



**Отчет о работе  
лаборатории клеточных культур  
ЦНИЛ в 2020-2021 гг.**

# Контактная информация



**Адрес**

Г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 45/1,  
Ориентир-виварий БГМУ

8 (917) 75-46-745

Данилко Ксения Владимировна

**Телефон**

**E-mail**

lab.bsmu@gmail.com  
kse-danilko@yandex.ru

пн.-пт. 9.00-17.00

**Время  
работы**



# Сотрудники

Руководитель  
с.н.с.

к.б.н., доцент, Данилко Ксения Владимировна

Шут Екатерина Андреевна

М.н.с.

С.н.с.

Биккузин Тимур Ильдусович

Зарипова Расима Мазгаровна  
частичное участие в работе

Ст. лаб.

# Гранты



- 1. Грант РФФИ с ИМех УФИЦ РАН: «Многофазная модель активной миграции раковых клеток». Завершен.
- 2. Грант РФФИ с УФИЦ РАН и Абхазией: «Молекулярно-генетическое исследование долгожительства в Республике Башкортостан и Абхазии: сравнительный анализ в эколого-географическом и этническом аспектах.». Завершен.
- 3. Грант РФФИ с УГАТУ: «Разработка наноструктурных титановых имплантатов с биоактивными и антибактериальными композитными покрытиями для стоматологии и челюстно-лицевой хирургии». Продолжается.
- Договор на проведение НИР: «Оценка биологического действия имплантатов дентальных внутрикостных винтовых. Исследование на цитотоксичность» на сумму 59796 рублей

# Сотрудничество



## Международное.

- Кжышковска Юлия Георгиевна. Германия, г. Мангейм, Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет Мангейма, Университет Гейдельберга.

## С российскими организациями.

1. УФИЦ РАН: Институт Механики, Институт биохимии и генетики, Институт нефтехимии и катализа,
2. ФГБОУ ВО УГАТУ,
3. ФБУН "Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»

# Сотрудничество внутри БГМУ



- Урологии с курсом ИДПО (статья WoS, Scopus)
- Кафедра неврологии ИДПО (патент)
- Кафедра акушерства и гинекологии №2 (статья WoS, Scopus)
- Кафедра факультетской педиатрии с курсами педиатрии, неонатологии и симуляционным курсом ИДПО (статья ВАК)
- Кафедра терапевтической стоматологии с курсом ИДПО



# Публикации

1. Biofunctionalization of PEO coatings on titanium implants with inorganic and organic substances / E. V. Parfenov, L. V. Parfenova, V. R. Mukaeva [et al.] // *Surface and Coatings Technology*. – 2020. – Vol. 404. – P. 126486. – DOI 10.1016/j.surfcoat.2020.126486. (Scopus, WoS, Q1)
2. Biocompatible organic coatings based on bisphosphonic acid RGD-derivatives for PEO-modified titanium implants / L. V. Parfenova, E. S. Lukina, Z. R. Galimshina [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – No 1. – P. 229. – DOI 10.3390/molecules25010229. (Scopus, WoS)
3. The relationship of the immune response mediator genes' polymorphic variants with the methotrexate efficacy in juvenile idiopathic arthritis / L. Sh. Nazarova, K. V. Danilko, V. A. Malievsky [et al.] // *Turkish Journal of Medical Sciences*. – 2020. – Vol. 50. – No 4. – P. 1038-1047. – DOI 10.3906/sag-1910-96. (Scopus, WoS)
4. Экспериментальное изучение миграции раковых клеток в двухуровневом микрожидкостном устройстве / А. А. Рахимов, А. Т. Ахметов, А. А. Валиев [и др.] // *Многофазные системы*. – 2020. – Т. 15. – № 1-2. – С. 81. – DOI 10.21662/mfs2020.2.



# Публикации

5. Аквапорин 3 в опухолевой ткани больных раком мочевого пузыря / В. Н. Павлов, К. В. Данилко, Л. М. Кутляров [и др.] // Урология. – 2020. – № S5. – С. 215.
6. Применение стромально-васкулярной фракции из аутологичной жировой ткани при стрессовом недержании мочи у мужчин / С. Ю. Максимова, В. Н. Павлов, А. О. Папоян [и др.] // Урология. – 2020. – № S5. – С. 287-288.
7. Способ диагностики степени тяжести ишемического инсульта. Новикова Л.Б., Минибаева Г.М., Данилко К.В. Патент на изобретение RU 2712105 С1, 24.01.2020. Заявка № 2019110505 от 08.04.2019.



# Подготовка кадров



- Сотрудник Биобанка - Калимуллина Лилия Ильдаровна
- Студент гр. Л417б. - Халиков Руслан Ринатович

# Организация работы Биобанка



1. Оборудование ЛКК (центрифуги 2 шт., дозаторы, магнитный штатив, микроскоп) переданы в Биобанк для организации сбора биоматериала у пациентов с COVID-19 на базе Клиники БГМУ.
2. Организован сбор биоматериала, разработаны протоколы его первичной обработки

Собрано биоматериала, образцов	Изолировано из крови или тканей , образцов
плазмы – 619	моноциты крови – $39+41=80$
сыворотки – 657	геномной ДНК – $528+146=674$
мочи – 401	РНК из аутопсий – 28
	РНК из мочи – 28

# Текущие исследования COVID19



- Комплексное исследование органов и тканей у пациентов с COVID19 тяжелого течения.
- Исследование молекулярного патогенеза COVID19 у больных с различным клиническим течением.
- Исследование механизмов острого почечного повреждения у пациентов с COVID19.

# Текущие исследования



- Роль аквапоринов, как маркеров распространения и метастазирования опухолей мочеполовой системы. Кутлияров Л.М. (Анализ экспрессии генов аквапоринов в ткани мочевого пузыря, ИГХ – анализ образцов тканей с РМП)
- Поиск диагностических и прогностических маркеров экстракапсулярного распространения и метастазирования рака предстательной железы на основе анализа компонентов микроокружения. (ИГХ – анализ образцов тканей с РПЖ)

# Культуральные методы



## Работа с клетками

Культивирование постоянных клеточных линий животных и человека  
(в коллекции 4 линии нормальных клеток, 15 линий опухолей)

Получение первичных культур клеток животных и человека

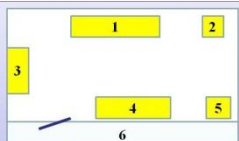
Оценка цитотоксичности химических соединений и материалов

(МТТ-тест, жизнеспособность, апоптоз клеток, клеточный цикл и др.)

### Внедренные методики:

1. Изоляция моноцитов периферической крови человека с помощью технологии MACS
2. Изоляция и культивирование ММСК из жировой ткани человека.
3. Остеогенная, адипогенная и хондрогенная дифференцировка ММСК из жировой ткани.
4. Изоляция и культивирование ММСК из пульпы зуба.

Схема организации помещения культурального бокса



- 1 - ламинар II класса биологической безопасности
- 2 - CO<sub>2</sub>-инкубатор
- 3 - шкаф с посудой и пластиком для культуральных работ
- 4 - стол с инвертированным световым микроскопом
- 5 - холодильник с культуральными средами и реагентами для клеточных работ
- 6 - предбоксик с рабочей одеждой

# Цитофлуориметрические исследования



Исследование субпопуляций клеток в суспензии

Анализ единичных клеток или частиц

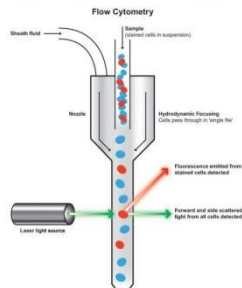
Оценка пролиферативной активности клеток

Оценка содержания аналитов (цитокинов и др.) в биологических жидкостях: плазме, сыворотке, слюне и т.п.

## Внедренные методики:

1. Анализ чистоты популяции моноцитов крови клеток после положительного магнитного сортирования по CD14-маркеру.
2. Анализ чистоты и субпопуляционного состава свежеизолированных и культивированных ММСК из жировой ткани человека.

## Принцип проточной цитометрии



# Микроскопический анализ



Флюоресцентная  
(люминесцентная)  
микроскопия  
(макс. x 630)

Прямой и  
инвертированный  
микроскопы

Микроскопия  
в светлом поле  
(макс. X 1000)  
Фазово-  
контрастная  
микроскопия  
(макс. x 630)

Фото и видео  
регистрация  
изображений  
Функция Time lars -  
через заданные  
промежутки времени



# Молекулярные методы. ДНК







# Молекулярные методы. РНК

## Экстракция РНК

Фенольно-хлороформная (Trizol, ExtractRNA)

Стабилизация ДНК и РНК замораживанием или в стабилизаторе

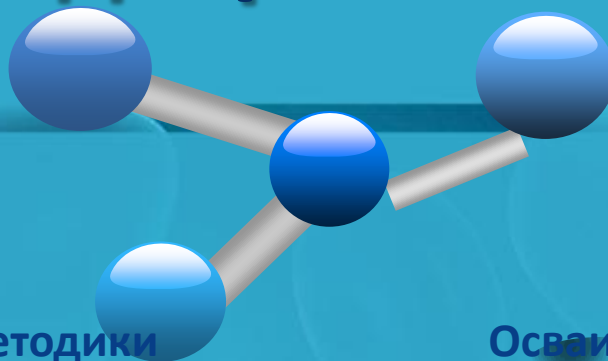
Очистка на микроцентрифужной колонке (внеклеточной, внутриклеточной, или вирусной РНК)

### Внедренные методики:

1. Изоляция РНК из мононуклеаров периферической крови человека
2. Изоляция РНК из гомогенатов тканей человека
3. Изоляция вирусной РНК из мочи
4. Изоляция вирусной РНК из сыворотки крови



# Методы работы в ЛКК



## Внедренные методы и методики

1. Детекция однонуклеотидных полиморфизмов
2. Детекция известных мутаций
3. Анализ экспрессии отдельных генов
4. Анализ уровня микроРНК
5. Магнитный сортинг клеток
6. Иммунофенотипирование и подсчет клеток
7. Иммуногистохимический анализ
8. Методы культивирования клеток
9. Методы криохранения

## Осваиваемые методы

1. Анализ ДНК-комет
2. Иммунологический анализ (исследование количества антител, гормонов, ферментов, антигенов и др. в биологических средах)
3. Вестерн-блоттинг

# Оборудование










	<p><b>Проточный цитометр, оборудованный системой для сортировки клеток S3, Bio-Rad (США)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>2 лазера (488 и 561 нм)</li> <li>4 флуоресцентных детектора</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Сортировка клеток, экспрессирующих флуоресцирующие белки, такие как GFP, dsRed, mCherry;</li> <li>Сортировка клеток, меченных флуоресцентными маркерами, такими как FITC, PE и PE-танделы, APC и APC-танделы, и другими флуорофорами.</li> </ul>		<p><b>CO<sub>2</sub> и инкубатор MCO-19AIC, Sanyo (Япония)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>внутренний объем - 170 л</li> <li>воздушная рубашка</li> <li>диапазон от +5°C до 50°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Применяется для создания специфических условий при выращивании и хранении клеток, тканей, биологических проб.</li> </ul>
	<p><b>Микроскоп инвертированный для лабораторных исследований Axio Observer.D1, Carl Zeiss (Германия)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>полу-моторизованный штатив</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Возможность реализации методов контрастирования и исследования как светлое и темное поле, поляризация, люминесценция и дифференциально-интерференционный контраст (DIC, PlasDIC), фазовый +/- анализ.</li> </ul>		<p><b>Горизонтальный низкотемпературный морозильник MDF-193, Sanyo (Япония)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>диапазон: от -50°C до -86°C</li> <li>объем камеры: 86 л</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Предназначен для хранения образцов и материалов, требующих стабильной низкой температуры.</li> </ul>
	<p><b>Амплификатор в реальном времени StepOnePlus, Applied Biosystems (США)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP);</li> <li>Анализ транслокаций;</li> <li>Анализ экспрессии генов;</li> <li>Экспрессия микроРНК.</li> </ul>		<p><b>Микроскоп световой инвертированный Telaval 31, Carl Zeiss (Германия)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Позволяет работать с основными методами контрастирования для широкого спектра лабораторных задач.</li> </ul>
	<p><b>Прибор для измельчения и гомогенизации биологических образцов Precellys-24 Dual, Bertin Technologies (Франция)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Быстрая и эффективная экстракция ДНК/РНК/белков из тканей млекопитающих;</li> <li>Выделение лекарственных метаболитов из тканей человека и лабораторных животных;</li> <li>Гомогенизация таких твердых материалов как кости, волосы, замороженные ткани.</li> </ul>		<p><b>Автоматический счётчик клеток TC20™, BIO-RAD (США)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Позволяет проводить полностью автоматический подсчёт количества клеток в эукариотических культурах;</li> <li>Способен дифференцировать живые и мёртвые клетки с использованием красителя трипанового синего и показывать соотношение их количества.</li> </ul>
	<p><b>Микроспектрофотометр NanoPhotometer™ P-330, Implen (Германия)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>диапазон длин волн: 190-1100 нм</li> <li>сверхмалые объемы образцов (от 0,3 мкл)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Применяется для анализа концентрации нуклеиновых кислот и белков, скорости роста бактерий, кинетики реакции, а также он необходим при подготовке образцов для микроциповых систем и NGS секвенаторов.</li> </ul>		<p><b>Стационарный РН-метр/милливольтметр/термометр HI 2211, Hanna Instruments (Германия)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>диапазон измерения ед. рН: от -2,00 до 16,00 рН</li> <li>диапазон измерения мВ: ± 399,9 мВ; ± 2000 мВ</li> <li>диапазон измерения температуры: от -20 до 120°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Позволяет измерять рН и концентрацию ионов (ISE) и окислительно-восстановительный потенциал в мВ.</li> </ul>

# Оборудование








	<p><b>Микроцентрифуга MiniSpin® Plus, Eppendorf (Германия)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>максимальная скорость вращения: 14500 об/мин</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Используется для разделения смесей и растворов на их составляющие посредством высокочастотного вращения ротора.</li> </ul>
	<p><b>Центрифуга многофункциональная 5804 R, Eppendorf (Германия)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>скорость вращения от 200 об/мин до 14 000 об/мин</li> <li>диапазон установки температуры от -9°C до +40°C</li> <li>10 режимов разгона и торможения</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Используется для разделения смесей и растворов на их составляющие посредством высокочастотного вращения ротора.</li> </ul>
	<p><b>Центрифуга лабораторная клиническая ОПН-3, ОАО ТНК «Дастан» (Россия)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>скорость вращения ротора: 1000/1500/3000 об/мин</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Используется для разделения смесей и растворов на их составляющие посредством высокочастотного вращения ротора.</li> </ul>
	<p><b>Термостат программируемый четырехканальный ТП4-ПЦР-01-«Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Предназначен для проведения и регистрации результатов ПЦР при использовании тест-систем, основанных на принципах флуоресцентной детекции.</li> </ul>
	<p><b>Термостат электрический суховоздушный ТС-1/80 СПУ, ОАО «Смоленское СКТБ СПУ» (Россия)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Предназначены для получения и поддержания внутри рабочей камеры высокостабильной температуры, необходимой для проведения различных видов исследований.</li> </ul>
	<p><b>Весы прецизионные Pioneer™ PA2102, Ohaus (США)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Предел взвешивания – 2100 г</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Для выполнения ежедневных операций взвешивания веществ и материалов.</li> </ul>

	<p><b>Весы лабораторные Scout® Pro SPS601F, Ohaus (США)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Предел взвешивания – 600 г</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Для выполнения ежедневных операций взвешивания веществ и материалов.</li> </ul>
	<p><b>Весы миллиграммовые Gemini-20, AWS (США)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Предел взвешивания – 20 г</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Для выполнения ежедневных операций взвешивания веществ и материалов.</li> </ul>
	<p><b>Камера для горизонтального электрофореза SE-2, ООО «НПО Биоклон» (Россия)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Предназначена для разделения до 120 образцов</li> </ul>
	<p><b>Транслюминатор TCP-20 MC, Viber Lourmat (Франция)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Предназначен для просмотра гелей в видимом и УФ диапазоне.</li> </ul>
	<p><b>Система геля-документирования Gel Imager-2, ООО «НПО Биоклон» (Россия)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Предназначена для ввода в компьютер изображений люминесцирующей ДНК в гелях, окрашенных бромистым этидием и аналогичными по спектральным характеристикам красителями.</li> </ul>
	<p><b>Источник питания «Эльф-8», ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Предназначен для проведения электрофореза нуклеиновых кислот и белков в агарозных и акриламидных гелях.</li> </ul>
	<p><b>Источник питания «Эльф-4», ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Предназначен для проведения электрофореза нуклеиновых кислот и белков в агарозных и акриламидных гелях.</li> </ul>

# Оборудование



	<p><b>Программный замораживатель Planer Kryo 560-16 (Великобритания)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• объем камеры: 16 л</li> <li>• диапазон температур: от +30°C до -180°C</li> <li>• скорость замораживания: от -0,01 до -50°C/мин</li> <li>• контролируемая скорость нагревания: от 0,01 до 10°C/мин</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Уникальная система криоконсервации с возможностью контроля и программирования условий охлаждения до сверхнизких температур различных биологических объектов – костного мозга, стволовых клеток, пуповинной крови, тромбоцитов, эритроцитов, клапанов сердца, клеток кожи, человеческих эмбрионов, яйцеклеток, спермы, вирусов и других биологических образцов.</li> </ul>
	<p><b>Криобиологический сосуд для хранения Locator® Jr. Plus CY50925-70, Thermo Fisher Scientific (США)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Вместимость: 71 л</li> <li>• Диаметр: 559 мм</li> <li>• Высота: 734 мм</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Предназначен для хранения и транспортировки образцов в жидком азоте.</li> </ul>
	<p><b>Сосуд Дьюара для хранения и выдачи жидкого азота LAV 30, MVE (США)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Вместимость: 32 л</li> <li>• Диаметр: 64 мм</li> <li>• Высота: 610 мм</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Предназначен для хранения и выдачи жидкого азота программному замораживателю Planer Kryo</li> </ul>
	<p><b>Сосуд Дьюара СДП-20, ОАО «НПО Гелиймаш» (Россия)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Вместимость: 20 л</li> <li>• Диаметр: 516 мм</li> <li>• Высота: 640 мм</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Предназначен для хранения и транспортировки образцов в жидком азоте.</li> </ul>
	<p><b>Отсасыватель медицинский OM-1, ОАО «Утес» (Россия)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Используется при подготовке образцов для иммунологических и ПЦР-исследований.</li> </ul>

	<p><b>Система получения сверхчистой воды с УФ лампой в комплекте с картриджем и фильтрами Simplicity (SIMSV00EU), Merck Millipore (Франция)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Получение сверхчистой воды (I типа) для различных лабораторных задач.</li> </ul>
	<p><b>Автоматические и механические дозаторы (от 1 до 10 000 мкл)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•</li> </ul>
	<p><b>Бытовые холодильники и морозильники</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Для хранения образцов и материалов</li> </ul>

# Дорогостоящее современное оборудование



- **Проточный цитометр ACEA Novocyte (3 лазера, Novocyte** имеет полностью настраиваемую оптическую схему. Прибор способен обнаруживать до 13 параметров с высокой чувствительностью к флуоресценции и детектируемым размерам. Максимально можно установить до 3-ех лазеров (выбирая из 4-ех доступных вариантов), таким образом обеспечивает высокую степень гибкости. Апгрейд лазерами и фильтрами производится на месте в лаборатории, установку проводит сертифицированный сервисный инженер. Программное обеспечение **NovoExpress®** обеспечивает простой и интуитивно понятный сбор и анализ данных. Автоматизация множества рутинных процедур оптимизирует время работы с прибором. Прибор комплектуется автосемплером **NovoSampler® Pro**, который может автоматически анализировать образцы в отдельных пробирках, штативах или 24-, 48- или 96-луночных планшетах.

# Дорогостоящее современное оборудование



Многофункциональный микропланшетный ридер Spark™ приспособлен для работы с бактериальными и животными клетками, прибор дает возможность проводить долгосрочные инкубации с поддержанием температуры.  
Применение:

- Подсчет клеток и анализ жизнеспособности
- Длительные клеточные исследования
- Абсорбция
- Определение концентрации ДНК
- Интенсивность флуоресценции
- Флуоресценция с разрешением во времени (TRF)
- Флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET)
- Флуоресцентный резонансный перенос энергии с разрешением во времени (TR-FRET)
- Поляризация флуоресценции
- Люминесценция (вспышка и свечение)
- Alpha технология
- Сканирование люминесценции
- Многоцветная люминесценция (BRET1, BRET2™, BRET3, Chroma-Glo™)

# Лаборатория клеточных культур ЦНИЛ



Благодарю за внимание !