خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۸ شماره ۱ بهار ۱۴۰۰ (۲۶-۱۸)

مقاله پژوهشی

مقایسه دو روش MTT و تریپان بلو در تعیین بقای رده سلولی Vero در آلودگی با HSV-1

مهسا زمانیان[۱]، زهرا نورمحمدی[۲] ، تهمینه اکبرزاده[۳]، فرحناز بینشیان[۴]، زهره شریفی[۵]

چکیده

سابقه و هدف

ارزیابی بقای سلولی در مطالعه‌های سلولی مهم است و نتیجه حاصله برای کاربرد ماده مورد آزمایش تعیین‌کننده است. امروزه از روش‌های مختلفی برای ارزیابی بقای سلولی استفاده می‌گردد و وجود همبستگی بین روش‌ها دارای اهمیت است. در این مطالعه، از سل لاین Vero برای بررسی اثرات ویروس HSV-1 بر بقای سلولی استفاده شد. بقای سلولی پس از آلودگی با HSV-1 با استفاده از روش‌های حساس رنگ‌سنجی MTT و تریپان‌بلو بر روی سل لاین Vero مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه کیفی انجام پذیرفته بر روی رده سلولی Vero آلوده به ویروس HSV-1 با رقت های لگاریتمی طی مدت ۲۴ ساعت در محیط DMEM حاوی ۲٪ سرم جنین گاوی انجام گرفت و سپس زنده‌مانی سلولی توسط روش‌های رنگ سنجی MTT و تریپان بلو در رقت های 10^{-1} تا 10^{-5} و فواصل زمانی ۰و ۴ و۸ و ۱۸ و ۲۴ ساعت بررسی شد و درصد بقا جهت رسم منحنی بقای سنجش استفاده گردید.

یافته‌ها

رقت‌های مختلف ویروسی جهت تعیین دوز ۵۰ درصد آلودگی TCID50 سلول با ویروس HSV-1 با میکروسکوپ اینورت انجام شد. هم چنین داروی آسیکلویر با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل با روش‌های MTT و تریپان‌بلو، مقایسه شد. نتایج تحلیل رگرسیون بقای سلولی، نشان داد؛ همبستگی خطی، مثبت و معنادار بین روش‌ها مشاهده شده است یعنی بین روش‌های MTT و تریپان‌بلو همبستگی وجود داشت ($r= ۰/۹$ ، $p< ۰/۰۰۱$).

نتیجه گیری

نتایج نشان دادند، هر دو روش برای تعیین بقای سلولی قابل استفاده بوده و نتایج روش تریپان‌بلو قابل تایید با روش MTT می‌باشد.

کلمات کلیدی: HSV-1 ، تریپان بلو، بقا

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۲۱
تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۱

۱- دانشجوی PhD ژنتیک مولکولی ـ گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی ـ تهران ـ ایران
۲- PhD ژنتیک مولکولی ـ استاد گروه زیست‌شناسی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی ـ تهران ـ ایران
۳- PhD شیمی دارویی ـ استاد گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۴- PhD قارچ شناسی ـ استادیار گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سمنان ـ سمنان ـ ایران
۵- مؤلف مسئول: PhD ویروس‌شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

مقدمه

امروزه دانشمندان در تلاش هستند تا با استفاده از روش‌های متفاوت درمانی، عوارض شدید را با راه‌کارهای درمانی بهبود و با عوارض کمتر جایگزین کنند. برای ارزیابی زنده‌ماندن و میزان تکثیر سلول، آزمایش‌های مختلف از جمله تریپان‌بلو و MTT علاوه بر ارزیابی منحنی رشد و زمان دو برابر شدن در کشت سلول‌ها استفاده می‌شود(۱).

هم‌چنین برای بررسی اثر سمیت پپتیدها، مطالعه بر روی سلول، پلاکت و گلبول‌های قرمز انسانی و غیره آزمایش MTT پیشنهاد می‌شود چرا که بسیاری از ترکیبات به دلیل اثرات سمی بر روی سلول‌ها نمی‌توانند به عنوان دارو استفاده شوند. برای هر دارو یا ماده جایگزین (گیاهان دارویی) نیز نیاز به سنجش عدم سیتوتوکسیسیتی می‌باشد، به عنوان مثال برای بررسی سمیت دارویی (آسیکلوویر) برای بیماران هرپس و مبتلا به نقص ایمنی به خصوص دارای HIV ، که در مواجهه با این ویروس هستند و نیازمند درمان جایگزین می‌باشند، نیاز به سنجش با روش MTT می‌باشد(۳، ۲). مطالعه بر روی ویروس تب خال در رابطه با کشف داروی سنتتیک یا گیاهی دارای اهمیت می‌باشد و در قدم اول لزوم بررسی آزمایش‌های اولیه و پایه‌ای جهت بررسی اثر ویروس بر روی سلول ضروری به نظر می‌رسد.

تعیین بقا یا تکثیر مبتنی بر کشت سلول و آزمایش‌های پیش بالینی در شرایط آزمایشگاهی، برای تعیین سمیّت مواد شیمیایی دارای اهمیت بوده و اساس این آزمایش‌ها بر پایه فعالیت های مختلف سلولی، نفوذپذیری غشای سلولی و کنش‌های آنزیمی می‌باشد(۴). دو روش سریع و ساده ارزیابی وجود دارد: ۱- رنگ‌سنجی که کاهش سلول‌های زنده به نمک تترازولیوم MTT برای تشکیل کریستال‌های بنفش- آبی رنگ فورمازان بستگی دارد(۵). ۲- روش دیگر به اتصال سریع رنگ کوماسی‌بلو درخشان رنگ به پروتئین در pH اسیدی متکی است. درمطالعه ها، اعتبار هر دو روش در تعیین میزان واکنش تکثیر سلول‌های انسانی نشان داده شده است(۶).

در رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو که بر پایه عدم قابلیت نفوذ رنگ به غشای سلول زنده می‌باشد(تریپان‌بلو جهت رنگ‌آمیزی سلول‌های مرده به کار برده می‌شود) و بقای سلولی با شمارش سلول‌های رنگ نگرفته توسط میکروسکوپ مشخص می‌گردد(۴). در روش آنزیمی رنگ‌سنجی، ۳- (۴ و ۵- دی متیل تیازول ـ ۲ ـ ایل) ـ ۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم برماید(MTT) ، که بر پایه تولید ماده رنگی توسط سلول‌های زنده می‌باشد، استفاده از نمک‌های تترازولیوم مانند ۳-(۴و۵ دی متیل- ۲ - تیازول)- ۲ و ۵ - دی فنیل۲- هیدروژن - تترازولیوم بروماید، جهت ارزیابی بقا و تکثیر سلولی استفاده می‌شود. آزمایش MTT ، قادر به ارزیابی کمی سلول‌های زنده با تبدیل نمک تترازولیوم به بلورهای بنفش رنگ نامحلول فرومازان، به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد، که این واکنش تنها در سلول‌های زنده می‌باشد. میزان فرومازان تولید شده توسط اسپکتروفتومتر جهت تعیین میزان بقای سلولی اندازه‌گیری می‌شود(۷).

آسیکلوویر از داروهای شیمیایی مورد تایید برای درمان HSV-1 محسوب می‌شود که در مطالعه بر روی رده سلولی Vero در دوزهای اثر بخش جزئی و اثر بخش و توکسیک به ترتیب ۲۴ و ۳۹ و۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شده است(۸). جهت تعیین تیتر ویروسی، بروز اثر سیتوپاتیک(CPE ؛ Cytopathic effect) روزانه مشاهده و با استفاده از روش Reed & Muench تیتر ویروس محاسبه می‌گردد(۹).

هدف از این مطالعه کیفی(پژوهشی)، مقایسه حساسیت و همبستگی روش‌های MTT و تریپان بلو در تعیین بقای رده سلولی Vero آلوده به HSV-1 بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه کیفی حاضر، مهر ۱۳۹۹ در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران آزمایشگاه ویروس‌شناسی انجام پذیرفت.

۱- رده سلولی:

رده سلولی Vero که سلول‌های کلیوی میمون آفریقای جنوبی(Vero) است، از مرکز منابع ژنتیکی جهاد دانشگاهی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

خریداری شده بود، برای تکثیر ویروس تبخال نوع ۱ استفاده شد. (Accession Cell No: IBRC C10001) و برای کشت سلول از محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)، سرم جنین گاوی ۱۰٪ (FBS)(جیبکو، آلمان) و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین، ۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین و شرکت ترمو فیشر ساینتیفیک استفاده شد.

۲- انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ویروسی:

سلول Vero به صورت تک لایه رشد داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 و رطوبت نگهداری شدند. جهت جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک و پاساژ سلولی، از محلول ۰/۲۵٪ تریپسین EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) استفاده گردید. ویروس تبخال نوع ۱ انسانی از آزمایشگاه ویروس شناسی مؤسسه عالی طب انتقال خون تهیه و با MOI= ۰/۱ (سلول Vero ۱۰ :۱ ویروس) در یک فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مکعب با تراکم سلول بالای ۹۰٪ آلوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 نگهداری شد. پس از بروز اثر سیتوپاتیک CPE (Cytopathic effect or cytopathogenic effect) در فریزر ۸۰- فریز شد. برای تعیین تیتر ویروس، در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای، کشت سلول انجام شد و سپس۱۰ رقت لگاریتمی از استوک ویروسی تهیه شد. از داروی سنتتیک آسیکلووایر به عنوان کنترل دارویی مثبت با توجه به غلظت مؤثر۵۰ µg/mL ، استفاده شد. هشت چاهک برای سلول Vero تنها به عنوان شاهد و هشت چاهک برای کنترل ویروس و هم‌چنین برای هر رقت سلولی هم هشت چاهک مورد آزمایش قرار گرفت و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ویروسی مورد نظر اضافه شد. پس از یک ساعت جذب ویروس به سلول‌های Vero ، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی ۵٪ سرم اضافه شد و بروز CPE روزانه بررسی شد و در نهایت طبق Reed Muench method ، تیتر ویروس محاسبه شد.

۳- رنگ‌آمیزی تریپان بلو:

سلول‌ها در محیط کشت کامل تهیه شد و تعداد $۳/۴\times۱۰^{۴}$ سلول در هر چاهک ۹۶ خانه‌ای کشت شدند و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰٪ و ۵٪ CO_2 ، برای چسبندگی به کف پلیت با میکروسکوپ اینورت Leica DM (آلمان ، Wetzlar) بررسی شدند. سپس مایع رویی خارج شده و با رقت‌های مختلف ($۱۰^{-۸}$– $۱۰^{-۱}$) ویروس HSV-1 آلوده شد. عفونت ویروسی پس از مدت ۲۴ ساعت با میکروسکوپ اینورت برای CPE بررسی شد و نتایج هر چاهک ثبت شد. برای انجام روش تریپان‌بلو، سلول‌ها با تریپسین/EDTA (Trypsin EDTA 0.20 % 1X BioIdea) برداشته شده و با لام نئوبار شمارش شدند. سپس ۲۰ µL از سوسپانسیون سلولی باµL ۲۰ رنگ آبی تریپان بلو ۰/۱٪ مخلوط و µL ۱۰ از مخلوط حاصل بر روی لام نئوبار قرار گرفت و سلول‌ها با غشای آسیب دیده به رنگ آبی و سلول‌های زنده بی‌رنگ و کاملاً شفاف شمارش شده و درصد سلولی به صورت [(تعداد کل سلول‌ها – سلول های رنگ گرفته)/ تعداد کل سلول‌ها)× ۱۰۰] محاسبه گردید و برای ترسیم منحنی بقای سلول محاسبه شد. در صد سلول‌های زنده با این فرمول(درصد زنده‌مانی = / تعداد سلول‌های زنده) ۱۰۰× (مجموع سلول‌های زنده و مرده) محاسبه شد.

۴- رنگ‌آمیزی MTT:

در روش MTT ، پس از تیمار سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت جهت انجام آزمایش MTT ، محیط رویی خارج گردید و سلول‌ها توسط محلول نمکی بافر فسفات (PBS شستشو شده و مقدار µL ۱۰۰ محلول(۵ mg/mL) MTT رقیق شده درPBS ، به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه گردید. پس از آن محلول رویی هر چاهک خارج شده و مقدار µL ۱۰۰ DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و روتاتور گردید. پس از آن جذب نوری آن در nm ۵۷۰ خوانده شد و جهت رسم منحنی بقای سلولی، محاسبه گردید. درصد بقای سلولی به صورت(مقدار جذب نوری گروه تیمار شده / مقدار جذب نوری گروه کنترل) × ۱۰۰ محاسبه شد. تمامی آزمایش‌ها

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

به صورت مستقل سه بار تکرار شد.

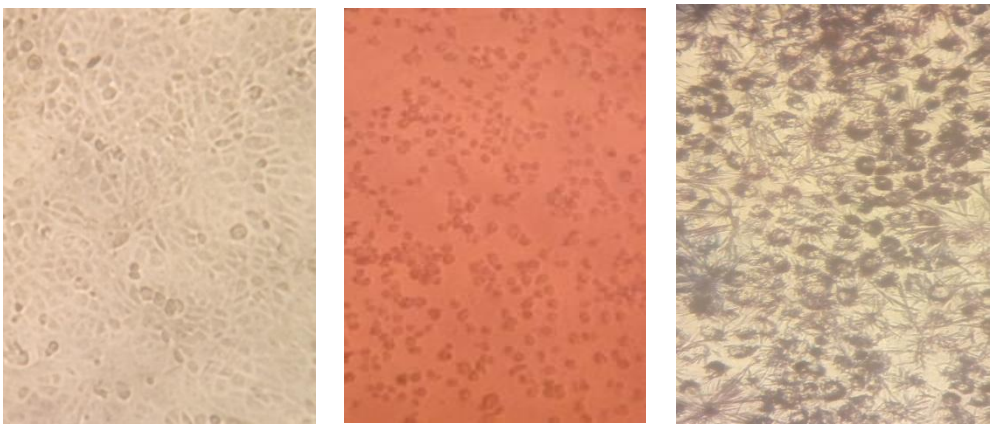
۵- آنالیز آماری:

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. در مقایسه آزمایش‌ها از t-student با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics ۲۵ و برای مقایسه در یک گروه، از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. هم‌چنین برای ترسیم نمودارها در Excel ، داده‌ها آنالیز و همبستگی محاسبه گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معناداری آزمون‌ها، $p< ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر فعالیت‌های HSV-1 بر روی سلول‌های Vero با میکروسکوب اینورت ارزیابی و ثبت شد(شکل ۱، الف و ب). میزان زنده ماندن سلول و تکثیر ویروس HSV-1 با رقت‌های لگاریتمی مختلف($۱۰^{-۱}$-$۱۰^{-۵}$) در سلول‌های Vero تعیین تیتر شد($۳/۴\times۱۰^{۴}$ TCID50/mL). این عمل ۳ مرتبه برای آلودگی به ویروس HSV-1 در سه سری جداگانه با روش‌های تریپان‌بلو و MTT انجام شد و اثر سیتوپاتیک بعد از ۲۴ساعت، پایین‌ترین میزان زنده‌مانی سلول با ویروس HSV-1 را نشان داد(شکل ۱ و نمودار۱).

در روش MTT میزان بقای سلولی نسبت به گروه کنترل سلول و داروی آسیکلوویر در رقت $۱۰^{-۵}$ تفاوت معناداری نداشت و بقای سلولی در کنترل ویروس به پایین‌ترین مقدار خود با میانگین ۱۴/۳۲٪ رسید(جدول ۱).



ج ب الف

شکل ۱: با بزرگ‌نمایی(۱۰X) =۱۰۰ الف) سلول دوکی شکل طبیعی Vero ب) سلول‌های آلوده Vero به ویروس-HSV ج) کریستال‌های فرومازان در آزمایش MTT . (شکل الف، کنترل سلول در برابر شکل ب، سلول‌های آلوده Vero به ویروسHSV).

جدول ۱: میانگین درصدها و انحراف معیار نسبی بقای سلولی Vero آلوده به HSV-1 با رقت‌های مختلف ویروسی در فواصل زمانی مختلف به روش MTT

رقت / ساعت	Vero کنترل	HSV-1 کنترل	آسیکلوویر ۵۰ (µg/mL)	$۱۰^{-۱}$	$۱۰^{-۲}$	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-۴}$	$۱۰^{-۵}$
۰	۹۸/۰ ± ۲/۰	۸۹/۴ ± ۷/۱	۹۷/۶ ± ۰/۱	۹۱/۶ ± ۴/۳	۹۲/۲ ± ۶/۱	۹۳/۶ ± ۵/۴	۹۴/۴ ± ۷/۹	۹۸/۵ ± ۰/۱۳
۴	۹۶/۱ ± ۵/۰	۸۰/۷ ± ۵/۶	۹۷/۱ ± ۰/۴	۸۸/۹ ± ۵/۴	۸۹/۱ ± ۳/۷	۸۹/۹ ± ۴/۴	۹۰/۸ ± ۶/۹	۹۵/۴ ± ۰/۱۳
۸	۹۹/۰ ± ۰/۹	۷۴/۴ ± ۱/۶	۹۱/۲ ± ۱/۹	۷۷/۷ ± ۷/۹	۷۹/۳ ± ۱/۴	۸۲/۶ ± ۱/۱	۸۳/۵ ± ۷/۱	۹۴/۸ ± ۰/۲۳
۱۸	۹۹/۰ ± ۵/۶	۳۴/۸ ± ۴/۳	۸۶/۴ ± ۰/۸	۶۹/۴ ± ۳/۳	۷۳/۹ ± ۶/۴	۸۴/۴ ± ۳/۷	۸۷/۵ ± ۲/۲	۹۴/۷ ± ۰/۲۰
۲۴	۹۷/۸ ± ۱/۸	۱۴/۲ ± ۱/۳	۸۳/۶ ± ۰/۲	۲۹/۲ ± ۵/۶	۳۱/۸ ± ۷/۷	۶۶/۷ ± ۱۰/۵	۶۷/۴ ± ۱/۲	۹۵/۵ ± ۰/۱۳

* **Mean** ± SD

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

جدول ۲: میانگین درصدها و انحراف معیار نسبی بقای سلول Vero آلوده به HSV-1 با رقت‌های مختلف ویروسی در فواصل زمانی مختلف به روش تریپان‌بلو

رقت ساعت	Vero کنترل	HSV-1 کنترل	آسیکلوویر ۵۰(µg/mL)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
۰	۹۹/۶ ± ۰/۹	۹۴/۴ ± ۷/۹	۹۸/۸ ± ۰/۱	۹۶/۱ ± ۵/۰	۹۷/۸ ± ۱/۸	۹۸/۰ ± ۲/۰	۹۹/۰ ± ۵/۶	۹۸/۸ ± ۰/۱۸
۴	۹۸/۲ ± ۳/۵	۸۵/۹ ± ۱/۳	۹۷/۱ ± ۰/۴	۸۸/۰ ± ۲/۳	۸۸/۷ ± ۳/۴	۹۳/۵ ± ۰/۵	۹۵/۰ ± ۳/۵	۹۵/۱ ± ۰/۰۵
۸	۹۳/۲ ± ۴/۴	۷۷/۷ ± ۵/۸	۹۴/۳ ± ۰/۹	۸۶/۴ ± ۶/۱	۸۷/۴ ± ۶/۹	۸۷/۹ ± ۳/۵	۹۰/۴ ± ۳/۱	۹۴/۸ ± ۰/۲۲
۱۸	۹۰/۰ ± ۰/۹	۷۷/۶ ± ۵/۸	۸۶/۹ ± ۰/۷	۸۰/۴ ± ۳/۷	۸۴/۷ ± ۵/۳	۸۵/۹ ± ۵/۳	۸۶/۳ ± ۳/۲	۹۴/۲ ± ۰/۲۹
۲۴	۹۷/۰ ± ۱/۸	۴۵/۰ ± ۳/۸	۸۶/۴ ± ۲/۳	۵۸/۴ ± ۴/۹	۸۰/۱ ± ۶/۸	۸۰/۸ ± ۳/۳	۸۴/۱ ± ۱/۶	۹۴/۸ ± ۰/۱۵

*** Mean ± SD**

* داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از دو آزمون مستقل بیان شده است.

جدول ۳: میزان بقای سلول‌های Vero پس از آلودگی با ویروس HSV-1 به روش تریپان‌بلو و MTT پس از ۲۴ ساعت

رقت ویروسی	درصد سلول‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت (به روش تریپان‌بلو)	درصد سلول‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت (به روش MTT)	p value
کنترل سلولی	۹۷/۱ ± ۱/۸	۹۷/۸ ± ۱/۸	۰/۵۹۵۹
HSV-1	۴۵/۰ ± ۳/۸	۱۴/۲ ± ۱/۳	< ۰/۰۰۰۱
10^{-1}	۵۸/۴ ± ۴/۹	۲۹/۲ ± ۵/۶	< ۰/۰۰۰۱
10^{-2}	۸۰/۱ ± ۶/۸	۳۱/۸ ± ۷/۷	< ۰/۰۰۰۱
10^{-3}	۸۰/۸ ± ۳/۳	۶۶/۷ ± ۱۰/۵	۰/۰۰۰۴
10^{-4}	۸۴/۱ ± ۱/۶	۶۷/۴ ± ۱/۲	۰/۰۰۰۲
10^{-5}	۹۴/۸ ± ۰/۱۵	۹۵/۵ ± ۰/۱۳	۰/۱۷۰۵

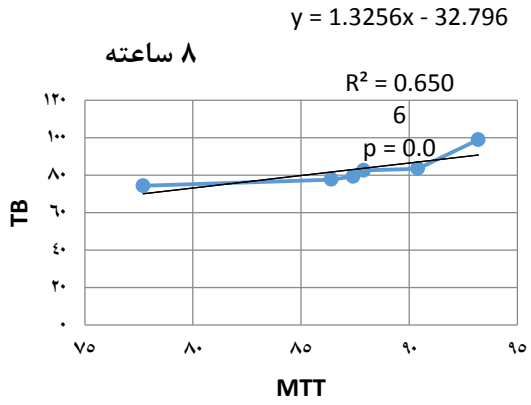
* غلظت‌های مختلف ویروس به سلول **Vero** اضافه شد و درصد سلول‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت به روش تریپان‌بلو و **MTT** بررسی شد. نتایج بر اساس ۳ بار تکرار مستقل برای هر آزمایش و به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

در روش MTT، میانگین بقای سلولی به دست آمده نسبت به گروه کنترل سلول و داروی آسیکلوویر با گروه کنترل ویروس، معادل ۱۴/۲٪ در ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون بود، در صورتی که در رقت 10^{-4} ، بقای سلولی ۱ ± ۶۷/۴ بود و سلول‌های Vero به عنوان معیار کنترل سلولی در نظر گرفته شدند(جدول۱).

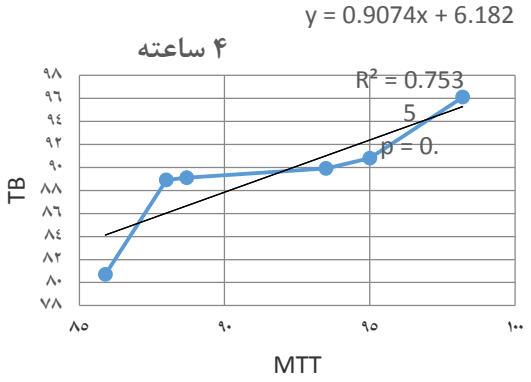
بر اساس نتایج به دست آمده از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، بقای سلولی تفاوت معناداری را در رقت 10^{-5} نسبت به گروه کنترل سلول و داروی آسیکلوویر نشان نداد و بیشترین میزان بقای سلولی نسبت به گروه کنترل مربوط به رقت 10^{-4} با میانگین ۸۴٪ در ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون بود. کمترین میزان بقا مربوط به رقت 10^{-1} با میانگین ۴۵٪ در ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون بوده است(جدول ۲).

نتیجه‌گیری کلی بین دو روش تریپان‌بلو و MTT در جدول نشان داده شده است(جدول ۳).

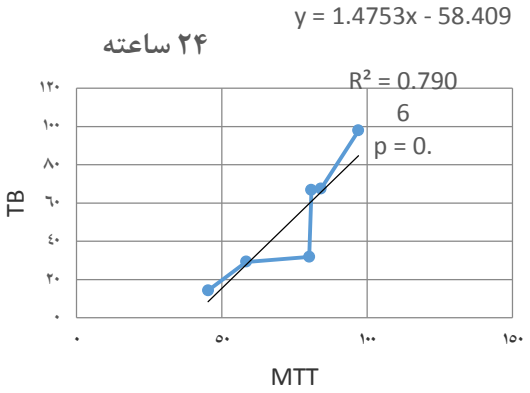
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]



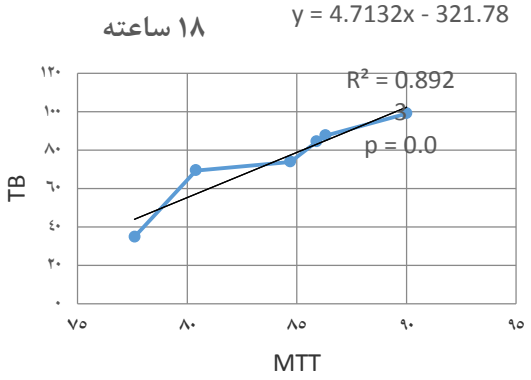
الف



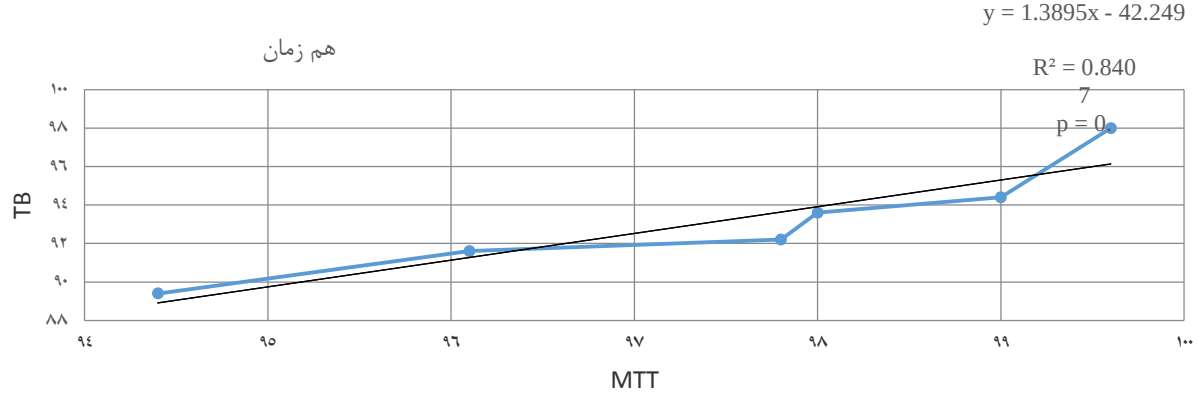
ب



ج



د



هـ

نمودار ۱: رگرسیون بقای سلولی VERO آلوده شده با HSV-1 با دو روش MTT ، رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو طی زمان‌های مختلف. الف) انکوباسیون بعد از ۴ ساعت ب) انکوباسیون بعد از ۸ ساعت ج) انکوباسیون بعد از ۱۸ ساعت د) انکوباسیون بعد از ۲۴ ساعت هـ) در ساعت صفر. داده‌ها به صورت میانگین، انحراف معیار تکرار سه آزمون مستقل می‌باشند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

بر اساس نتایج به دست آمده از نمودار رگرسیون بقای سلولی، میزان همبستگی چشمگیری از نوع خطی، مثبت معنادار بین دو روش موجود می‌باشد و ضریب همبستگی معناداری بین روش‌های MTT و تریپان‌بلو وجود داشت ($p< ۰/۰۰۶$ ، $r = ۰/۹۵$).

بحث

در این مطالعه روش‌های MTT ، و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو جهت تعیین بقای رده سلولی Vero آلوده به HSV-1 تیمار شده با رقت‌های مختلف در زمان‌های متفاوت مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. یافته‌های به دست آمده نشان داد که رقت‌ها به صورت وابسته به غلظت و زمان می‌تواند سبب کاهش بقای سلولی Vero آلوده به HSV-1 گردد و این در حالی بود که نتایج حاصل از مقایسه میکروسکوپ اینورت با دو روش مورد مطالعه یکدیگر را تایید کرده‌اند و میزان همبستگی بین روش‌های MTT و تریپان‌بلو بالا بود. با وجودی که، مشکلات متعددی در رنگ‌آمیزی‌های معمول تریپان‌بلو وجود دارد و ممکن است در شناسایی سلول‌های مرده مشکلاتی ایجاد نماید، زیرا سلول‌ها می‌بایست بین سه تا پنج دقیقه شمارش شوند، در غیر این صورت تعداد سلول‌های رنگ گرفته با افزایش زمان افزایش می‌یابد(۱۰).

برای تجزیه و تحلیل در روش MTT ، از حجم زیادی از نمونه‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه، استفاده می‌شود. با این وجود، این روش می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند مقدار pH و آنالوگ‌های پیرووات و یا سوپراکسیدها قرار گرفته و کاهش یابد. نتایج متناقضی در بقا و تکثیر سلولی با استفاده از تست MTT گزارش شده است که از این جمله می‌توان به قابلیت نانو دی‌اکسید تیتانیوم در افزایش سوپراکسیدها که در معرض تابش UVA سمیت سلولی قوی نشان می‌دهند، اشاره کرد که خود از دیگر محدودیت‌های سلول‌های مختلف مرتبط می‌باشد(۱۱).

مطالعه های دیگر این یافته را تایید می‌کنند که استفاده از رنگ‌سنجیMTT و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، می‌توانند روش‌های مناسبی در ارزیابی بقای سلولی باشد ولی رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو در اولویت نسبت به روش MTT قرار نمی‌گیرد(۱۳، ۱۲). روش MTT نسبت به روش تریپان‌بلو از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد(۱۴).

در مطالعه استوآرت در سال ۱۹۹۲، افزایش تراکم نوری مشاهده شده برای هر روش به طور مستقیم، در طول مدت زمان کشت با افزایش تعداد سلول توسط هموسیتومتری در سلول‌های عضلات صاف راه‌های هوایی ASM (airway smooth muscle) انسان و خرگوش تعیین شد. این رابطه هم‌چنین برای تکثیر سلول‌های ASM نای خرگوش در پاسخ به هترودیمر فاکتور رشد مشتق از پلاکت (۱ تا ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) انجام شد و در پاسخ به سرم گوساله جنین (۱,۲۵ تا ۱۰)، افزایش نشان داد(۶).

در مطالعه سال ۲۰۰۲ روش رنگ سنجی با روش رادیو اکتیو مورد مقایسه قرار گرفته بود که نتایج حاصله دارای همبستگی و حساسیت قابل قبولی بود، ولی روش رنگ‌سنجی به دلیل کم خطر بودن و سهولت پیشنهاد گردید(۱۵). بنا بر گزارش‌های محققین، روش MTT روشی دقیق و سریع در تعیین حساسیت دارویی در طی چرخه درمان می‌باشد و مناسب بودن، هزینه کم و سهولت انجام کار سبب کاربرد فراوان این روش شده است(۱۶).

درصد بقای سلول‌ها در حضور رقت‌های لگاریتمی ویروس HSV-1 به صورت تابعی از زمان انکوباسیون بود که بقا در حضور ویروس نسبت به کنترل کاهش می‌یافت و اختلاف دو روش در استوک ویروسی یعنی ویروس بدون رقت تا رقت $۱۰^{-۳}$ بیشتر آشکار بود(جداول ۱ و ۲).

جهت مقایسه دقیق این دو روش، ارتباط با اثر ویروس HSV-1 بر سلول‌های Vero با دو روش محاسبه شد که با توجه به نتایج به دست آمده، همبستگی و هماهنگی بین نتایج مشاهده می‌شود و نشان از حساسیت بیشتر روش MTT نسبت به تریپان‌بلو دارد. مطالعه درباره تاثیر ویروس HSV نوع ۱ روی سلول‌های Vero نشان داد، میزان زنده ماندن سلول در آزمایش MTT بعد از آلودگی سلول‌های Vero با رقت‌های بالای ویروس HSV-1 از نظر آماری معنادار بود.

نتیجه‌گیری

پژوهش کنونی بیان می‌دارد، نتایج دو نوع روش MTT

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

و تریپان‌بلو تایید می‌کند که تا حد زیادی با یکدیگر همبستگی داشته و نتایج یکدیگر را تایید می‌نمایند و با توجه به حساسیت و دقت بیشتر روش MTT ، نسبت به روش تریپان‌بلو، می‌توان نتیجه گرفت که در بررسی نحوه عملکرد HSV-1 در رده سلولی Vero ، می‌توان با روش تریپان‌بلو زنده بودن سلول را تایید اولیه کرد و با روش MTT که نتایج قابل استنادتر و با دقت بیشتری نسبت به روش تریپان‌بلو دارد، درصد سلول‌های زنده را تعیین نمود.

تشکر و قدردانی

در اجرای این پروژه تحقیقاتی که در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام گردیده است از مؤسسه عالی طب انتقال خون، آزمایشگاه ویروس شناسی و جهاد دانشگاهی برای سلول‌های Vero نهایت قدردانی و سپاس را داریم.

References:

1- Ghasemzadeh M, Hosseini E, Ahmadi M, Kamalizad M, Amirizadeh N. Comparable osteogenic capacity of mesenchymal stem or stromal cells derived from human amnion membrane and bone marrow. Cytotechnology 2018; 70(2): 729-39.
2- Hooshmand K, Asoodeh A. The influence of GL-9 peptide on A549 and human and animal blood cells. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 2017; 29(4): 463-73. [Article in Farsi]
3- Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni A, Kadivar M, Davarpanah MA, Pourabbas B, *et al*. Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex viruses isolated from the general immunocompetent population and patients with acquired immunodeficiency syndrome. Int J Dermatol 2007; 46(12): 1263-6.
4- Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol 2001 May;Appendix 3:Appendix 3B.
5- 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.
6- Hirst SJ, Barnes PJ, Twort CH. Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum and platelet-derived growth factor. Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7(6): 574-81.
7- Ghorbani-Anarkooli M, Dabirian S, Moladoust H, Zendedel A, Bahadori MH. Comparison of MTT, trypan blue, and clonogenic assay, to determine the viability in human anaplastic thyroid cancer cell line. Tehran Univ Med J 2019; 77(1): 26-32. [Article in Farsi]
8- Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. Clin Microbiol Rev 2003; 16(1): 114-28.
9- Haggett P, Gunawardena K. Determination of populationthresholds for settlement functions by the Reed-Muench method. The Professional Geographer 1964; 16(4): 6-9.
10- Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Curr Protoc Immunol. 2015; 111: A3.B.1-A3.B.3.
11- Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. Toxicology 2005; 213(1-2): 66-73.
12- Hosseini F, Sam MR, Jabbari N. Radiosensitivity of radioresistant colorectal cancer cells after treatment with docosahexaenoic acid and irradiation. Tehran University Medical Journal 2014; 72(3): 139-46. [Article in Farsi]
13- Bellamakondi PK, Godavarthi A, Ibrahim M, Kulkarni S, Naik RM, Maradam S. *In vitro* cytotoxicity of caralluma species by mtt and trypan blue dye exclusion. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2014; 7(2): 17-19.
14- Shokrgozar MA, Zali H, Rezaei Tavirani M, Amanzadeh A. Comparison of MTT and Trypan blue colorimetric methods for determining the cytotoxicity of calprotectin on human stomach cancer cells under laboratory conditions. Kowsar Med J 2007; 12(2): 127-37. [Article in Farsi]
15- Heidari M, Ghazi-Khansari M, Khoshnoodi J, Shokri F. Comparative measurement of *in vitro* T-2 toxin cytotoxicity using three different cytotoxicity assays. Toxicology Mechanisms and Methods 2003; 13(2): 153-7.
16- Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett 2006; 160(2): 171-7.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2021;18 (1): 18-26

Original Article

Comparison of MTT and Trypan Blue methods in determining the survival of Vero cell line in HSV-1 infection

Zamanian M.[1], Noormohammadi Z.[1], Akbarzadeh T.[2], Bineshian F.[3], Sharifi Z.[4]

[1]Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
[4]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Evaluation of cell survival is important in cellular studies and the result is decisive for the application of the test substance. Different methods are used to evaluate cell survival and the correlation between methods is important. Here, Vero cell line was used to evaluate the effects of HSV-1 virus on cell survival. Cell survival after HSV-1 infection using sensitive colorimetric methods of 3-, 4-, 5-dimethylthiazole-2-yl, -2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and Trypan Blue on Vero cell line was examined.

Materials and Methods

A qualitative study was performed on Vero cell line infected with HSV-1 virus with logarithmic dilutions10^{-1} to 10^{-5} dilutions and time intervals of 0, 4, 8, 18 and 24 hours and the s in DMEM containing 2% Fetal bovine serum (FBS). Then cell viability by MTT and Trypan tests was examined . The survival percentage was used to plot the survival curve of the assays.

Results

Different viral dilutions were used to determine the infectious dose of 50% (TCID50) of HSV-1virus with invert microscope. Acyclovir at a concentration of 50 mg/mL was compared as drug control for MTT and Trypan Blue. The results of regression analysis showed cell survival. Linear, positive and significant correlation was observed between the methods that showed a correlation between MTT and Trypan Blue methods ($p< 0.001$, $r = 0.9$)

Conclusions

The results showed that both methods can be used to determine cell survival and the results of MTT can be confirmed by Trypan Blue method.

Key words: HSV-1, Trypan Blue, Survival

Received: 11 Nov 2020
Accepted: 30 Jan 2021

Correspondence: Sharifi Z., PhD of Virology. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052152; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *sharifiz@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]