

Заказ: ЦИН Института цитологии РАН (ЦИН)  
Емельянов Артем Николаевич  
+7964-327-39-60  
Кафедра под руководством профессора  
Георгия Пинаева в отделе клеточных культур.  
30/05/2011

## ТЕЗИСЫ

Исследовали эффект Кирлиан с помощью аппарата ГРВ камеры Короткова К. Г. При помещении суспензий культур клеток NCTC клон 929 линии L, E. Coli (**штамм?**), Дрожжей (**название?**), Микоплазмы (*Mycoplasma bovisgenitalium*, *Mycoplasma mastitis*), помещённых *ex juvantibus* в пластиковые чашки Петри фирмы NUNC размером 20 и 9,6 см<sup>2</sup>. Для получения эффекта Кирлиан использовали точечный (игла от шприца) и пластинчатый прозрачный электроды, напряжение 115 В с частотой 1 кГц. Время экспозиции варьировали от 0,6 с до 32 с.

Обнаружили неравномерное в виде концентрических кругов свечение препаратов в чашках Петри. При исследовании физиологического раствора и раствора фосфатного буфера в чашках Петри также было обнаружено аналогичное свечение в виде концентрических кругов примерно того же диаметра что и в чашках с культурами клеток. Однако, данное свечение возникало только на 24-30 с воздействия, в то время как при наличии в растворах суспензии клеток – начиная с 6-9 с. В чашках Петри диаметром 50 мм (20 см<sup>2</sup>) светящиеся круги были выражены лучше и имели большие расстояния друг от друга (~ 5 мм), чем в чашках диаметром 35 мм (9,6 см<sup>2</sup>). При использовании прямоугольной кюветы площадью 20 см<sup>2</sup> никаких геометрических закономерностей свечения раствора получено не было. Кроме этого, аналогичным образом в чашках Петри обрабатывали суспензию мела разных концентраций. В последнем случае тоже не было получено закономерного геометрического свечения (?).

Для определения влияния воздействия электрического напряжения на адгезивную способность клетки NCTC в количестве 20000/см<sup>2</sup> в среде DMEM-F12 (Биолот) с 10% сыворотки эмбрионов коров (РАА Laboratories, Inc, CA) помещали в чашки Петри площадью 20 см<sup>2</sup>. Сразу после внесения в чашки клетки в течение 10 с подвергались воздействию электрического напряжения в 115 В с частотой 1000 Гц. Подсчёт клеток в чашках через 2 ч и 24 ч культивирования при 37<sup>0</sup>С и 5% CO<sub>2</sub>. достоверных отличий количества клеток в опыте и контроле не показал. Таким образом, данное воздействие, по-видимому, мало влияет на адгезивную способность клеток NCTC.

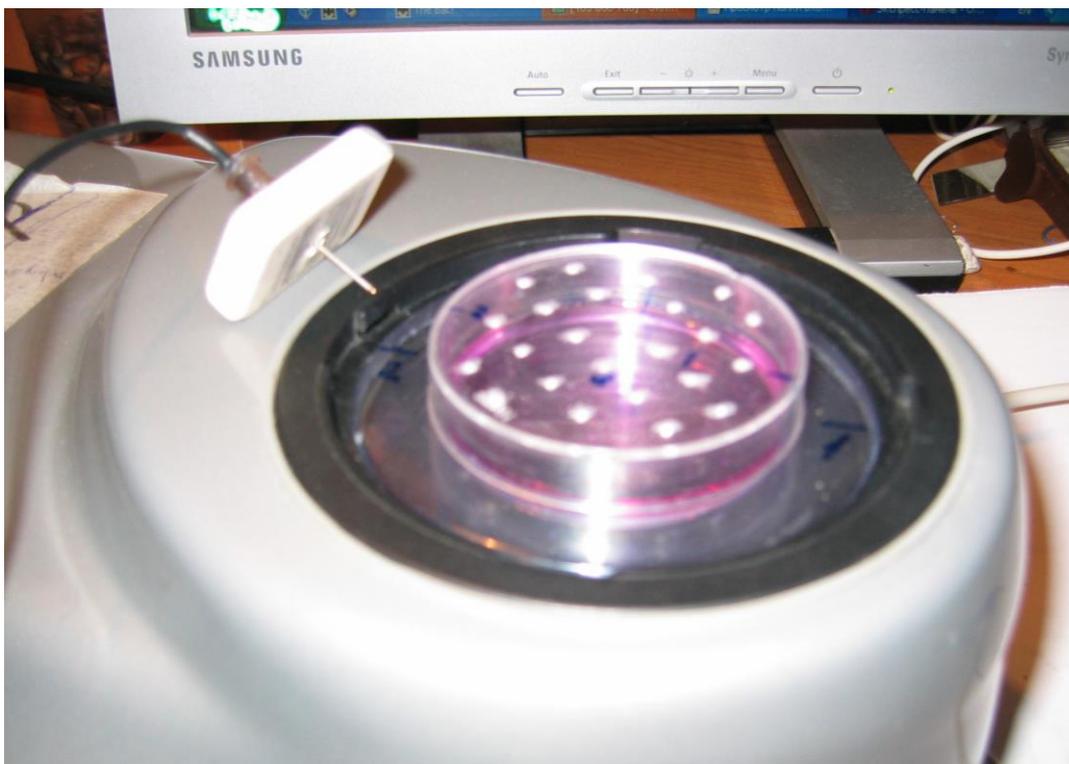
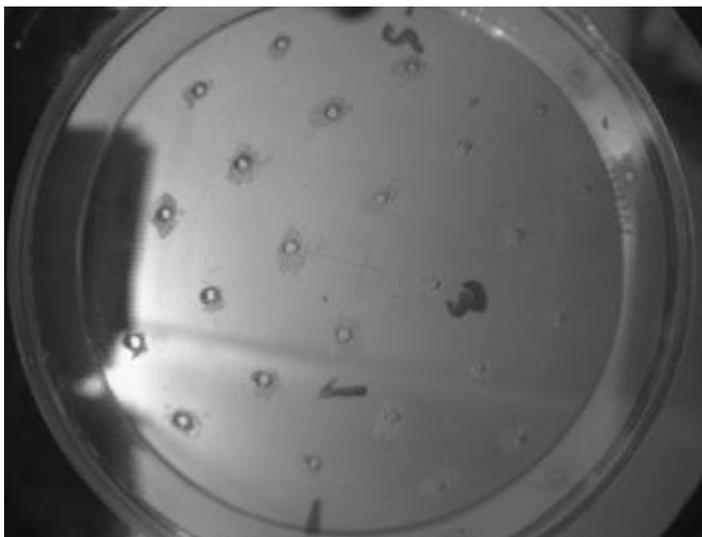
Для определения влияния электрического напряжения на пролиферативную способность клетки NCTC культивировали при вышеописанных условиях в течение суток.

Затем на клетки проводили аналогичное выше описанному воздействию электрическим полем. Далее клетки культивировали ещё трое суток и затем подсчитывали. Обнаружили подавление примерно в три раза пролиферации обработанных полем клеток по сравнению с клетками, не подвергавшимися воздействию.

Для выявления возможных пространственных перемещений суспензию клеток NCTC помещали в чашку Петри и сразу обрабатывали электрическим полем в течение 10 с. После 2 ч культивации клетки фиксировали и красили 0.1 % раствором кристаллического фиолетового. При визуальном осмотре видимых пространственных перемещений клеток обнаружено не было.

Результаты данных начальных экспериментов показывают, что обнаруженное явление концентрического кругового свечения имеет скорее физическую, а не биологическую природу. Однако, биологические объекты (в данном случае культуры клеток) активно реагируют на факторы, вызывающие свечение. Более того, живые клетки могут усиливать и даже участвовать в формировании явления свечения. Необходимо продолжение исследования, во-первых, для уточнения природы самого явления концентрического свечения, во-вторых, для выявления закономерностей участия живых объектов в формировании этого явления.

Апробация методики измерения в чашке Петри (6 см ) см фото



Исследовалась Питательная среда DMEM жидкая (Medium nutriticum DMEM fluidum sterilis)

Латинское название Medium nutriticum DMEM fluidum sterilis

Товарная группа Иммунобиологические препараты.

И пустая чашечка. Проверить на физ. растворе.

Предварительные результаты

- Нет разницы от положения иглы (сбоку или центр), для свечения во всем объеме.

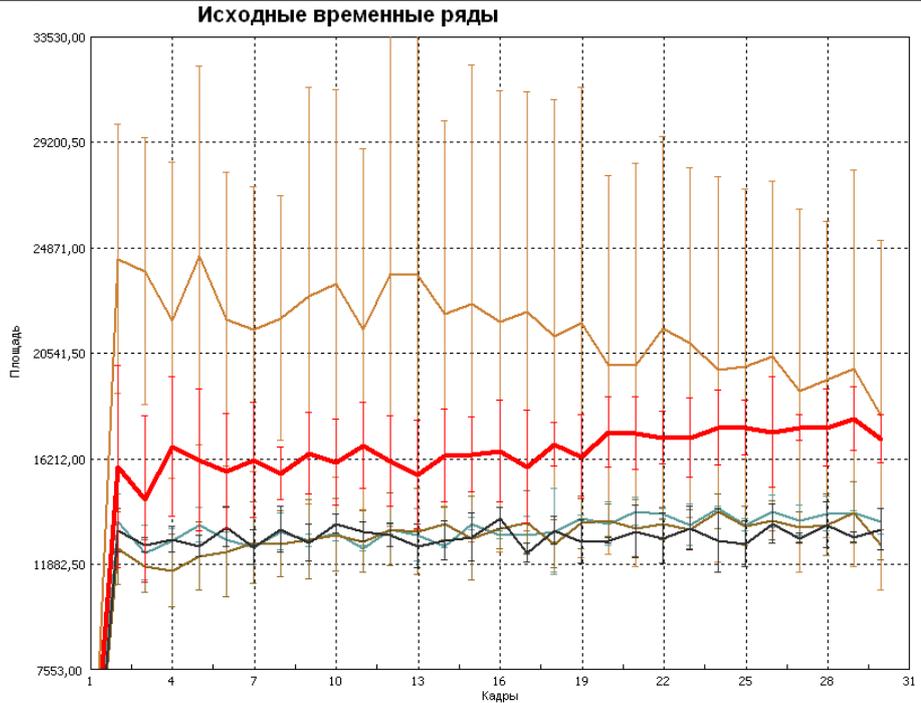
среда 1 положение 1  
измерение  
- Среднее + SKO

среда 1 положение 2  
измерение  
- Среднее + SKO

среда 1 положение 3  
измерение  
- Среднее + SKO

среда 2 положение 1  
измерение  
- Среднее + SKO

среда 3 положение 1  
измерение  
- Среднее + SKO



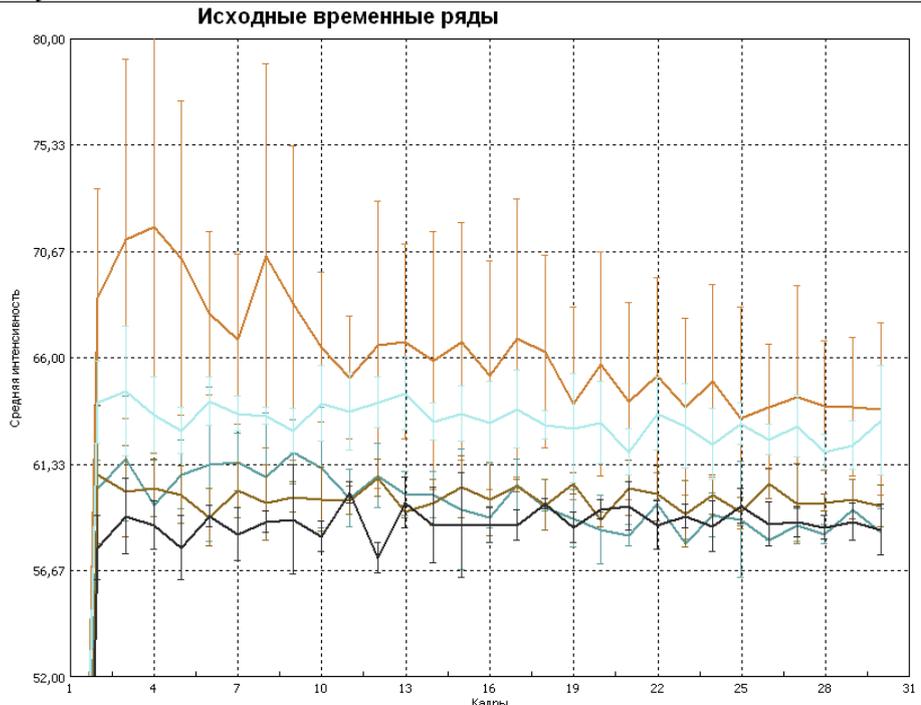
среда 1 положение 1  
измерение  
- Среднее + SKO

среда 1 положение 2  
измерение  
- Среднее + SKO

среда 1 положение 3  
измерение  
- Среднее + SKO

среда 2 положение 1  
измерение  
- Среднее + SKO

среда 3 положение 1  
измерение  
- Среднее + SKO



- **Сильно меняются ГРВ параметры при первых съемках, т.е. среда DMEM сильно меняется под воздействием разряда. Следует заменить на какой-либо буферный раствор или физ. раствор.**

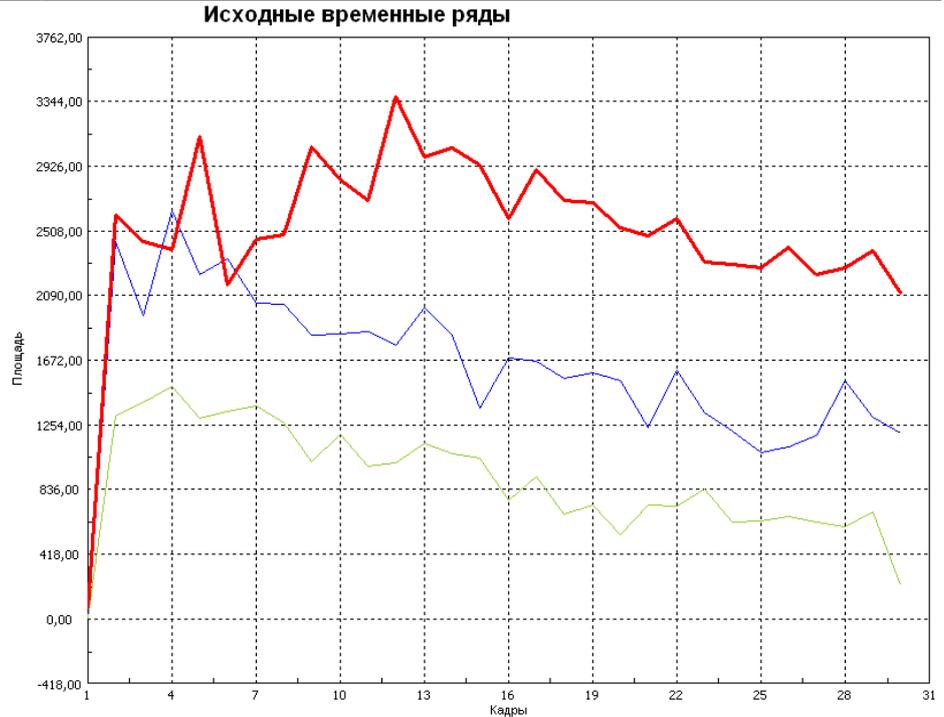
среда 1 положение 1  
измерение  
---1\0001.avi  
---1\0002.avi  
---1\0003.avi

среда 1 положение 2  
измерение

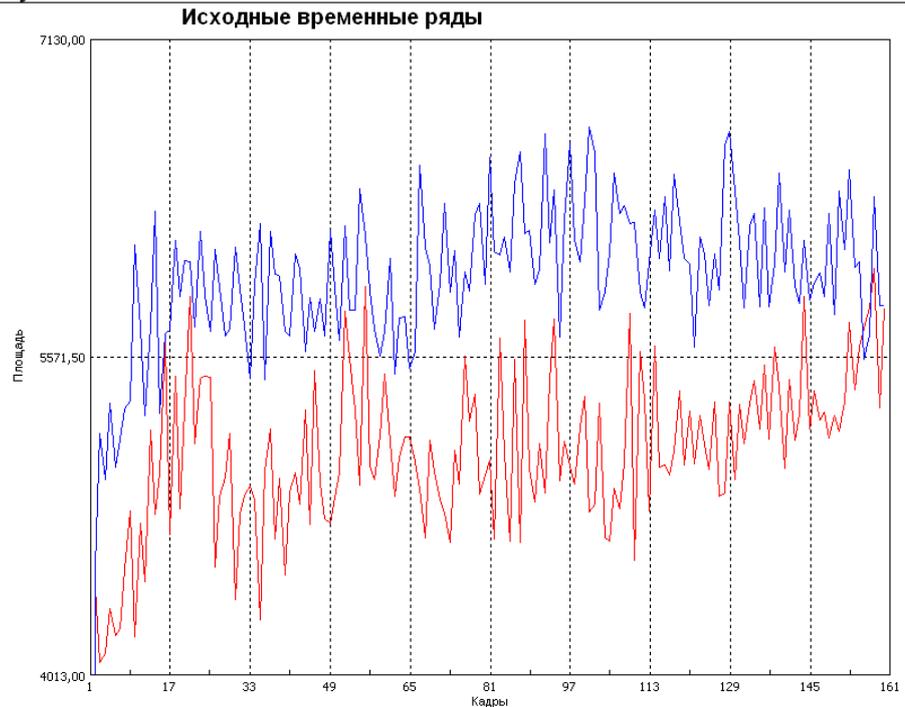
среда 1 положение 3  
измерение

среда 2 положение 1  
измерение

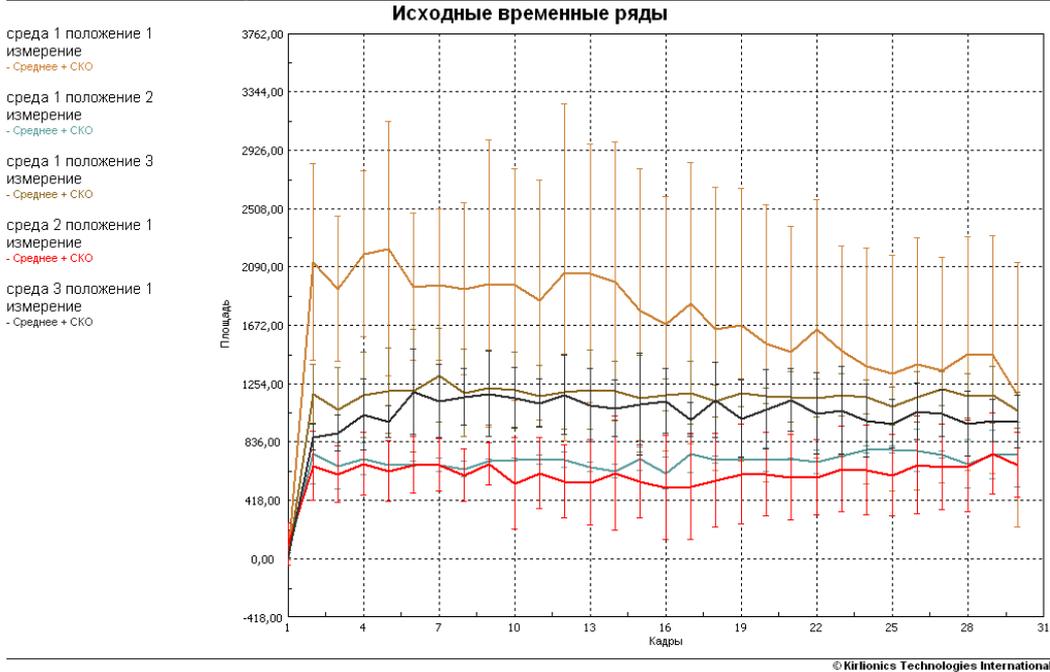
среда 3 положение 1  
измерение



Выборка 1  
---0001.avi  
---0002.avi



Или, например, при измерении среды МДЕМ в положениях – 1,2,1-2 (второй раз),3,1-3(третий раз). –см ниже



- Интенсивность по бубликам не меняется ? Представлен расчет по «бубликам» радиус 50, 80, 110. По расчету одинаковой площади

$$\text{Скруга} = \pi * R^2$$

$$\text{Скруга}50 = 3,14 * 50^2 = 314$$

$$\text{Скруга}80 = 3,14 * 80^2 = 502,4$$

$$\text{Скруга}110 = 3,14 * 110^2 = 690,8$$

$$\text{Скруга}80 - \text{Скруга}50 = \text{Скруга}110 - \text{Скруга}80$$

Распределение свечения не соответствует распределению «бубликов» клеток, которые зафиксированы визуально.

- Слабо меняются ГРВ параметры при первых съемках для буферного раствора (Забуферный физ. раствор фосфатный - PBS) или физ. раствора, т.е. не сильно меняется под воздействием разряда.

Далее работаем с PBS.

После разряда есть варианты:

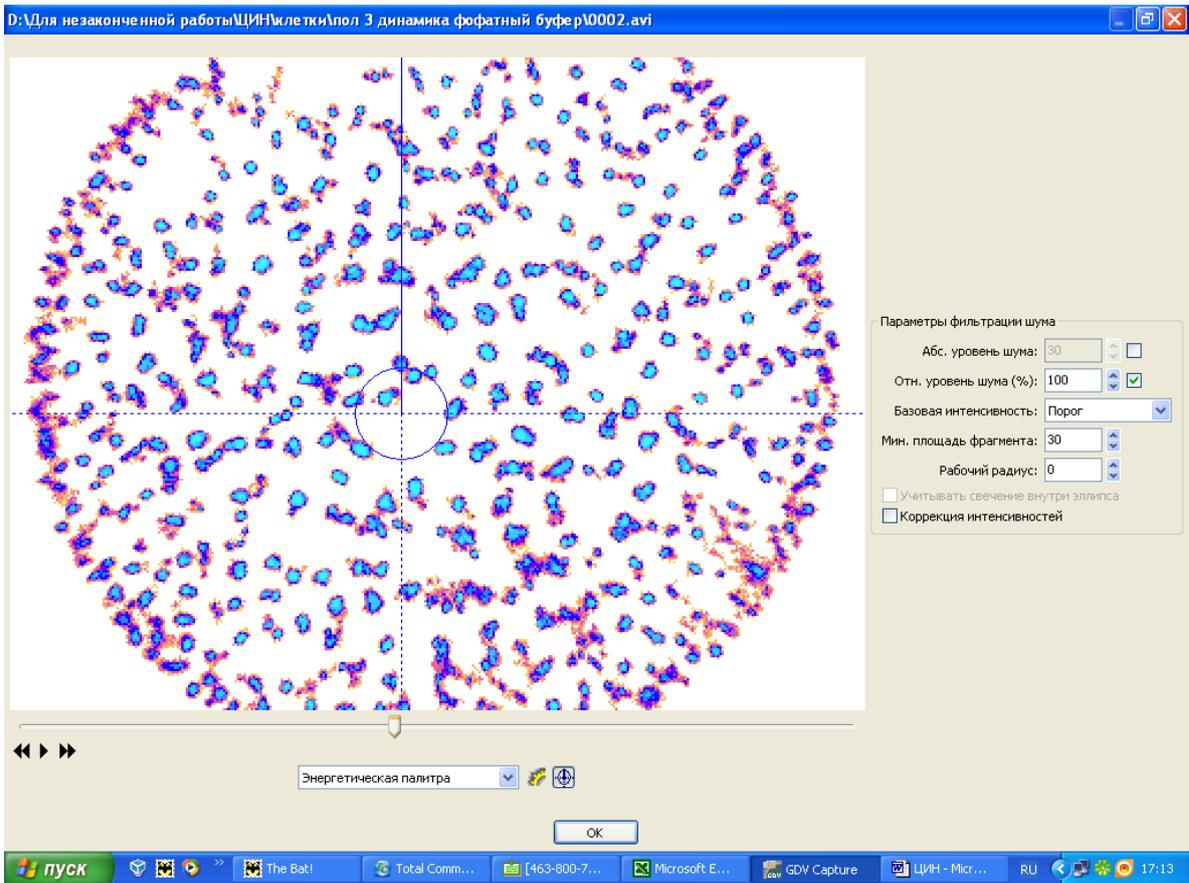
- Погибли
- Активировались по какому-то параметру (тест на пролиферацию) «на размножение»
- Ничего

Среда PBS. с добавлением различных клеток.

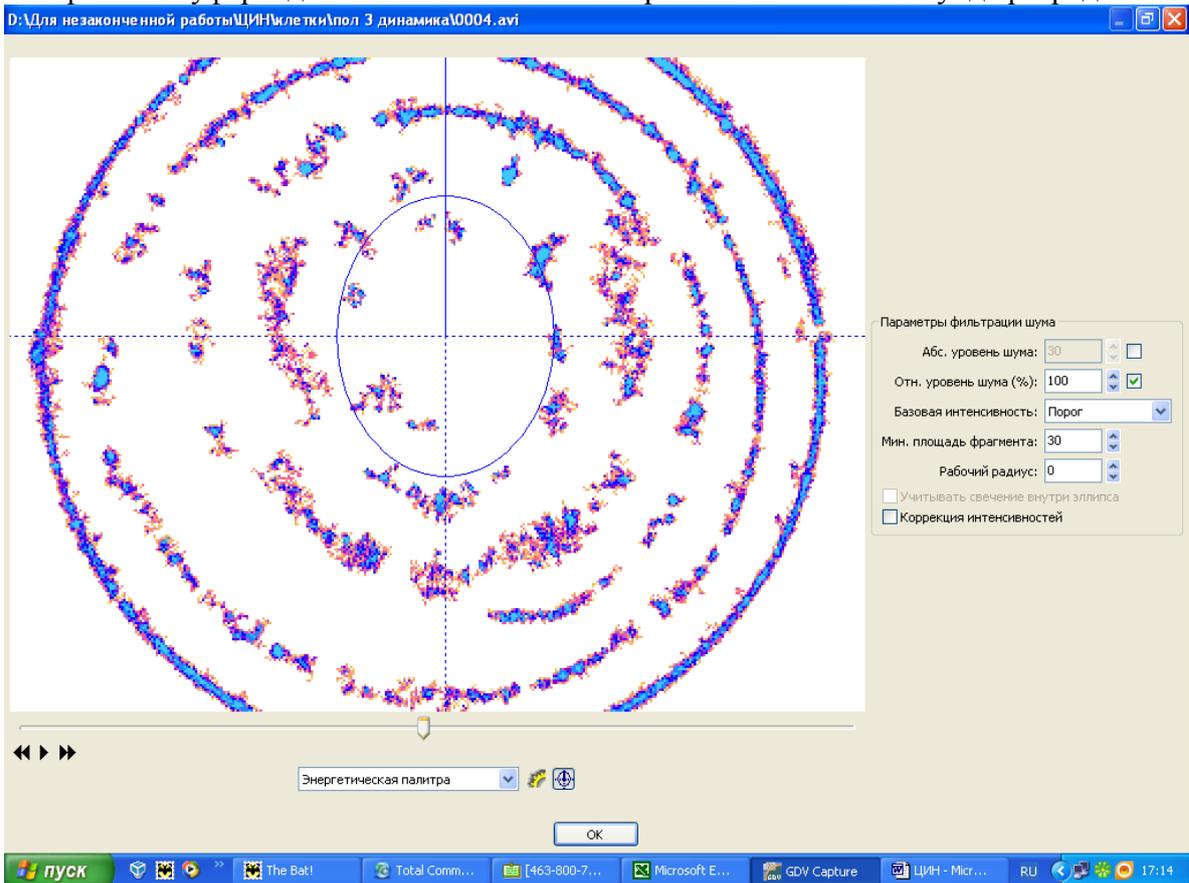
В первом опыте клетки дермы мышки иммортализованные клон линии L929

При съемке на 1 режиме 6 сек. Имеем различные по геометрии свечения картинки, представленные ниже

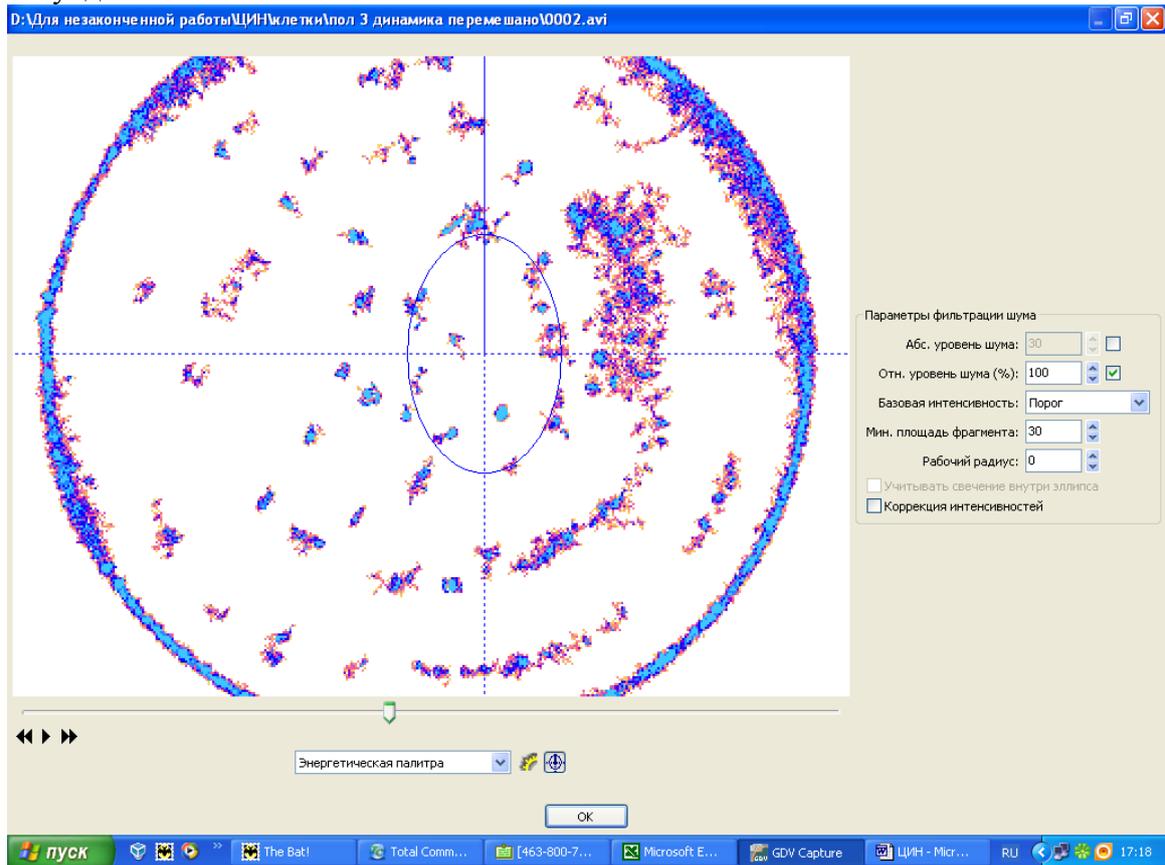
Фосфатный буфер на 3 секунде разряда



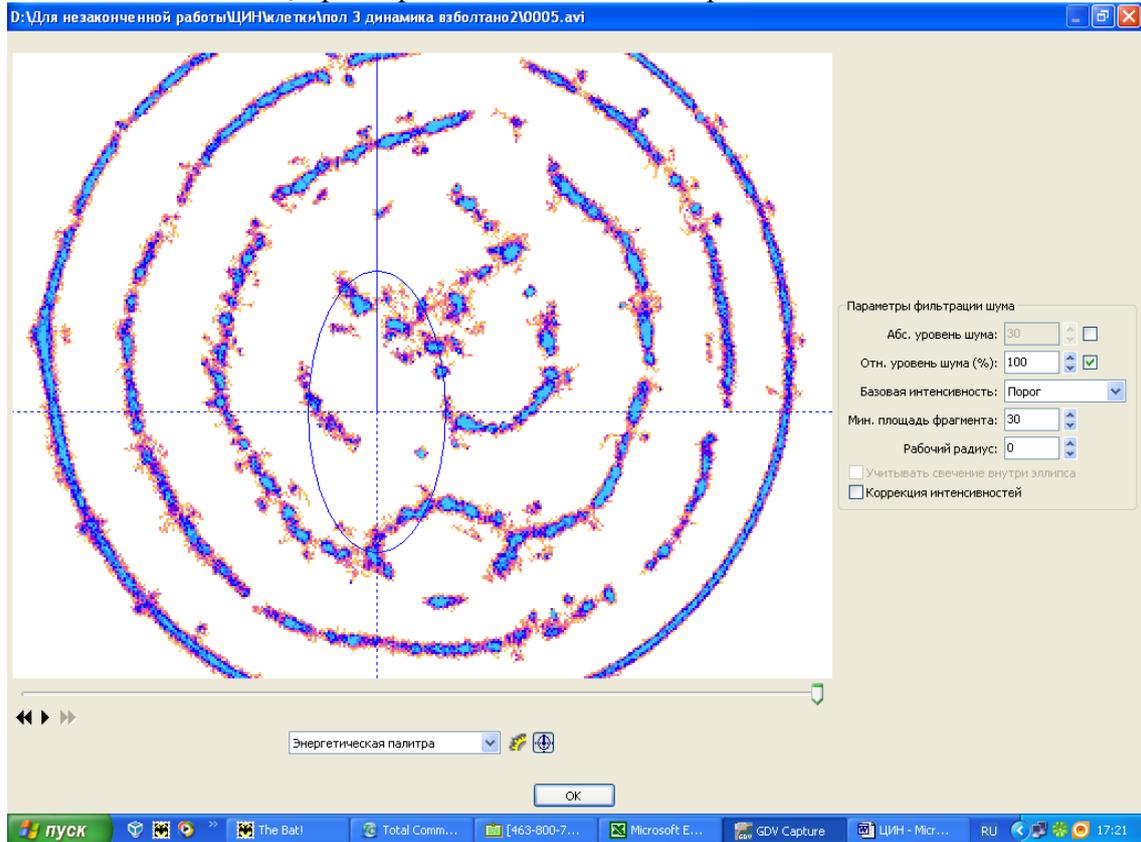
### Фосфатный буфер с добавлением клеток не перемешанных на 3 секунде разряда



## Фосфатный буфер с добавлением клеток «взболтанных» перемешанных клеток на 3 секунде



## сильно взболтанных, предварительно в чашке Петри



## ОТЧЁТ ПО ОПЫТУ 05.05. 11 «Живучесть клеток»

Подготовленные препараты находились под воздействием разряда 1 режим 10 секунд игла по центру.

1. Первые 2 чашки после иглы, которые после съёмки параметров фиксировали: при визуальном осмотре клетки в этих чашках распределены равномерно. Таким образом, по-видимому, совпадения со свечением нет. Это подтверждает предварительный опыт расчета по бубликам ГРВ свечения.

В следующем опыте необходимо снять эти чашки – т. е. распластанные клетки после фиксации 1% глутаровым альдегидом. Также рассмотреть клетки фиксированные и окрашенные генциановым фиолетовым.

2. Чашки с клетками, на которые мы воздействовали сразу после посева клеток и потом их фиксировали через 2 часа инкубации при 37<sup>0</sup>С и 5% СО<sub>2</sub> (перед уходом домой).

При визуальном осмотре ярких значимых отличий не найдено. Можно сказать, что в двух чашках, в которых воздействовали сбоку от центра и совсем сбоку, наблюдается некоторое смещение большего количества клеток к центру. В чашке, в которой воздействовали в центре – то же, но выражено совсем слабо. Эти чашки тоже посмотреть.

3. Чашки с клетками, на которые воздействовали сразу после посева (3 ч - опыт, 3 ч - контроль) и которые на следующий день (через сутки) подсчитывали. 06.05.11 при визуальном осмотре (это не сфотографировано т. к. невозможно) все три чашки после воздействия полем имеют в центре большую концентрацию клеток, чем немного дальше к краю. Также достаточно много клеток по краю чашки (грубо говоря, бублик наоборот). Контрольные чашки без воздействия имеют: 2 чашки - нечто отдалённо похожее на бублик, 1 чашка - похожее как в чашках после воздействия.

Таким образом, влияние поля на местоположение не достоверно. Однако, если прибавить к этому чашки из пункта 2, то всё же получится некая закономерность. Можно предположить, что при воздействии полем клетки склонны занимать определённое вышеописанное положение, а без воздействия – как угодно, без всякой видимой закономерности.

При подсчёте количества клеток различий между контролем и опытом не обнаружено. Наоборот, имеется достоверное совпадение количества клеток в чашках после воздействия и без воздействия.

Суммируя результаты пунктов 2 и 3, можно сказать, что воздействие полем данной интенсивности не нарушает адгезию (прикрепление) клеток. Клетки прикреплены через 2 часа и через сутки их не меньше, чем в контроле (значит, не было потерь). По-видимому, поле за такой короткий срок мало перемещает клетки.

4. Клетки, посаженные накануне 04.05.11. и обработанные полем.

При визуальном осмотре чашек 06.05.11 видимых различий в количестве не обнаружено.

При визуальном осмотре чашек 08.05.11 (т. е. через 4 дня после посева клеток и через 3 дня после обработки клеток полем) обнаружено видимое меньшее количество клеток в чашках после воздействия по сравнению с контрольными чашками.

При подсчёте клеток в контрольных чашках обнаружено в среднем по 3 млн клеток, а в чашках после обработки – по 1 млн. клеток, что в три раза меньше чем в контроле. Погрешность опыта 40%, так что этот результат достоверный. В чашке с клетками после воздействия, где не меняли среду на PBS, клеток совсем мало. Эту чашку не учитывали.

Таким образом, данное воздействие, не нарушая поверхностных характеристик клетки, нарушает её способность к пролиферации (воспроизведению).

Дальнейшие ближайшие задачи, примерно такие:

1. Нужно проверить характеристики кругов в разной посуде -- а) квадратной, б) в круглых чашках меньшего диаметра, в) в круглых чашках большего диаметра. (Наилучшая

концентрация клеток нам известна: 10-20 тыс кл на квадратный см)

2. Нужно ещё раз проверить, что снимает прибор когда клетки распластаны. Есть ли совпадения с тем, что видно визуально с тем, что светится? Для этого, в первом приближении, рассмотрим распластаные фиксированные и окрашенные клетки.

3. Нужно проверить, будут ли светиться бактерии.

4. Не обнаружили влияния на данные раковые клетки акупунктурной иглы. Может быт в самом начале после разморозки клеток.