

# Автоматизированная система оценки пролиферативной активности эукариотических клеток в токсикологических исследованиях *in vitro*

Л.В.Коломбет

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,  
Оболенск, Серпуховский район, Московская обл., Российская Федерация

В исследовании оценили возможность использования прибора Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd., Финляндия) в токсикологических исследованиях *in vitro*. Прибор Cell-IQ используется для непрерывного инкубирования и анализа культур клеток животных и человека. Определили точность подсчета клеток с помощью программы Analyser прибора Cell-IQ в сравнении с визуальным методом. Показали, что подсчет клеток на микрофотографиях программой Analyser позволяет определять пролиферативную активность культуры с той же точностью, что и при помощи визуального подсчета клеток. Также сравнили данные о цитотоксичности, полученные с помощью прибора и традиционным методом с использованием красителя нейтрального красного (NRU). Показали, что использование прибора Cell-IQ позволяет получать результаты по цитотоксичности, сопоставимые с методом NRU, при этом дает возможность более детально исследовать ответ клеток на токсическое воздействие.

**Ключевые слова:** Cell-IQ, цитотоксичность, культура клеток, машинное зрение, токсикология *in vitro*

**Для цитирования:** Коломбет Л.В. Автоматизированная система оценки пролиферативной активности эукариотических клеток в токсикологических исследованиях *in vitro*. Бактериология. 2017; 2(2): 24–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-24-29

## An autosystem for measuring proliferative activity of eukaryotic cells in toxicological research *in vitro*

L.V.Kolombet

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The possibility to use Cell-IQ equipment (Chip-Man Technologies Ltd., Finland) for *in vitro* toxicological research has been evaluated. The Cell-IQ device is a platform for constant incubating and analyzing human and animal cell cultures. The accuracy of counting cells using a Cell-IQ Analyzer software vs a visual procedure was determined. The Analyzer-based counting of cells on micrographs was shown to allow determining culture proliferative activity with the same accuracy as the visual method does. Cytotoxicity results obtained with the device as well as by a conventional NRU procedure were compared. The Cell-IQ device was shown to provide cytotoxicity data comparable with those obtained by the NRU method, making possible studying a cell response to toxic exposure in more detail.

**Keywords:** Cell-IQ, cytotoxicity, cell culture, machine vision, toxicology *in vitro*

**For citation:** Kolombet L.V. An autosystem for measuring proliferative activity of eukaryotic cells in toxicological research *in vitro*. Bacteriology. 2017; 2(2): 24–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-24-29

Токсикологические исследования *in vitro* в настоящее время становятся все более популярными по ряду этических и экономических причин. Некоторые методы оценки токсичности веществ *in vitro* прошли валидацию в Европе и США в соответствующих регламентирующих организаци-

ях [1]. В условиях постоянного появления новых химических соединений и наноструктурированных веществ и необходимости их токсикологической оценки заслуживает особого внимания оборудование, позволяющее максимально автоматизировать процесс сбора информации о токсичности тех

### Для корреспонденции:

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: info@obolensk.org

Статья поступила 10.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

### For correspondence:

Liubov V. Kolombet, Sc.D. (Bio.), scientific secretary, head of science department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: info@obolensk.org

The article was received 10.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

или иных веществ с использованием культур клеток млекопитающих. Таким оборудованием являются инвертированные микроскопы ведущих мировых производителей, оснащенные климатической камерой, моторизованным предметным столиком и компьютерным обеспечением для наблюдения за поведением клеток в режиме реального времени. Кроме того, появились специализированные приборы, такие как, например, выпускает фирма BD Biosciences ([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)), или прибор Cell-IQ (Chip-Man Technologies, Tampere, Finland, [www.chipmantech.com](http://www.chipmantech.com)). Эти приборы специально предназначены для культивирования и анализа клеточной популяции в динамике [2–4].

В настоящей работе оценили точность распознавания клеток на микрофотографиях с помощью программы Cell-IQ Analyser в сравнении с визуальным подсчетом. Также провели сравнение данных о цитотоксичности, полученных двумя методами: по включению красителя нейтрального красного (NRU) и с использованием прибора Cell-IQ.

## Материалы и методы

**Модельные токсиканты.** Базовую суспензию одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) (12 000 мкг/мл) («Карбонлайт», Россия) готовили в 4% водном растворе проксанола-268 (синтетическое неионогенное ПАВ). Из базовой суспензии делали ряд последовательных разведений, также в 4% водном растворе проксанола-268. После обработки на ультразвуковом дезинтеграторе Ultrasonic Processor (Cole Parmer, США) в течение 10 мин при выходной мощности 300 Вт суспензию вносили в культуральную среду. Конечная концентрация проксанола-268 в культуральной среде не превышала 1%.

Базовый раствор Т-2 токсина (Biorige, Австрия) готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 10 мг/мл. Для тестирования цитотоксичности делали ряд последовательных разведений Т-2 токсина.

**Клеточные культуры.** Первичную культуру крысиных эмбриональных фибробластов выделяли по описанной методике [5]. Культуру карциномы легкого человека А549 получили из Российской коллекции клеточных культур позвоночных, г. С.-Петербург. Культуры клеток культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 20 мМ бикарбоната натрия и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), в атмосфере газовой смеси воздух/CO<sub>2</sub> 5% при 37°C.

**Оборудование.** Прибор Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия) состоит из камеры для культивирования клеток, системы микроскопического видеонаблюдения и программного обеспечения Analyser для анализа изображений. Во время инкубирования выбранная оператором область в каждой лунке фотографируется в автоматическом режиме с заданной периодичностью (зависит от задачи; в данном исследовании – 1 ч), после чего изображения анализируются с помощью программы Analyser. Более подробная информация о приборе размещена на сайте производителя, а также дана в публикациях о возможностях Cell-IQ [6–8].

**Оценка цитотоксичности.** Для проведения экспериментов клетки рассеивали в 24- и 48-луночные планшеты (Greiner, Германия) в концентрации  $3,75 \times 10^4$  клеток/мл и культивировали в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли возрастающие концентрации модельных токсикантов. ОУНТ – в кон-

центрациях 10, 100, 1000, 2000 и 3000 мкг/мл, в качестве контролей использовали воду, 1% проксанол-268 и 0,1 М NaCl. Т-2 токсин – в концентрациях 1, 5, 10, 15, 20 и 40 нг/мл, в качестве контроля использовали ДМСО в конечной концентрации 0,5%. Клетки культивировали в течение 24 ч в приборе Cell-IQ, после чего планшет использовали для постановки теста NRU. Тест проводили по описанной методике [9–11]. Цитотоксичность выражали в процентах измеряемого параметра относительно контроля, принимаемого за 100%.

**Статистическая обработка данных.** Модельные токсиканты исследовали в 2–3 независимых экспериментах, по 5–6 повторов на каждый вариант концентрации токсиканта. На диаграммах указывали доверительный интервал при 95% уровне значимости. Цитотоксическую дозу, вызывающую снижение исследуемого показателя на 50% от контроля (ЦТД50), оценивали на основе нелинейной логистической модели, содержащей четыре параметра, с помощью программы SigmaPlot v. 9.01 (Systat Software Inc.).

## Результаты и обсуждение

**Сравнительный анализ результатов визуального и автоматизированного подсчета клеток.** В основу программы Cell-IQ Analyser заложен один из элементов искусственного интеллекта – принцип машинного зрения. Он давно применяется в различных промышленных технологиях [11], но в биологии использование этого принципа пока не нашло широкого применения [1, 7, 12, 13]. Поэтому целью данного эксперимента был анализ точности распознавания клеток программой Analyser на микрофотографиях в сравнении с визуальным подсчетом клеток на тех же микрофотографиях.

Анализ провели в экспериментах по оценке воздействия ОУНТ на культуру карциномы легкого человека А549. В настоящее время активно изучаются вопросы, связанные с возможной токсичностью углеродсодержащих наноматериалов, в том числе с механизмами их действия на клеточном уровне [14]. Это обусловлено перспективами их применения в технике и медицине [15]. Кроме того, эти вещества обладают ограниченной растворимостью и тенденцией к агрегации, что вызывает получение противоречивых результатов при их исследовании. В связи с этим представляет определенный интерес оценка возможности использования системы Cell-IQ для исследования потенциальной цитотоксичности ОУНТ.

Перед проведением анализа создали библиотеку изображений клеток в различных морфо-физиологических состояниях (морфотипов), распределяя их по категориям: стабильные, делящиеся, аномальные и мертвые (рис. 1, а). Эту информацию встраивали в алгоритм программы, что позволяло ей идентифицировать и подсчитывать клетки различных категорий (рис. 1, б, в, г).

В ходе эксперимента проанализировали микрофотографии клеток в количестве 71:37 в начале эксперимента (0 ч) и 34 – в конце (через 24 ч). Ошибку при подсчете клеток программой Analyser относительно визуального подсчета на одном и том же изображении оценивали по формуле:

$$\Delta\% = \frac{|N_B - N_A|}{N_B} \times 100,$$

где  $N_B$  – количество клеток, подсчитанное визуально;  $N_A$  – количество клеток, подсчитанное программой Analyser.

Все поля зрения после подсчета ошибки распределили по категориям согласно уровню ошибки: 0–5%, 5–10%, 10–15%, 15–20% и >20%. Результаты приведены на рис. 2, а. Оказалось, что в 93% случаев ошибка не превышала 15%, т.е. при истинном количестве клеток на микрофотографии, равном 100, результат подсчета с помощью программы составлял 85–115 клеток. Таким образом, программа Analyser может быть использована для подсчета клеток с указанной точностью.

Далее оценили применимость автоматического подсчета для определения уровня пролиферации культуры A549 при воздействии различных концентраций ОУНТ. Коэффициент пролиферации рассчитывали путем деления количества клеток в конце эксперимента (24 ч) на количество клеток в начале (0 ч). Значения коэффициента получали с использованием автоматического и визуального подсчетов, результаты сравнительного анализа приведены на рис. 2, б.

Значения коэффициентов пролиферации, определенные с помощью программы Analyser и полученные визуальным методом, достоверно не различаются ( $p < 0,05$ ) (точки 1, 2, 3, 4, 5 и 8). Исключение составляют значения для двух вариантов опыта (точки 6 и 7), полученных при обработке клеток высокими концентрациями суспензий нанотрубок (2000–3000 мкг/мл). В этом случае высокая концентрация токсиканта приводила к увеличенной сорбции его на поверхности клеток и культурального пластика. В результате получали фотографии, трудно распознаваемые программой. Это приводило к существенной ошибке при автоматизированном подсчете клеток и к значительным различиям в оценках коэффициента пролиферации между двумя методами подсчета клеток.

Таким образом, автоматический метод подсчета клеток с помощью программы Cell-IQ Analyser позволяет в ряде случаев заменить трудоемкий и длительный метод визуаль-

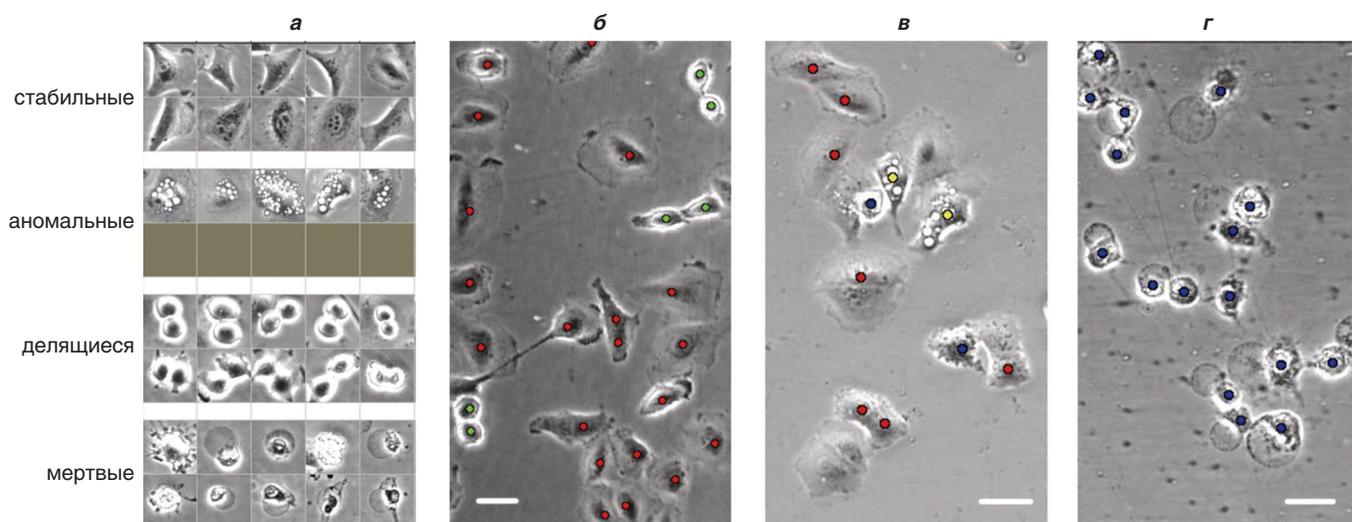


Рис. 1. Библиотека морфотипов клеток A549 и пример анализа микрофотографий с помощью программы Cell-IQ Analyser. Фазовый контраст: а – библиотека морфотипов клеток; б, в и г – примеры распознавания клеток A549 программой Analyser. Отмечены цветом: красным и зеленым – стабильные и делящиеся клетки соответственно (б); желтым – морфологически аномальные клетки (в); синим – мертвые клетки (г). Длина линейки – 30 мкм.

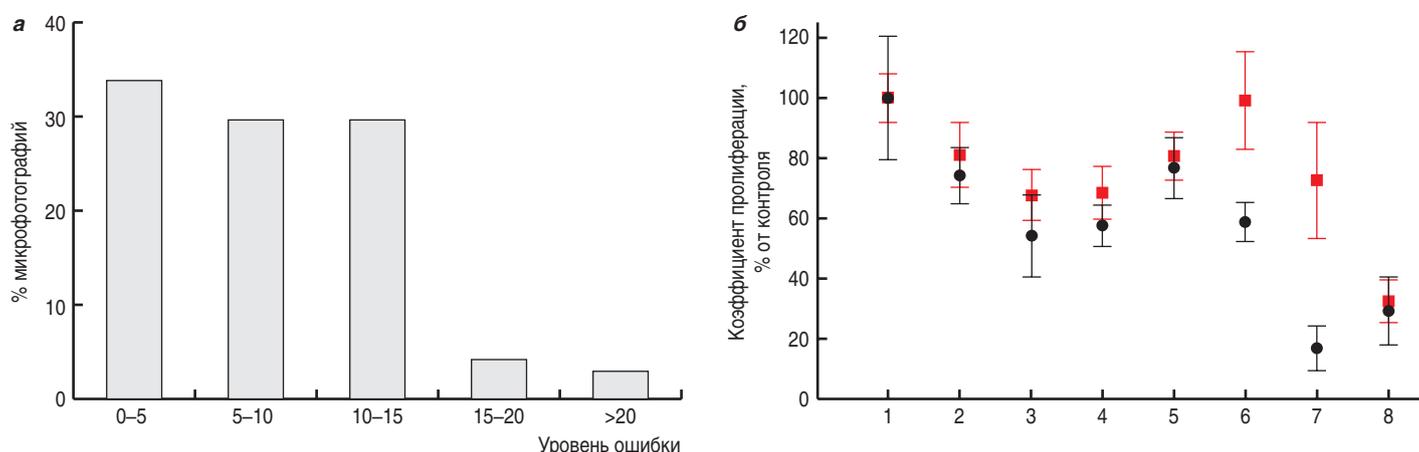


Рис. 2. Сравнительный анализ визуального и автоматического подсчета клеток: а – точность подсчета клеток на микрофотографиях; б – значения коэффициентов пролиферации культуры A549 под воздействием модельных токсикантов, определенные двумя методами подсчета (■ – Analyser, ● – визуальный подсчет): 1 – контроль 1 (вода); 2 – контроль 2 (1% проксанол-268); 3 – ОУНТ (10 мкг/мл); 4 – ОУНТ (100 мкг/мл); 5 – ОУНТ (1000 мкг/мл); 6 – ОУНТ (2000 мкг/мл); 7 – ОУНТ (3000 мкг/мл); 8 – контроль 3 (0,1 М NaCl, воспроизводимость тест-системы).

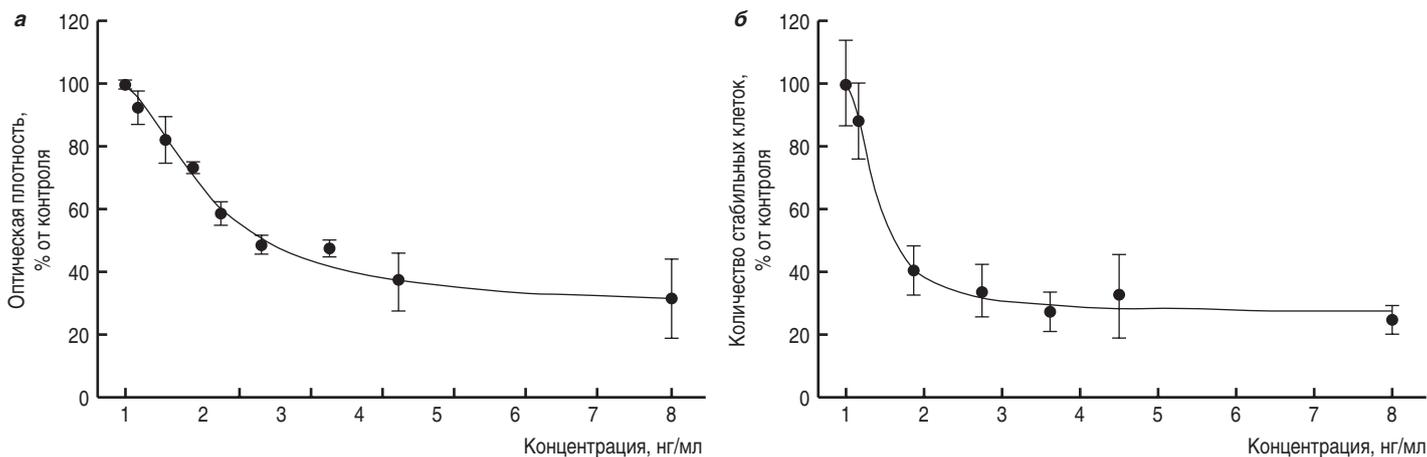


Рис. 3. Цитотоксическое действие Т-2-токсина на культуру крысиных эмбриональных фибробластов: а – метод NRU. Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,94$ ; б – метод Cell-IQ. Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,97$ .

ного подсчета, однако требует высокого качества получаемых изображений клеток. В отдельных случаях (например, низкое качество микрофотографий вследствие особенностей токсиканта, см. выше) можно комбинировать оба метода для получения достоверных результатов исследования.

Сравнительный анализ оценки цитотоксичности токсиканта с использованием метода NRU и прибора Cell-IQ. Одним из классических методов оценки цитотоксичности является метод NRU. Целью данного раздела работы было сравнение результатов определения цитотоксичности, полученных с помощью прибора Cell-IQ и метода NRU. Для данного исследования выбрали один из микотоксинов трихотеценового ряда – Т-2-токсин. Этот токсин хорошо изучен, имеется достаточно публикаций по определению его цитотоксичности на различных культурах клеток [16].

Цитотоксичность Т-2-токсина оценивали на культуре крысиных эмбриональных фибробластов. Цитотоксическое действие Т-2-токсина, определенное методом NRU, иллюстрирует рис. 3, а. Показали дозозависимое действие Т-2-токсина на культуру фибробластов. Цитотоксическая доза (ЦТД50) составила  $6,36 \pm 0,53$  нг/мл.

Далее оценили цитотоксическое действие Т-2-токсина с помощью прибора Cell-IQ. Как и для культуры A549, для крысиных эмбриональных фибробластов создали библиотеку морфотипов, с помощью которой программу «обучили» распознавать данную культуру. Результаты представлены на рис. 4.

Программа Analyser позволяет представить графически динамику состояния культуры в ходе эксперимента. Графики демонстрируют изменение во времени как общего количества клеток (см. рис. 4, а), так и процентное содержание разных морфотипов клетки (рис. 4, б). Так, на графиках видно, что в контроле и при концентрации Т-2-токсина 1 нг/мл происходит размножение клеток, и количество стабильных клеток в процентном отношении остается постоянным. В то же время при более высокой концентрации микотоксина (10 нг/мл) прекращается пролиферация культуры, а также происходит снижение количества стабильных клеток. Таким образом, ответ клеток на воздействие токсина складывается из процессов уменьшения пролиферации (в большей степени) и изменения/гибели (в меньшей степени).

Однако формат получаемых результатов отличается от формата NRU-метода, поэтому для облегчения сравнения двух методов данные Cell-IQ изобразили в сходных координатах, т.е. использовали только одну временную точку (24 ч) и получили зависимость относительного количества клеток от концентрации микотоксина (см. рис. 3, б). Цитотоксическая доза составила  $2,31 \pm 0,33$  нг/мл. Представление данных в единой системе координат позволило выявить сходство зависимости показателя цитотоксичности от концентрации токсиканта при использовании двух методов оценки. Рассчитанные значения ЦТД50 можно также считать близкими ( $2,31 \pm 0,33$  и  $6,36 \pm 0,53$  нг/мл), поскольку диапазон этого показателя достаточно широк и ЦТД50, полученные различными исследователями, колеблются от 0,5 до 26 нг/мл [17].

Таким образом, результаты оценки цитотоксичности с использованием прибора Cell-IQ соответствуют таковым, полученным классическим методом NRU, однако дают более детальное представление об ответе клеток на токсическое воздействие.

Полученные данные согласуются с результатами исследования, выполненного Toimela с соавт. на культурах клеток почки человека НК-2 и рака груди MCF-7 [7]. Авторы показали, что результаты определения цитотоксичности, полученные с помощью прибора Cell-IQ, сравнимы с данными по цитотоксичности, полученными с использованием классических методов (NRU, окрашивание кристалл-виолетом и Хёхст 33258).

Метод NRU и другие, основанные на подобном подходе (МТТ), не позволяют использовать клетки для дальнейшего анализа, поскольку во время выполнения методики клетки погибают. Преимуществом использования прибора Cell-IQ является возможность продолжения эксперимента после получения данных о цитотоксичности с целью, например, изучения способности культуры восстанавливаться после токсического воздействия (так называемый «recovery test»). Кроме того, прибор позволяет наблюдать за ответом клеток на токсическое воздействие в любой момент в ходе эксперимента, а не только по его окончании. Следует отметить и другие недостатки метода NRU. Этот метод окраски клеток основан на определении оптической плотности (OD) краси-

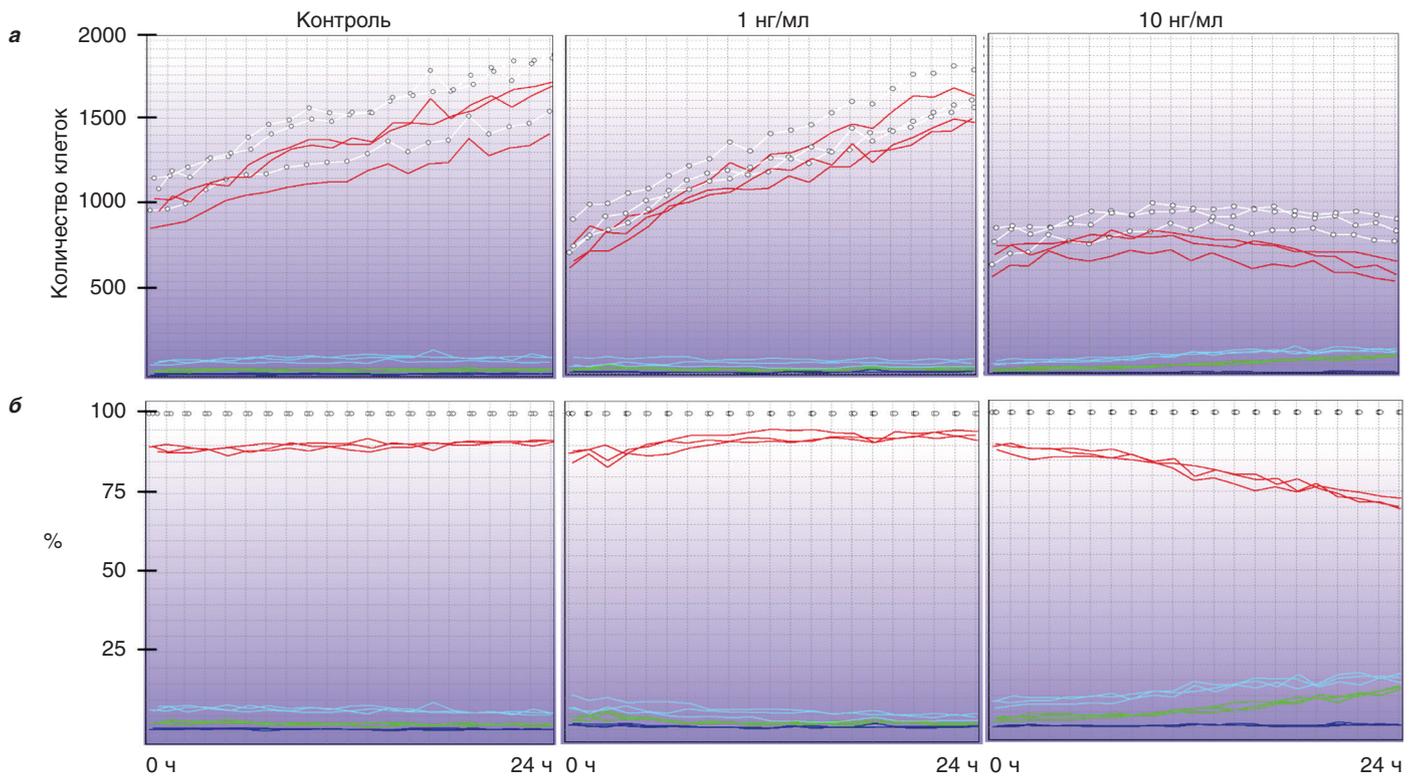


Рис. 4. Изображения динамики роста культуры эмбриональных фибробластов крысы в течение 24 ч при воздействии Т-2-токсина, полученные с помощью программы Cell-IQ Analyser: а – динамика изменения абсолютных значений количества клеток при воздействии указанных концентраций токсина; б – динамика изменения количества клеток в разном физиологическом состоянии относительно общего количества клеток, принятого за 100%. Обозначения: точки, соединенные светлой линией, – общее количество клеток, красная линия – стабильные клетки, голубая линия – клетки, имеющие морфологические отклонения от нормы, синяя линия – делящиеся клетки, зеленая линия – мертвые клетки.

теля, поглощенного живыми клетками. Показана линейная зависимость между OD красителя и количеством живых клеток [9, 10]. На основании вышеуказанной зависимости снижение показателя OD свидетельствует об увеличении цитотоксичности. Однако не всегда изменение OD красителя после воздействия отражает снижение жизнеспособности (гибель) клеток. Это может быть результатом снижения пролиферативной активности культуры (цитостатический эффект) либо изменения проницаемости мембраны для красителя. Так, в предыдущих исследованиях при изучении цитотоксичности проксанола-268 методом NRU мы наблюдали стимуляцию пролиферативной активности крысиных эмбриональных фибробластов в 1,5 раза. Использование прибора Cell-IQ показало, что пролиферации культуры не происходит. Наблюдаемый эффект, вероятно, может быть связан с увеличением проницаемости мембраны и изменением транспорта красителя в клетку. Влияние исследуемого вещества на результат оценки цитотоксичности наблюдали и другие авторы при изучении действия нанотрубок на клетки методом МТТ [14, 15].

Достоинства прибора Cell-IQ очевидны, однако имеются некоторые ограничения в его применении. Так, его нельзя использовать для суспензионных культур клеток. Морфологические особенности некоторых монослойных культур (например, плотное расположение клеток такой культуры как НерG2) приводят к тому, что программа не может распознавать отдельные клетки. Однако данную проблему можно решать с помощью флуоресцентной техники (напри-

мер, окрашивая ядра клеток), что позволяет осуществлять наличие в приборе флуоресцентного модуля.

Таким образом, выполненное исследование показало, что данные, полученные с помощью прибора Cell-IQ и программы Analyser, сопоставимы с методом визуального подсчета клеток. Программа с достаточно высокой точностью распознает клетки, что позволяет использовать прибор для оценки цитотоксичности различных токсикантов и более подробного изучения производимых ими эффектов. Также следует подчеркнуть, что выводы о сопоставимости сравниваемых методов сделаны с использованием двух разных модельных систем (первичные крысиные фибробласты и постоянная раковая линия человека, два не схожих с химической точки зрения соединения – микотоксин Т-2 и углеродные нанотрубки). Это подтверждает возможность универсального применения прибора и прилагаемого программного обеспечения в исследовании цитотоксичности веществ различной химической природы. В настоящее время Cell-IQ используется в исследованиях по онкологии [18–21]. Результаты выполненного исследования свидетельствуют о том, что прибор Cell-IQ и программное обеспечение Analyser могут с успехом применяться в токсикологии *in vitro*.

Автор статьи выражает признательность коллегам из ФГБУН Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, принявшим плодотворное участие в выполнении и обсуждении результатов данной работы.

## Литература/References

1. Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R, Luch A. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch Toxicol.* 2011;85:841-858. DOI: 10.1007/s00204-011-0718-x.
2. Min Z, Wang L, Jin J, Wang X, Zhu B, Chen H, Cheng Y. Pyrroloquinoline quinone induces cancer cell apoptosis via mitochondrial-dependent pathway and down-regulating cellular Bcl-2 protein expression. *J Cancer.* 2014 Jul 29;5(7):609-24. DOI: 10.7150/jca.9002
3. Narkilahti S, Rajala K, Pihlajamäki H, Suuronen R, Hovatta O, Skottman H. Monitoring and analysis of dynamic growth of human embryonic stem cells: comparison of automated instrumentation and conventional culturing methods. *Biomedical engineering online.* 2007;6(1):11.
4. Wang L, Zhang V, Jin M, Bai C, Wang X. Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: An involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway. *J Cell Physiol.* 2012 Jan;227(1):35-43. DOI: 10.1002/jcp.22722
5. Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology.* 1963;17(2):299-313.
6. Huttunen TT, Sundberg M, Pihlajamäki H, Suuronen R, Skottman H, Äänismaa R, Narkilahti S. An automated continuous monitoring system: a useful tool for monitoring neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cell Studies.* 2011;1(1):10.
7. Toimela T, Tahti H, Ylikomi T. Comparison of an automated pattern analysis machine vision time-lapse system with traditional endpoint measurements in the analysis of cell growth and cytotoxicity. *Altern Lab Anim.* 2008 Jul;36(3): 313-25.
8. Zheng Y, Chen X, Qian M, Zhang M, Zhang D, Bai C, Wang X. Human lung telocytes could promote the proliferation and angiogenesis of human pulmonary microvascular endothelial cells in vitro. *Mol Cell Ther.* 2014 Feb 1;2:3. DOI: 10.1186/2052-8426-2-3
9. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985 Feb-Mar;24(2-3):119-24.
10. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro.* 1988; 2(1):1-6.
11. Snyder WE, Qi H. *Machine vision.* Cambridge University Press. 2010.
12. Bahnson A, Athanassiou C, Koebler D, Qian L, Shun T, Shields D, et al. Automated measurement of cell motility and proliferation. *BMC Cell Biology.* 2005;6(1):19. DOI: 10.1186/1471-2121-6-19
13. Wei N, Flaschel E, Friehs K, Nattkemper TW. A machine vision system for automated non-invasive assessment of cell viability via dark field microscopy, wavelet feature selection and classification. *BMC Bioinformatics.* 2008 Oct 21; 9:449. DOI: 10.1186/1471-2105-9-449
14. Meindl C, Absenger M, Roblegg E, Fröhlich E. Suitability of cell-based label-free detection for cytotoxicity screening of carbon nanotubes. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:564804. DOI: 10.1155/2013/564804
15. Shvedova AA, Kagan VE. The role of nanotoxicology in realizing the 'helping without harm' paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. *J Intern Med.* 2010 Jan;267(1):106-18. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02188.x
16. Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2002;11(3):309-20.
17. Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano letters.* 2006;6(6):1261-8. DOI: 10.1021/nl060177c
18. Shi L, Wang L, Wang B, Cretoiu SM, Wang Q, Wang X, Chen C. Regulatory mechanisms of betacellulin in CXCL8 production from lung cancer cells. *J Transl Med.* 2014 Mar 16;12:70. DOI: 10.1186/1479-5876-12-70
19. Zhu K, Pan Q, Jia LQ, Dai Z, Ke AW, Zeng HY, et al. MiR-302c inhibits tumor growth of hepatocellular carcinoma by suppressing the endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells. *Sci Rep.* 2014 Jul 16;4:5524. DOI: 10.1038/srep05524
20. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res.* 2010 Apr 15;316(7):1271-81. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.026
21. Luo Z, Yu G, Lee HW, Li L, Wang L, Yang D, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces autophagy and apoptosis to suppress liver cancer cell growth. *Cancer Res.* 2012 Jul 1;72(13):3360-71. DOI: 10.1158/0008-5472.CCR-12-0388

## Ученые следят за секретной внутренней жизнью бактерий

На протяжении многих лет ученые считали, что бактерии не имеют внутренних структур и в основном являются «мешками ферментов». Группа исследователей описали богатую коллекцию таинственных структур и отделений внутри бактерий. Никто не знает функции этих конструкций, но они, по-видимому, важны для бактерий, раз они тратят столько энергии на их создание.

Другая группа ученых представляет первый «атомный взгляд» на полный бактериальный микрокомпартмент. Эти образования представляют собой белковые оболочки, которые используют бактерии для сохранения определенных химических реакций отдельно от остальной части клетки. Знание того, как собирается микрокомпартмент, может иметь важные применения в биотехнологии и медицине. Многие исследователи работают над созданием микрокомпартментов для производства лекарств, промышленных химикатов или биотоплива.

Исследователи, возглавляемые структурным биологом Шерил Керфельд, использовали комбинацию рентгеновской кристаллографии и криоэлектронной микроскопии для изучения микрокомплексов из бактерии *Haliangium ochraceum* и ответа на эти вопросы.

*Scientists spy on the secret inner life of bacteria. Science News [Electronic resource].*  
URL: <https://www.sciencenews.org/article/scientists-spy-secret-inner-life-bacteria?mode=topic&context=93&tgf=nr>  
(accessed: 07.07.2017).