

3. Lu, W., Pikhart, H., Sacker, A. Domains and measurements of healthy aging in epidemiological studies: a review/ W. Lu, H. Pikhart, A. Sacker // The Gerontologist. – 2019. – Т. 59, № . 4. – С. e294-e310.

Сведения об авторах

В.А. Гришин - учащийся

П.М. Бродовская* - учащаяся

О.В. Баженова – ассистент кафедры

Н.Б.Полетаева - кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

V.A. Grishin - student

P.M. Brodovskaya*- student

O.V. Bazhenova - department assistant

N.B. Poletaeva - Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

tbrod80@gmail.com

УДК 611.018.1

КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ

Елизавета Алексеевна Дрогалева¹, Анна Сергеевна Могиленских^{2,3}

¹МАОУ «Гимназия № 120»

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ

³ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Использование культур клеток находит в последнее время все более широкое применение в различных областях биомедицинских исследований и получает постепенное признание регулирующих организаций в качестве замены тестов на животных. Эксперименты на клеточных линиях позволяют оценить прямой цитотоксический и цитостатический эффекты препаратов. В настоящее время существует программа для биоимиджинга клеток «ImageJ». Данная программа позволяет анализировать и обрабатывать изображения разных размеров, а также учитывать площадь, периметр и другие характеристики, необходимые для оценки клеток. **Цель исследования** - оценить цитотоксическое действие препаратов с помощью программы для биоимиджинга клеток «ImageJ». **Материал и методы.** В нашем исследовании будет проведен эксперимент по определению чувствительности постоянной клеточной линии SAOS к препаратам с помощью программы. **Результаты.** Подготовка изображения к анализу проводится в несколько этапов, с использованием автоматической и ручной обработки. Наибольшее количество клеток и занимаемая ими площадь наблюдалась в контрольной группе клеток. Самые низкие показатели, как и ожидалось, представляла группа клеток при

воздействии лекарственного средства с доказанным цитотоксическим эффектом. **Выводы.** При подсчете различных параметров в клетках контрольной и экспериментальных групп с помощью программы были обнаружены значимые различия в одной из групп. Использование программы для биоимиджинга клеток «ImageJ» позволяет ускорить процесс подсчета клеток и осуществлять его в полуавтоматическом режиме.

Ключевые слова: клеточная культура SAOS, биоимиджинг клеток, программа «ImageJ».

CELL CULTURE AS A MODEL FOR DRUG TESTING

Elizaveta A. Drogaleva¹, Anna S. Mogilenskikh^{2,3}

¹Gymnasium № 120

²Ural state medical university

³Institute of Medical Cellular Technologies

Yekaterinburg, Russia

Abstract.

Introduction. The use of cell cultures has recently become increasingly widespread in various areas of biomedical research and is gradually being recognized by regulatory agencies as a replacement for animal tests. Experiments on cell lines make it possible to evaluate the direct cytotoxic and cytostatic effects of drugs. Currently, there is a program for cell bioimaging "ImageJ". This program allows you to analyze and process images of different sizes, as well as take into account the area, perimeter and other characteristics necessary for cell evaluation. **The purpose of the study** is to evaluate the cytotoxic effect of drugs using the ImageJ cell bioimaging program.

Material and methods. In our study, an experiment will be conducted to determine the sensitivity of the permanent SAOS cell line to drugs using the program. **Results.** Image preparation for analysis is carried out in several stages, using automatic and manual processing. The largest number of cells and the area occupied by them was observed in the control group of cells. The lowest values, as expected, were the group of cells exposed to a drug with a proven cytotoxic effect. **Conclusions.** When calculating various parameters in the cells of the control and experimental groups using the program, significant differences were found in one of the groups. The use of the program for cell bioimaging "ImageJ" allows you to speed up the process of counting cells and carry it out in a semi-automatic mode.

Keywords: SAOS cell culture, cell bioimaging, ImageJ program.

ВВЕДЕНИЕ

Доклинические исследования лекарственных препаратов — это трудоемкий и длительный процесс, включающий различные подходы: компьютерное моделирование, эксперименты на животных и исследование *in vitro*. Воссоздание патогенеза заболевания с использованием иммортализованных клеточных линий значительно упрощает процесс поиска новых лекарственных препаратов, а также помогает решить этические проблемы, связанные с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных [1].

Основным применением данного метода является: скрининг и разработка лекарственных препаратов, производство биологических соединений и обеспечение модельных систем для изучения нормальной физиологии и биохимии клеток, воздействия лекарств и токсичных соединений на клетки, а также мутагенез и канцерогенез [2].

При исследовании цитотоксичности препаратов используются методики, основанные на количественной оценке клеток. Для получения достоверных результатов необходим подсчет большого количества клеток. Результаты такой работы могут быть субъективными. На подсчет клеток вручную уходит много времени, такие результаты труднопроизводимы, в связи с этим возникает потребность в оптимизации и автоматизации процесса [3,4].

В настоящее время существует программа для биоимиджинга клеток «ImageJ». Данная программа позволяет анализировать и обрабатывать изображения разных размеров, а также учитывать площадь, периметр и другие характеристики, необходимые для оценки клеток [5].

Цель исследования – оценить цитотоксическое действие препаратов с помощью программы для биоимиджинга клеток «ImageJ».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали опухолевые клетки SAOS (остеосаркома костной ткани человека), которые культивировали в ростовой среде ДМЕМ (Панэко) с 10%-ной бычьей сывороткой (Панэко), 0,01% гентамицина сульфата в стандартных условиях при температуре 37°C и в атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂. Клетки высаживали в 24-луночные планшеты и культивировали с лекарственным средством, находящимся на стадии доклинических исследований, и препаратом, имеющим цитотоксическую активность (П1 и П2). Контроль за ростом культуры осуществлялся с помощью микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

После 3 дней клетки фиксировали глутаровым альдегидом, производили проводку по спиртам возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 95%) и окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Thermo Fisher). На поверхность с окрашиваемыми клетками наносили 300 нМ раствора DAPI в PBS на 5 мин при комнатной температуре в отсутствии прямого света. Раствор DAPI удаляли, клетки 3 раза отмывали PBS. Микроскопирование и фотографирование материала производили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Lab.A1 FL (Carl Zeiss, Германия). Подсчет количества клеток по снимкам был выполнен в каждой лунке в 5 полях при 100-кратном увеличении с использованием программы «ImageJ» (Wayne Rasband, НИИ, США).

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием пакета «Statistica 6.0». Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе использовалась автоматическая бинаризация, то есть перевод цветного изображения в черно-белое. Это позволяет сравнивать яркость каждого пикселя с t -значением, и, таким образом, уменьшать количество ненужной информации (Рис.1).

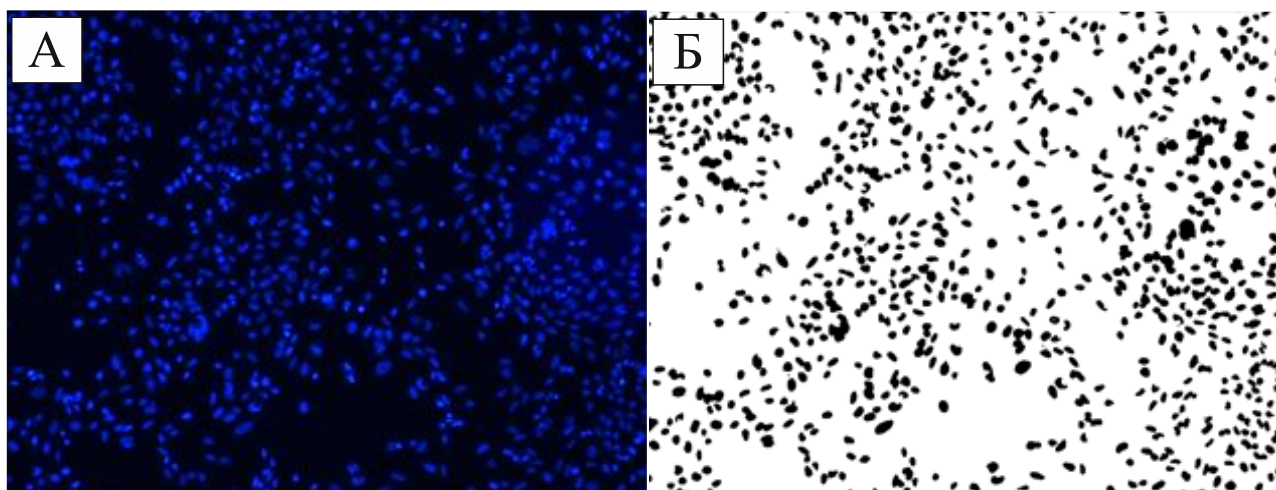


Рис. 1 Первый этап обработки изображений, А – визуализация клеток в контрольной группе, окраска Dapi, ув. $\times 100$; Б – перевод изображения в бинарное.

Если клетки на исходных изображениях прилегают друг к другу, то в бинарных изображениях они остаются несегментированными (Рис. 2А). Для разделения слабо перекрывающихся объектов был использован автоматический плагин Process/Binary/Watershed (Рис. 2Б). В более сложных случаях для разделения клеток используется ластик толщиной 1 пиксель (Рис. 2В). Для подсчета числа и анализа морфологии объектов был использован плагин Analyze Particle. С его помощью определены следующие параметры: количество клеток, процент занятой клетками площади, средний размер, периметр (длина внешней границы измерения). Для проверки расчетов использовался модуль ROI. Так, на изображении 2Г представлено 92 объекта, которые занимают 80556 пикселей площади, что составляет 17% общей площади (Рис. 2Г).

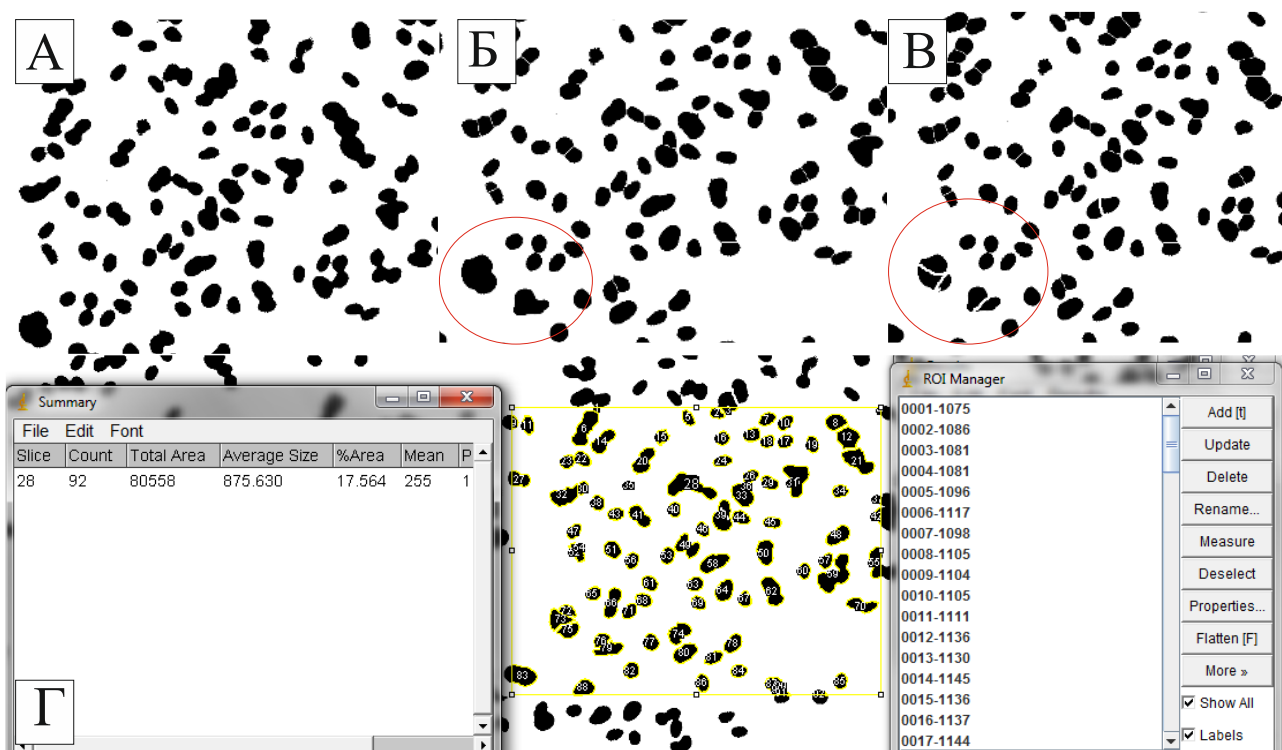


Рис. 2 Второй этап обработки изображений. А – без редакции, Б – использование автоматического плагина для разделения объектов, красным выделена зона без разделения, В – ручное разделение объектов, Г – пример расчета.

При подсчете были получены следующие результаты. Наибольшее количество клеток и занимаемая ими площадь наблюдалась в контрольной группе клеток. Самые низкие показатели, как и ожидалось, представляла группа клеток при воздействии лекарственного средства с доказанным цитотоксическим эффектом (Таблица 1).

Таблица 1

Сравнение результатов, полученных при подсчете клеток в контрольной группе и после воздействия препаратов

	Контроль	П1	П2
Общее количество	9532*	7970	1111*
Средний размер, пиксели	873,1±49,2*	808,6±64	579,7±87*
Процент занимаемой площади	13,7±1,2%*	7,2±1,1%	1,37±0,4%*

Примечание: * достоверность различий $p < 0,05$

ОБСУЖДЕНИЕ

В работах исследователей описаны многочисленные преимущества использования программы для биоимиджинга клеток «ImageJ» [3,6]. В нашем исследовании было обнаружено, что при подготовке изображения к подсчету

необходимо учитывать, что не все объекты, близко расположенные друг к другу, разделяются автоматически.

При сравнении среднего размера клеток, общего количества, процента занимаемой площади в контрольной группе и при воздействии П2 с вероятностью 95% обнаружены значимые различия ($p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. При подсчете различных параметров в клетках контрольной и экспериментальных групп были обнаружены значимые различия в одной из групп.

2. Использование программы для биомиджинга клеток «ImageJ» позволяет ускорить процесс подсчета клеток и осуществлять его в полуавтоматическом режиме.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мележникова, Н. О., Домнина, А. П., Горячая, Т. С., Петросян, М. А. Клеточные технологии в фармакологических исследованиях. Настоящее и будущее / Н. О. Мележникова, А. П. Домнина, Т. С. Горячая, М. А. Петросян // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 9. – С. 673-678. – DOI 10.7868/S0041377118090023.

2. Могиленских А.С., Сазонов С.В. Создание клеточных линий карциномы молочной железы/ А.С. Могиленских, С.В. Сазонов // Гены и клетки. 2021. № 1.

3. Мыщик, А.В. Использование программы ImageJ для автоматической морфометрии в гистологических исследованиях/ А.В. Мыщик// ОНВ. 2011. № 2 (100).

4. Конюхов, А.Л., Руководство к использованию программного комплекса ImageJ для обработки изображений/ А.Л. Конюхов // Учебное методическое пособие. – Томск: кафедра ТУ, ТУСУР, 2012. – 105 с

5. Биоимиджинг клеток: введение в анализ изображений с помощью ImageJ (Часть 1): учеб.-метод. пособие. – Казань: Альянс, 2019. – 25 с

6. Collins TJ. ImageJ for microscopy. Biotechniques. 2007 Jul ;43(1 Suppl):25-30. doi: 10.2144/000112517. PMID: 17936939.

Сведения об авторах

Е.А. Дрогалева*- учащийся

А.С. Могиленских- ассистент кафедры

Information about the authors

E.A. Drogaleva*-student

A.S. Mogilenskikh - Assistant of the department

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

lizaveta.drog@mail.ru

УДК 613

ИЗГОТОВЛЕНИЕ НАТУРАЛЬНОГО МАСЛЯНОГО БАЛЬЗАМА ДЛЯ СУХОЙ КОЖИ

Вера Антоновна Еремина¹, Светлана Алексеевна Кузнецова¹, Ольга Сергеевна Чеченихина², Анна Андреевна Шабалина³