga on uuritavate ainete lisamisest tingitud muutuste hindamiseks rakkude elujõulisuses kasutusel ka teised kolorimeetrilised analüüsid, mis kõik

üksteisest mõnevõrra erinevad ning millel on seega ka isesuguseid eeliseid ja puudusi. Nii on resasuriin tuntud kui metaboolset aktiivne värviline ühend, mille rakusisesed redoksprotsessid toovad kaasa nii kolorimeetrilisi kui ka fluorestsentsmuutusi (3, 7). Vastav meetod põhineb elusrakkude võimel taandada resasuriini fluorestseeruvaks resorufiiniks, millega ühtlasi kaasnevad ka värvusmuutused; seeläbi on selle meetodika oluliseks eeliseks võimalus kasutada kas kolorimeetrilisi või fluorimeetrilisi mõõtmisi (3, 5, 7). Lisatud ainete tsütotoksiline aktiivsus mõjutab resasuriini reduktsiooni ja määratavad muutused on otseses võrdlises seoses elujõuliste rakkude arvuga (3). Tulenevalt fluorestsentsomadustest on selle analüüsi korral saavutatud suurem tundlikkus, võimaldades signaale määrata juba vaid 80 raku osalusel (5). Samas kaasneb siin liigse rakutiheduse korral oht taandada resasuriin mittefluorestseeruvaks ja värvituks hüdroresorufiiniks (5). Tänu resasuriini mittetoksilistele omadustele ja stabiilsusele rakkude kasvukeskkonnas, saab seda testi rakendada ka pikemaajaliste mõõtmiste ja kineetiliste analüüside teostamise eesmärgil (3, 7).

Teine oluline kolorimeetriline meetod, mis on kemosenstiivsuse uuringutes leidnud niisamuti suhteliselt laia rakendust, põhineb DNA ühe koostisosa tümidiini sünteetilise analoogi 5-bromo-2'-deoksüüridiini (BrdU) kasutamisel. See ühend seostub rakutsükli sünteesi ehk S-faasis jagunevate rakkude DNAGA ning prolifereruvatesse rakkudesse sisenenud BrdU hulka on võimalik kolorimeetriliselt kvantitatiivselt määrata nii *in vivo* süsteemides kui ka kultuuris kasvatavatavates rakkudes (3).

Rakukeskkonna lahuse värvusmuutuste analüüsimisel põhinevad ka sulforodamiin B (SRB) ning kristallvioleti meetod. Esimene neist ühenditest on aminoksaanteenvärv, mis moodustab elektrostaatilise kompleksi valkude aluseliste aminohappejääkidega, ning vastav meetod iseloomustab testitava ühendi põhjustatud vähenemisi raku koguvalgu sisalduses ehk seeläbi rakkude elujõulisuspotsiaalis (4, 7). Kristallviolett on seevastu trifenüülmetaanvärv, mis seostub DNAGA; siinkohal sõltub tulemus aga olulisel määral keskkonna happelisusest (3).

MTT-metoodika üheks praktilist rakendamist komplitseerivaks teguriks on moodus-

tuvate formasaanikristallide lahustamine enne optiliste neelduvusnäitajate mõõtmist. Sel otstarbel on kasutatud küll erinevaid orgaanilisi solvente (13), püüded vastavat eksperimentaalset lisasammu vältida on aga omakorda viinud nn teise põlvkonna tetrasooliumvärvide arenduseni. Sellistel MTT-sarnaste ühendite fenüülrühmadel on sulfonaatasenduste tõttu negatiivne laeng, nad tekitavad vees lahustuvaid formasaane ning on kogumas üha suuremat populaarsust (5, 11). Kuigi vastavate derivaatide rakendamine suurendab meetodika tundlikkust, lihtsustab eksperimentaalset tegevust ja muudab võimalikuks ka reaalaaja mõõtmised (11), ei pruugi uuemad analoogid kõikidele rakutüüpidele sobida. Seda erinevalt MTTst, mille taandamine formasaaniks töötab rakkude olemusest sõltumata (11, 13). Niisamuti mõjutavad teise põlvkonna tetrasooliumvärvide funktsioneerimist mitmed lisategurid, sh näiteks muutused keskkonna hapnikutasemes, mis MTT töötavust ei määra (13). Neil põhjustel on MTT-metoodika kasutamine jäänud endiselt üheks kõige sagedamini rakendatavaks analüüsiviisiks erinevate ainete põhjustatud muutuste hindamisel rakkude elujõulisuspotsiaalis.

## MTT-METOODIKA RAKENDUSVÕIMALUSED JA EDASISED PERSPEKTIIVID

Tetrasooliumsoolade rakusisest reduktsiooni on laialdaselt kasutatud rakkude proliferatsiooni ja tsütotoksilisuse uurimiseks nii vähi rakuliinides kui ka kasvajakoe eraldatud rakkudes (10–12). Metaboolse signaali muutus uuritavate ühendite juuresolekul annab olulist teavet vastavate ainete või ka ekstraktide toime kohta kasvajakude (aga niisamuti ka tervete rakkude) elujõulisusele, mistõttu on tetrasooliumvärve ulatuslikult kasutatud uute vähivastaste ravimite arendamisel ja katsetamisel.

Ülevaade MTT-metoodika rakendusvõimalustest vähiuuringutes on toodud tabelis 1. Analüüsi peamine ja kõige sagedasem kasutusala hõlmab looduslike ekstraktide ja uute potentsiaalselt mõjusate ravimikandidaatide testimist erinevates kasvaja rakuliinides *in vitro*, võimaldades infot nii uuritavate ainete toime, kontsentratsioonist sõltuvuse kui ka võimaliku kasvajatüübile spetsiifilise aktiivsuse kohta (12, 20, 21). Seejuures näitavad

**Tabel 1.** MTT-metoodika potentsiaalsed rakendused (3, 4, 8, 11–14)

Uute vähivastaste ainete kemosensitiivsuse uurimine <i>in vitro</i> .
Uute vähivastaste ühendite toksilisuse hindamine tervetele rakkudele <i>in vitro</i> .
Ravimi tundlikkuse määramine <i>ex vivo</i> kliiniliste tulemuste prognoosimiseks.
Ravimikombinatsioonide testimine rakuliinides või kasvajakoe eraldatud rakkudes.
Kasvaja arengut pidurdavate ühendite resistentsuse hindamine.

<sup>1</sup> Department of Hematology and Oncology, University of Tartu, Tartu, Estonia

Correspondence to:  
Katrin Sak  
katrin.sak.001@mail.ee

**Keywords:**  
MTT method,  
chemosensitivity,  
development of anticancer  
agents

paralleelselt normaalsetes rakkudes (sh tervetelt doonoritelt eraldatud perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes või naha fibroblastides) läbiviidud tööd ühendite toime selektiivsust kasvajakaraku suhtes ning võimaldavad seeläbi ka esmast toksilisusanalüüsi. Lisaks annab MTT-meetod olulist teavet erinevate ainete kombineeritud mõju kohta, nii üksteise aktiivsust võimendava, sensitiseeriva kui ka mahasuruva toime kohta (12). Selliste eksperimentide tulemusena on näidatud mitmete struktuurselt erinevate ainete, sh näiteks taimse toidu koostises sisalduvate fütokemikaalide koosmõju kliinilises kasutuses olevate keemiaravi ühenditega (22).

MTT-metoodika kasutamine ravimite tundlikkuse määramisel *ex vivo* süsteemides ja seeläbi kliiniliste tulemuste prognoosimine on leidnud küll mõningast rakendust, kuid kindlasti ei ole see selle testi peamisi eesmärke ega rakendusvaldkondi. Siiski näitavad mitmed erinevate leukeemia-rakkudega tehtud uuringud suhteliselt head korrelatsiooni *in vitro* ja *in vivo* ravimitundlikkuse vahel, võimaldades seeläbi optimaalse tsütotoksilise ravi teatavat eelselektiooni (12, 14, 23). Nii näiteks on kroonilise lümfotsütaarse leukeemia patsientide korral kirjeldatud MTT-metoodika kasutusvõimalusi kloorambutsiili ja fludarabiini kliinilise vastuse prognoosimisel; akuutse müeloidse leukeemia patsientidelt eraldatud kasvajakaraku uurimisel on aga näidatud positiivset korrelatsiooni daunorubitsiini *in vitro* aktiivsuse (või resistentsuse) ja vastavat ravi saanud patsientide remissiooniperioodi kestuse vahel (14). Tulenevalt *in vitro* analüüsidele omastest piirangutest (sellised testid ei arvesta farmakoloogilisi barjääre, ravimite organismisest jaotust ja imendumist, detoksifikatsiooni ega kasvajakoe heterogeensust (4, 6)), tuleb ravimitundlikkust *ex vivo* hindavate katsetulemuste tõlgendamisel säilitada siiski ettevaatlikkus.

Lõpetuseks on oluline lisada, et MTT-metoodika on käivitatud ja töös ka Tartu Ülikooli hematoloogia-onkoloogia kliiniku teaduslaboris, kus vastavat analüüsi rakendades tegeletakse looduslike ja semisünteesiliste polüfenoolse struktuuriga ühendite tsütotoksilise ning antiproliferatiivse toime uurimisega erinevat tüüpi leukeemia- ja lümfoomirakkudes.

## HUVIKONFLIKTI DEKLARATSIOON

Artikkel on valminud autorite sõltumatu uurimistöö tulemusel.

## SUMMARY

### Tetrazolium (MTT) method for studying the chemosensitivity and -resistance of potentially active novel anticancer compounds

Katrin Sak<sup>1</sup>, Helen Lust<sup>1</sup>, Hele Everaus<sup>1</sup>

In the past few decades, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay has been widely used to screen the potential anticancer activity of both synthetic as well as natural compounds and extracts, with the aim to study the antiproliferative and cytotoxic properties of these agents. In the current review article, the main principles of the MTT methodology are described by analysing the advantages and limitations of this chemosensitivity assay. The possible applications of this method are also discussed.

## KIRJANDUS/REFERENCES

1. Sak K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemother Res Pract* 2012;2012:282580.
2. DeVita VT JR, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2008;68:8643–53.
3. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc* 2011;54:10–4.
4. Blumenthal RD, Goldenberg DM. Methods and goals for the use of *in vitro* and *in vivo* chemosensitivity testing. *Mol Biotechnol* 2007;35:185–97.
5. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol* 2011;740:1–6.
6. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* 2004;18:703–10.
7. Sumatran VN. Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol Biol* 2011;731:219–36.
8. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 1997;69:581–93.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
10. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996;4:14–9.



11. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:127–52.
12. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 2011;731:237–45.
13. Kupscik L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods Mol Biol* 2011;740:13–9.
14. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1957–62.
15. Kawahara T, Kawaguchi-Ihara N, Okuhashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Cyclopamine and quercetin suppress the growth of leukemia and lymphoma cells. *Anticancer Res* 2009;29:4629–32.
16. Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1421–32.
17. Baran I, Ganea C, Privitera S, et al. Detailed analysis of apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T cells after proton irradiation and treatments with oxidant agents and flavonoids. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:498914.
18. Pilatova M, Stupakova V, Varinska L, et al. Effect of selected flavones on cancer and endothelial cells. *Gen Physiol Biophys* 2010;29:134–43.
19. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol* 2011;716:157–68.
20. Sak K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. *Nutr Cancer* 2014;66:177–93.
21. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev* 2014;8:122–46.
22. Sak K. Characteristic features of cytotoxic activity of flavonoids on human cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:8007–18.
23. Kaspers GJ, Wijnands JJ, Hartmann R, et al. Immunophenotypic cell lineage and in vitro cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2005;41:1300–3.

## Suukaudsed rasestumisvastased vahendid kaitsevad pikaajaliselt endomeetriumi vähi eest

Suukaudseid rasestumisvastaseid vahendeid (pille) tarvitavate naiste hulgas esineb vähem endomeetriumi vähki, kuid seni polnud teada, kui kaua pärast tarvitamise lõpetamist see kaitse kestab.

2015. aasta augustis avaldati juhtkontrolluuring, kus analüüsiti 27 276 patsiendi andmeid, kellel oli diagnoositud endomeetriumi vähk (juhud), ning 115 743 patsiendi andmeid, kellel seda polnud (kontrollid). Suhtelise riski arvutamisel

arvestati ka naiste vanust, sünnituste arvu, kehamassiindeksit, suitsetamisharjumust ja menopausiaegse hormoonasendusravi kasutamist.

Suukaudseid rasestumisvastaseid vahendeid oli tarvitanud 35% naistest endomeetriumi vähki põdenute rühmast ning 39% mitte-põdenute rühmast. Esimeses rühmas oli keskmine tarvitamise pikkus 3 aastat, teises 4,4 aastat. Mida pikemalt oli naine pille kasutanud, seda väiksem oli tema risk saada endomeetriumi vähk (riskide suhe on 0,76 iga 5 aasta kohta; 95% usaldusvahemik 0,73–0,78;  $p < 0,0001$ ). Selline riski vähenemine jäi püsima ka 30 aastat pärast

suukaudsete rasestumisvastaste vahendite tarvitamise lõpetamist (riski vähenemine oli sama nii varem kasutatud suurema östrogeenikontsentratsiooniga pillide kui ka uemate puhul).

Seega on arenenud riikides pillide kasutamisega viimase 50 aasta jooksul (1965–2014) hoitud hinnanguliselt ära umbes 400 000 endomeetriumi vähi juhtu enne 75. eluaastat, seejuures 200 000 juhtu viimase kümne aasta jooksul.

### REFEREERITUD

Collaborative Group on Epidemiological Studies on Endometrial Cancer. Endometrial cancer and oral contraceptives: an individual participant meta-analysis of 27 276 women with endometrial cancer from 36 epidemiological studies. *Lancet Oncol* 2015; pii:S1470-2045(15)00212-0.

## LÜHIDALT