

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук»  
(ИЦиГ СО РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора по науке ИЦиГ СО РАН



д.б.н. В.А. Мордвинов

«29» ноября 2018 г.

**Оценка изменения состояния культуры нейрональных клеток и клеток  
глиобластомы человека в реальном времени в ответ на различные воздействия**

Старший научный сотрудник ЦГР

ИЦиГ СО РАН

Разумов И.А., д.б.н.

Новосибирск, 2018

## Содержание

1 Общие положения	4
2 Общие требования к условиям, обеспечению и проведению испытаний	5
3 Нормативные ссылки	5
4 Требования к погрешности измерений	5
5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы	5
6 Методы измерений	6
7 Требования безопасности, охраны окружающей среды	9
8 Требования к квалификации операторов	9
9 Требования к условиям измерений	9
10 Подготовка к работе и выполнение измерений	10
11. Обработка результатов измерений	11
12 Контроль точности результатов измерений	15
13 Оформление результатов измерений	15
14 Литература:	16

## **ПРЕДИСЛОВИЕ**

1. РАЗАРАБОТАНА Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Руководитель ИЦиГ СО РАН: директор Кочетов Алексей Владимирович

Адрес: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 10, тел. +7(383) 3634980

ИСПОЛНИТЕЛЬ: Центр генетических ресурсов лабораторных животных, сформированный на базе ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН

2. Введена впервые

3. СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

В соответствии с п.2 статьи 5 Закона «Об обеспечении единства измерений» от 26.06.2008 № 102-ФЗ настоящая методика измерений не подлежит аттестации, поскольку основана на прямом измерении оптического сигнала.

Настоящая методика не может быть полностью или частично воспроизведена, тиражирована и распространена без разрешения ИЦиГ СО РАН.

## 1 Общие положения

1.1 Настоящая методика описывает процесс тестирования и анализа изменения состояния культуры нейрональных клеток и клеток глиобластомы человека в реальном времени в ответ на различные воздействия без окрашивания (label free) и за счет окрашивания поверхностных клеточных маркеров антителами, прижизненными красителями или экспрессии клетками флуоресцентных белков.

1.2 Назначение и область применения метода – метод широко используется для научно-исследовательских и медицинских целей при определении как состояния клеток, так и числа жизнеспособных и мертвых клеток, в том числе:

- при оценке состояния культуры нейрональных клеток и клеток глиобластомы;
- в исследованиях токсичности препаратов и наночастиц;
- при совместном культивировании клеток;
- в тестировании нефротоксичности и гепатотоксичности *in vitro*;
- при определении скорости пролиферации клеток.

Для исследования функционального ответа клеток на воздействия:

- определение гипоксии клеток и окислительного стресса, в том числе с использованием индукторов и ингибиторов;
- тестирование трансдукции сигнала и активации транскрипции в системе STAT белков, в том числе с использованием ингибиторов;
- изучение процессов апоптоза, некроза, аутофагии клеток под воздействием различных факторов и соединений;
- анализ миграционной и инвазионной способности клеток;
- трекинг клеток, отслеживание зарастания поверхности (wound healing);
- определение мембранного потенциала митохондрий (анализ функции клеточного дыхания при воздействии препаратов);
- определение накопления липидов в клетках (фосфолипидоз, стеатоз);
- оценка генотоксичности, анализ повреждений ДНК.

1.3 Данная методика включает перечень необходимых операций и служит общим руководством для оценки изменения состояния культур нормальных и опухолевых клеточных линий человека, а также единичных клеток. Настоящая методика может быть

использована для оценки изменения состояния культуры нейрональных клеток и клеток глиобластомы человека в реальном времени в ответ на различные воздействия.

## **2 Общие требования к условиям, обеспечению и проведению испытаний**

Исследования в соответствии с данной методикой проводят в специально оборудованном помещении. Пробоподготовка (культивирование, снятие и, при необходимости, окраска клеток) и непосредственный анализ образцов проводится в лаборатории для работы с клеточными культурами, оборудованной ламинарными шкафами, CO<sub>2</sub> инкубаторами и другими приборами для работы с культурами клеток.

## **3 Нормативные ссылки**

В настоящей методике использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений;

ГОСТ Р 51350-99 Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного оборудования. Общие требования;

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны;

ГОСТ 12.1.045-84 Система стандартов безопасности труда. Электростатические поля.

## **4 Требования к погрешности измерений**

Метод исследования имеет высокую точность (до 97 %). Для разных типов клеток можно подкорректировать параметры анализа изображений, чтобы все клетки учитывались, даже очень распластанные и прозрачные. Коэффициент вариации (CV) для измерений флюоресценции зависит от длины волны испускаемого света: для более коротковолнового (FITC, Alexa 488 и др.) CV составляет около 15 %, для самого длиноволнового (APC, APC-Cy7 и др.) – около 40 %.

## **5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы**

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства и материалы:

5.1 Многорежимный фотометр-имиджер Cytation

- 5.2 Автоматизированный интерактивный микроскоп с функциями светлопольной и флуоресцентной микроскопии (3 канала) с объективами 4×, 10×, 20×.
- 5.3 Система для поддержания углекислого газа (CO<sub>2</sub>), постоянной температуры, влажности и содержания воздуха (кислорода).
- 5.4 ПК – персональный компьютер.
- 5.5 Сменные держатели для флаконов объемом 25 см<sup>2</sup>, 75 см<sup>2</sup> и 96-луночного планшета.
- 5.6 Источник бесперебойного питания.
- 5.7 Программное обеспечение Gen5 для анализа роста и развития клеток.
- 5.8 Конические пробирки объемом 15 и 1.5 мл для окрашивания клеток.
- 5.9. Буфер для окрашивания клеток: фосфатно-солевой буфер (PBS) с добавлением 3 % эмбриональной бычьей сыворотки (FCS).
- 5.10 Антитела с флуоресцентной меткой.
- 5.11 Краситель трипановый синий, гемоцитометр или счётчик клеток типа Counter.
- 5.12 Cell strainer – одноразовые фильтры для получения одноклеточной суспензии клеток.

## **6 Методы измерений**

Метод с использованием системы Cytation основан на автоматизированной фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии и позволяет проводить запись состояния клеток и оценку скорости роста культуры клеток под влиянием различных факторов в реальном времени. Многорежимный имиджер Cytation – это многофункциональная система, которая сочетает автоматическую цифровую широкопольную микроскопию (флуоресцентную и высококонтрастную визуализацию в светлых полях) с традиционным многорежимным считыванием в микропланшетах для получения фенотипической информации о клетках и количественных данных в лунках планшетов.

Метод фазового контраста широко применяется в биологических и медицинских исследованиях, особенно в цитологии и гистологии. Этот метод, по существу, применяется для изучения живых клеток, тканей и микроорганизмов, прозрачных в светлопольном освещении. Фазовый контраст позволяет легко визуализировать внутренние клеточные компоненты, такие как мембраны, ядра, митохондрии, веретёна, митотический аппарат, хромосомы, аппарат Гольджи, а также цитоплазматические гранулы как растительных, так и животных клеток и тканей. К тому же фазово-контрастная микроскопия широко применяется для диагностики опухолевых клеток и изучения роста, динамики и свойств различных живых клеток в культурах. Специальные фазово-контрастные оптические системы с большим рабочим расстоянием были разработаны для инвертированных

микроскопов, применяемых для изучения тканевых культур. Другими областями биологии, где преимущества фазового контраста оказались весьма полезны, являются гематология, вирусология, бактериология, паразитология, палеонтология и морская биология.

Суть метода фазового контраста заключается в применении оптического механизма преобразования незначительных изменений в фазе в соответствующие изменения в амплитуде, которые могут быть визуализированы как изменение контраста изображения. Одним из главных преимуществ фазово-контрастной микроскопии является возможность исследовать живые клетки в их естественном состоянии, не убивая их и не прибегая к связыванию или окрашиванию. В результате динамика происходящих в клетке биологических процессов может наблюдаться и фиксироваться с высоким контрастом и разрешением мельчайших деталей образца.

Флуоресцентная (люминесцентная) микроскопия основана на способности некоторых веществ люминесцировать, т. е. светиться при освещении невидимым ультрафиолетовым или синим светом. Цвет люминесценции смещен в более длинноволновую часть спектра по сравнению с возбуждающим ее светом (правило Стокса). При возбуждении люминесценции синим светом цвет ее может быть от зеленого до красного, если люминесценция возбуждается ультрафиолетовым излучением, то свечение может быть в любой части видимого спектра. Эта особенность люминесценции позволяет, используя специальные светофильтры, поглощающие возбуждающий свет, наблюдать сравнительно слабое люминесцентное свечение.

Флуоресцентная микроскопия по сравнению с обычной позволяет:

- сочетать цветное изображение и контрастность объектов;
- изучать морфологию живых и мертвых клеток микроорганизмов в питательных средах и тканях животных и растений;
- исследовать клеточные микроструктуры, избирательно поглощающие различные флуорохромы, являющиеся при этом специфическими цитохимическими индикаторами;
- определять функционально-морфологические изменения клеток;
- использовать флуорохромы при иммунологических реакциях и подсчете бактерий в образцах с невысоким их содержанием.

Многорежимный фотометр-имиджер Cytation (рисунок 1) состоит из встроенного инкубатора с прецизионным контролем CO<sub>2</sub>, влажности и температуры по всей площади микроскопа, который делает снимки, передает информацию на приемник-контроллер, и контроллера, который обрабатывает информацию, выполняет обсчет и полный анализ

данных. Монитор на контроллере отражает этап работы и состояние микроскопа: покой, съемку, самотестирование или сколько минут осталось до следующего сканирования. Программа для пользователя устанавливается на ноутбук, откуда можно планировать эксперимент и наблюдать за результатами. У прибора большой объем памяти – около 8 терабайт (хватает на год активной работы, рекомендуется самые ценные эксперименты архивировать на внешний источник памяти, несущественные эксперименты удалять), однако при очень интенсивном использовании могут потребоваться дополнительные устройства памяти. Производитель предлагает специальные устройства памяти.



Рисунок 1. Многорежимный фотометр-имиджер CYTATION.

Микроскоп видит неокрашенные нативные клетки методом фазового контраста и позволяет совмещать фазово-контрастное–флуоресцентное изображение. Программное обеспечение, гибкий протокол анализа и обработки данных, настраиваемый под любой тип клеток, позволяет производить подсчёт клеток, оценивать пролиферативную активность и время удвоения в монокультурах, а также учитывать эти показатели для каждой из клеточных линий при культивации в реальном времени. Прибор по контрасту отличает клетки от фона и высчитывает параметр конfluence, т.е. относительной плотности клеток по отношению к занимаемой ими площади. Это ближайшая замена количественному подсчету. Кроме того, прибор позволяет проводить мультиплексный анализ цитотоксичности, используя флуоресцентные маркеры клеток, и в реальном времени



показывает кривые роста и гибели клеток при действии тестируемых веществ в разных концентрациях, полученные при анализе изображений в программном обеспечении прибора. Высокий контраст и качество получаемых снимков обеспечивается специально разработанным оборудованием и режимом фазово-контрастной HD съёмки и компенсирует свойственные при работе с пластиком аберрации, что значительно улучшает качество и контраст получаемых изображений. Несмотря на то, что использование прибора требует специализированного оборудования и обучения оператора, этот метод является предпочтительным для изучения различных воздействий на популяции клеток в реальном времени.

## **7 Требования безопасности, охраны окружающей среды**

7.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ Р 51350.

7.2 Необходимо соблюдать стандарты безопасности труда в соответствии с ГОСТ 12.1.005-8 и ГОСТ 12.1.045-84.

7.3 При выполнении измерений соблюдают требования безопасности в соответствии с документами производителей оборудования.

## **8 Требования к квалификации операторов**

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица:

- не моложе 18 лет;
- не имеющие медицинских противопоказаний;
- имеющие высшее образование;
- изучившие устройство и принцип работы многорежимного фотометр-имиджера СУТАTION;
- прошедшие инструктаж по охране труда на рабочем месте;
- изучившие настоящую методику измерений и эксплуатационную документацию на применяемое оборудование.

## **9 Требования к условиям измерений**

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

температура воздуха, °С – от 18 до 25;

относительная влажность воздуха, не более 60 % при температуре 22-24 °С;

атмосферное давление, кПа – от 84 до 106.7;

напряжение питания в сети, В – 220;

частота электрической сети, Гц –  $50 \pm 5$ .

## **10 Подготовка к работе и выполнение измерений**

### **Клетки.**

Для проведения исследования рекомендуем культуру клеток глиобластомы человека U-87MG (рисунок 2) или другие клетки и клеточные линии, если условия культивирования клеток адаптированы для их специфических потребностей. Клетки регулярно проверяют на отсутствие загрязнения микоплазмой и используют, только если загрязнение не выявлено.

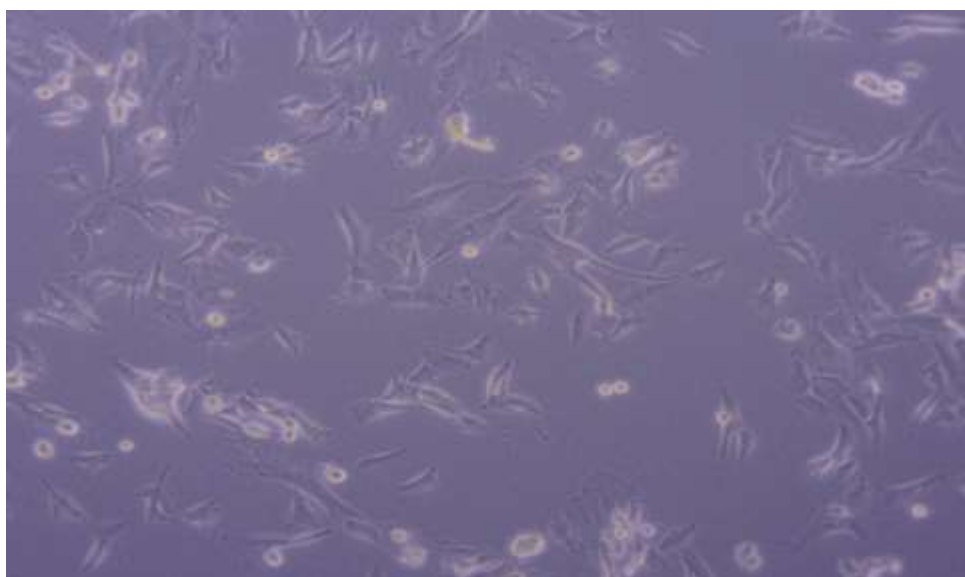


Рисунок 2. Культура клеток U-87MG (глиобластома человека).

### **Питательная среда и условия инкубации.**

При обычном пересеве и во время процедуры эксперимента используют соответствующие условия питательной среды и условия инкубации.

Пример – для U-87MG используют среду DMEM/F12 (1:1) (питательная среда для клеток млекопитающих), с добавлением 10 % сыворотки плода коровы, 4 ммоль глутамина, пенициллин (100 ME), стрептомицин (100 мг/мл), и влажную инкубацию при 37 °С, от 5.0 % до 7.5 % CO<sub>2</sub> в зависимости от буферного раствора. Питательная среда должна обеспечивать нормальную продолжительность клеточного цикла используемой клеточной линии.

### **Восстановление или размораживание культуры из криоконсервации.**

Клетки из замороженных чистых культур высевают на питательную среду с определенной плотностью, указанной в паспорте, и пересевают как минимум один раз перед использованием.

## 11. Обработка результатов измерений

### Тестирование изменения состояния культуры неокрашенных клеток U-87MG глиобластомы человека в ответ на различные воздействия.

Для выполнения измерений клетки помещаются в систему Cytation, в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Система автоматически делает снимки в выбранных позициях и с заданной оператором периодичностью, передает информацию на компьютер, который обрабатывает информацию, выполняет обсчет и полный анализ данных. Полученные данные пролиферации клеток U-87MG в виде графиков представлены на рисунке 3.

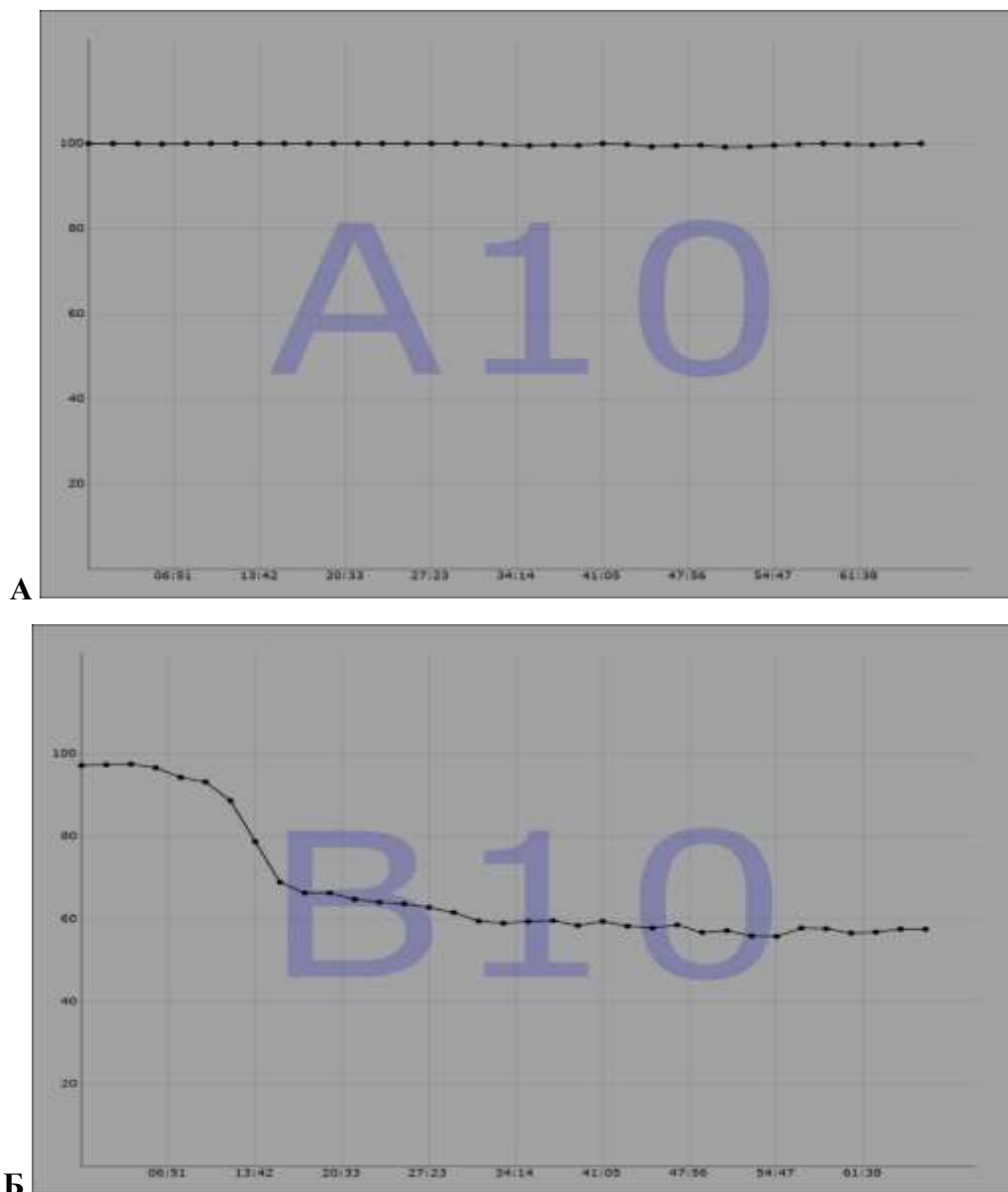


Рисунок 3. Выявление цитопатического эффекта наночастиц оксида марганца на рост опухолевых клеток U-87MG.

А – кривая роста контрольных клеток; Б – кривая роста клеток под воздействием наночастиц (цитопатический эффект). По оси ординат – % процент живых клеток, по оси абсцисс – период перевивания или инкубации клеток в часах.

Получаемые графики роста позволяют выявить общие закономерности в динамике роста исследуемых клеточных культур, а также влияние изначальной плотности на рост и функционирование культуральной модели.

### **Определение изменения состояния культуры меченых флуорохромами нейрональных клеток и клеток опухолей в реальном времени в ответ на различные воздействия.**

Перед началом измерений клетки на поверхности культурального пластика проходят процедуру окрашивания флуорохромами. Часть клеток применяют для использования их в последующем в качестве контроля как неокрашенные клетки.

Для окрашивания клеток к клеточной суспензии добавляют меченые флуорохромами первичные антитела против маркера, характерного для целевой популяции клеток. Использование концентрации антител и проведение процедуры окрашивания согласно рекомендациям производителя. Если первичные антитела не конъюгированы с флуорохромом, используют соответствующие вторичные антитела. Процедуру окрашивания проводят аналогично окраске с использованием первичных антител, концентрацию антител используют согласно рекомендациям производителя. Клетки промывают два раза буфером для суспендирования и ресуспендируют в среде для культивирования. В аликвоте клеток при помощи окраски трипановым синим и гемоцитометра определяют концентрацию и жизнеспособность клеток.

В ходе исследований с живыми или фиксированными клетками система Cytation обеспечивает имиджинг и считывание широкого спектра флуорохромов и получение фенотипических количественных данных. В качестве примеров на рисунках 4 и 5 представлены препараты различных клеток, меченых антителами с различными флуорохромами.

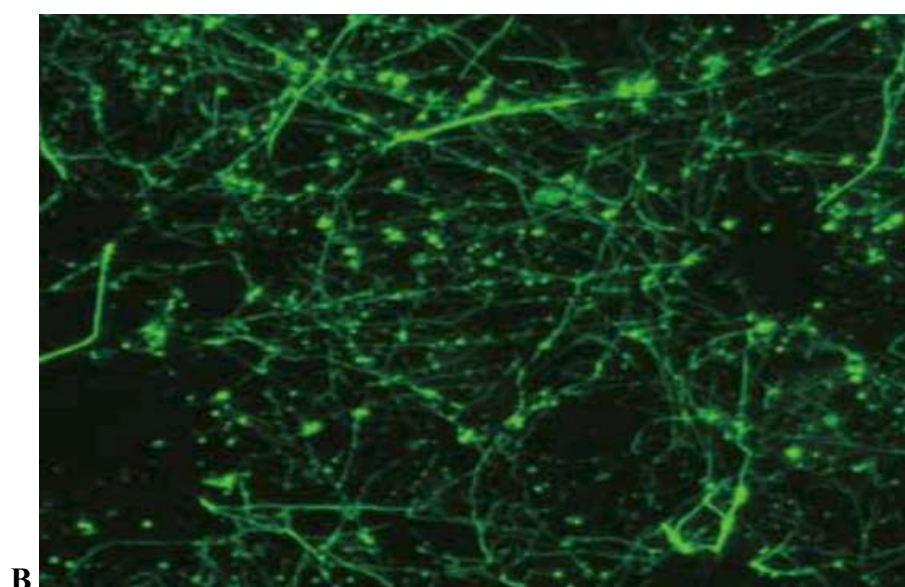
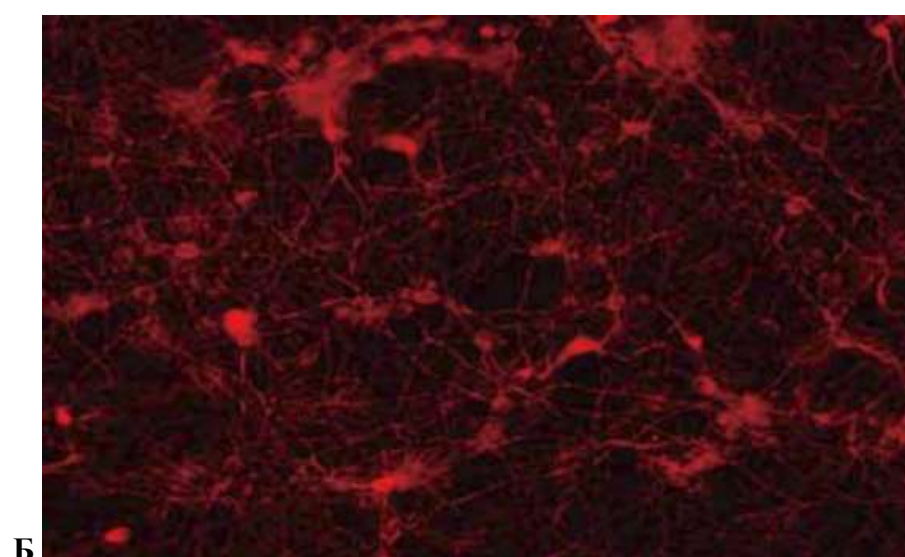
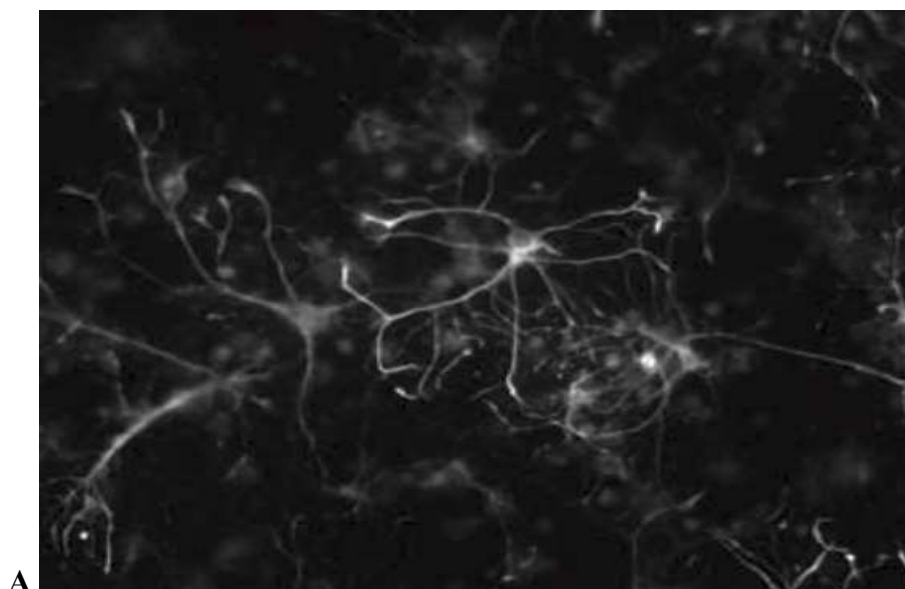


Рисунок 4. Культура первичных кортикальных нейронов мыши:  
А – неокрашенных и Б, В – окрашенных препаратами с различными флуорохромами.

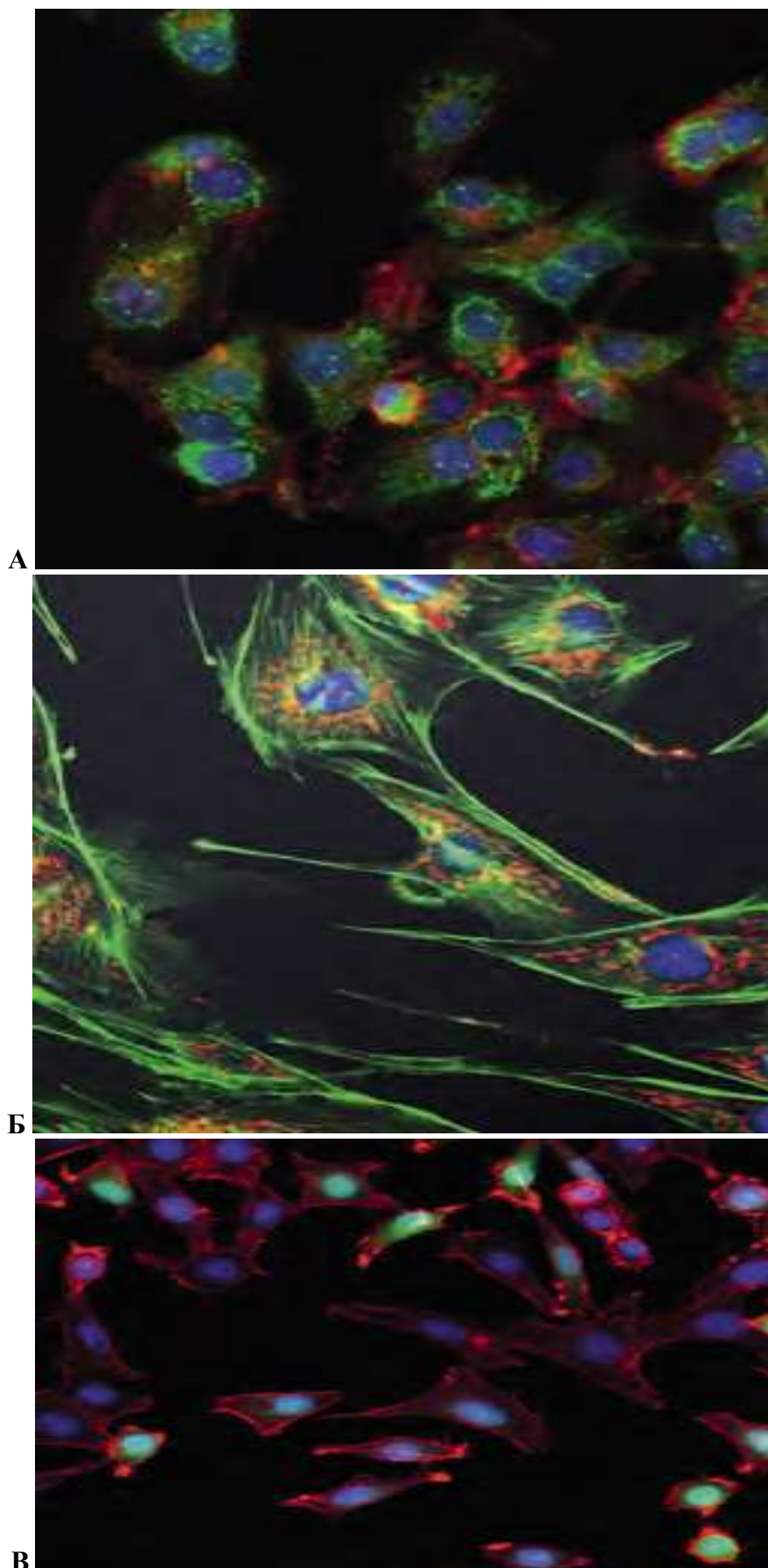


Рисунок 5. Клетки: А – эндотелиальные клетки ВРАЕ; Б – клетки линии 3Т3; В – клетки HepG2 мульти-меченые препаратами (компании Molecular Probes, Inc.)

Многорежимный фотометр обеспечивает высокое качество количественных и качественных анализов во всех режимах считывания. Управление осуществляется при помощи программного обеспечения Gen5, созданного для быстрой обработки полученных данных и с интуитивно-понятным интерфейсом. Программа позволяет использовать мощные инструменты анализа, такие как проведение интерполяции кривой по 4 или 5 параметрам, анализ параллельных линий, анализ EC50 (дозы, вызывающей гибель 50 % клеток), расширенный кинетический анализ. В основе создаваемых протоколов лежит логическая последовательность действий, обычно выполняемых вручную: от задания карты планшета с клетками и параметров измерения до обработки данных и создания полностью подготовленных к распечатке отчетов.

## **12 Контроль точности результатов измерений**

Для проверки точности измерений проводится тестовое измерение с использованием серии разведений клеток. Для этого рекомендуется использовать микропланшетный формат. Рекомендуется высадить не менее пяти лунок клеток в концентрациях, соответствующих выбранному шагу для серии разведений. Рекомендуется также иметь как минимум по три повтора для каждой концентрации. Проводится съемка и анализ культуры клеток на протяжении 1-3 дней с периодичностью съемки 0.5-3 часа. Получаемые графики роста позволяют выявить общие закономерности в динамике роста исследуемых клеточных культур, а также влияние изначальной плотности на рост и функционирование культуральной модели.

## **13 Оформление результатов измерений**

Результаты съемки отображаются в виде набора двумерных снимков исследуемой культуры клеток (рисунки 2, 4, 5), либо в виде видеофайлов, чтобы при необходимости отобразить изменения в динамике. Результаты анализа отображаются также в виде графиков (рисунок 3), отображающих динамику, таблиц данных с числовыми значениями выбранного параметра в каждой из временных точек (количество точек зависит от заданной периодичности и продолжительности съемки) либо гистограмм в зависимости от выбранного для анализа параметра.

Таким образом, на основании данной методики будет внедрена новая услуга для пользователей ЦГР – оценка изменения состояния культуры нейрональных клеток и клеток глиобластомы человека в реальном времени в ответ на различные воздействия. Использование многорежимного фотометра-имиджера Cytation в ходе исследований с



живыми клетками позволит не только визуализировать образцы, но и проводить их количественный анализ, а также обеспечит имиджинг и считывание широкого спектра флуорохромов и получение фенотипических количественных данных. В результате исследователь получает высокое качество количественных и качественных анализов живых клеток при различных воздействиях во всех режимах считывания и в реальном времени.

#### 14 Литература:

1. Füredi A., Tóth S., Szebényi K., Pape V.F.S., Türk D., Kucsma N., Cervenák L., Tóvári J., Szakács G. Identification and validation of compounds selectively killing resistant cancer: delineating cell line specific effects from P-glycoprotein-induced toxicity // *Mol Cancer Ther*, 2016 Jan;16 (1): 45-56 2.
2. Han S.-H., Shim S., Kim M.-J., Shin H.-Y., Jang W.-S., Lee S.-J., Jin Y.-W., Lee S.-S., Lee S.B., Park S. Long-term culture-induced phenotypic difference and efficient cryopreservation of small intestinal organoids by treatment timing of Rho kinase inhibitor // *World Journal of Gastroenterology*. 2017 Feb 14; 23 (6): 964-975.
3. Ramdzan Y.M., Trubetskov M.M., Ormsby A.R., Newcombe E.A., Sui X., Tobin M.J., Bongiovanni M.N., Gras S.L., Dewson G., Miller J.M.L., Finkbeiner S., Moily N.S., Niclis J., Parish C.L., Purcell A.W., Baker M.J., Wilce J.A., Waris S., Stojanovski D., Böcking T., Ang C.S., Ascher D.B., Reid G.E., Hatters D.M. Huntingtin Inclusions Trigger Cellular Quiescence, Deactivate Apoptosis, and Lead to Delayed Necrosis // *Cell Reports*. 2017 May 2; 19 (5): 919-927.
4. Lee J.H., Lee E.S., Bae I.H., Hwang J.A., Kim S.H., Kim D.Y., Park N.H., Rho H.S., Kim Y.J., Oh S.G., Lee C.S. Antimelanogenic Efficacy of Melasolv (3,4,5-Trimethoxycinnamate Thymol Ester) in Melanocytes and Three-Dimensional Human Skin Equivalent // *Skin Pharmacol Physiol*; 2017; 30 (4): 190-196
5. Kwon O.S., Hong S.K., Kwon S.J., Go Y.H., Oh E., Cha H.J. BCL2 induced by LAMTOR3/MAPK is a druggable target of chemoradioresistance in mesenchymal lung cancer // *Cancer Letters*; 2017 Sep 10; 403: 48-58.
6. Lee Y.S., Heo H., Lee J., Moon S.U., Jung W.Y., Park Y.K., Park M.G., Oh S.H., Kim S. An ultra-effective method of generating extramultipotent cells from human fibroblasts by ultrasound // *Biomaterials*; 2017 Oct; 143: 65-78.
7. Charretiera C., Saulniera A., Benaira L., Armaneta C., Bassarda I., Daulona S., Bernigauda B., Rodrigues de Sousa E., Gonthiera C., Zorna E., Vettera E., Saintpierre C., Rioua P., Gaillaca D. Robust real-time cell analysis method for determining viral infectious titers



during development of a viral vaccine production process // *Journal of Virological Methods*. 2018 Feb; 252: 57-64.

8. Füredi A., Szabó P., Tóth S., Cserepes M., Hámori L., Nagy V., Karai E., Vajdovich P., Imre T., Szabó P., Szüts D., Tóvári J., Szakács G. Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer // *J Control Release*; 2017 Sep 10; 261: 287-296.