

HCS - высокоскоростной скрининг
“Конфокальная микроскопия в
клеточной биологии. Проведение
исследований по нескольким
параметрам в клетках

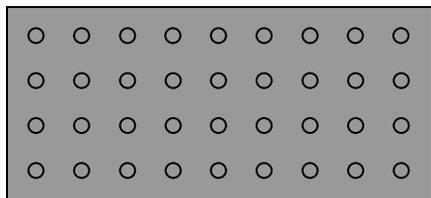
Сергей Евгеньевич Чалов (кхн)
ЗАО “Приборы”

Что скрывается за понятием высокоскоростной скрининг (HCS)?

- Несколько определений было предложено для “HCS”
- Наиболее часто HCS определяется , как
 - “автоматизированный режим микроскопии для захвата и анализа картинок из микропланшета и проведением анализа одного или более параметров клеточного события”
- Высокоскоростной анализ (HCA)
 - Анализ изображений полученных в ходе HCS
 - Необходимо иметь специализированное программное обеспечение
- Многопараметровый анализ (MPA)
 - Выбор соединений при использовании специальных режимов настроек вместо одиночного прочтения
 - Более точный алгоритм подсчета
 - Меньшее количество ошибок
 - Может быть использован в прямом и вторичном скрининге
 - Необходимо проверенное ПО для расчета данных

Что скрывается за понятием высокоскоростной скрининг (HCS)?

96 луночная плашка

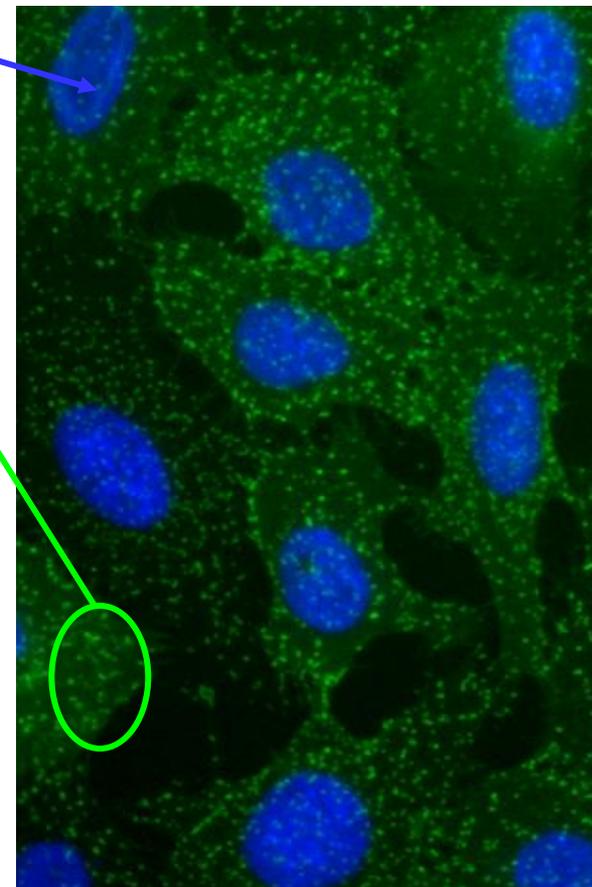


- Метка 1 = DAPI
- Метка 2 = GFP

Микропланшетный ридер

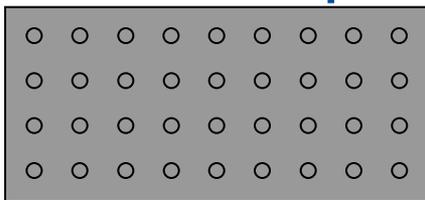
- ➔ Интенсивность DAPI и GFP
- 96 x 2 данные по точкам

Одиночные данные - канал - лунка

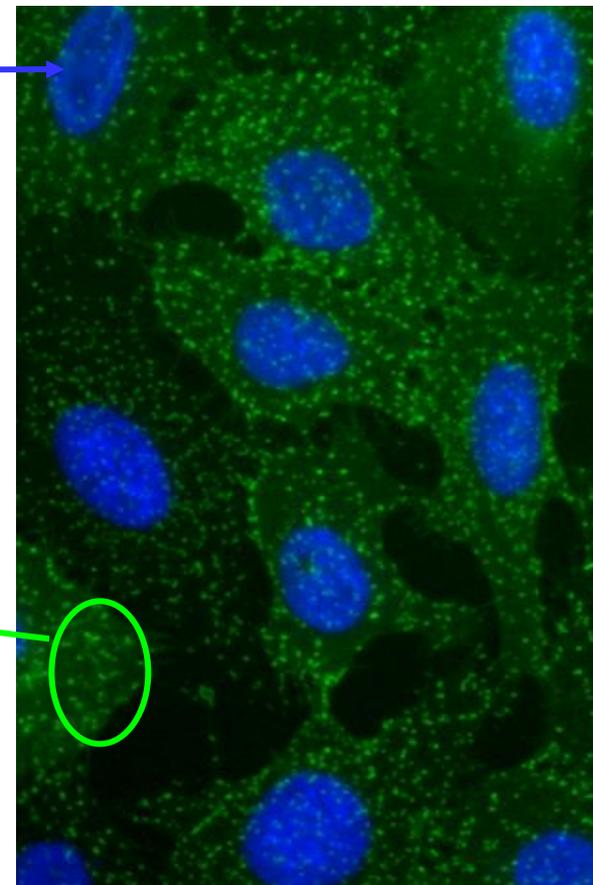


Что скрывается за понятием высокоскоростной скрининг (HCS)?

**96 луночный
планшет**



- **Метка 1**
 - Площадь ядер
 - Среднее значение интенсивности флуоресценции в ядре
 - Суммарная интенсивность флуоресценции в ядре
 - Среднее значение расстояния по оси X
 - Среднее значение расстояния по оси Y
 - другое
- **Метка 2**
 - Количество везикул
 - Среднее значение интенсивности везикул
 - Средний размер везикул
 - Общее количество везикул на клетку
 - другое



Опера → 96 x 2 x 9 данных на точки

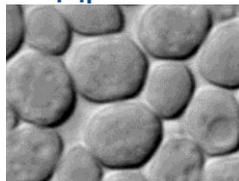
**HCS данные являются мульти-параметрическими
по своей природе**

Основные требования

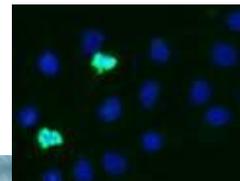
- **Вариативность**

→ Не высокий уровень вложения в стоимость оборудования

Дрожжи



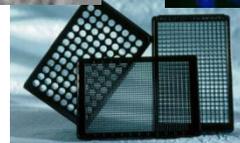
Клеточный цикл



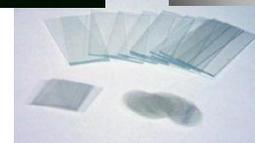
Целые организмы



Планшеты

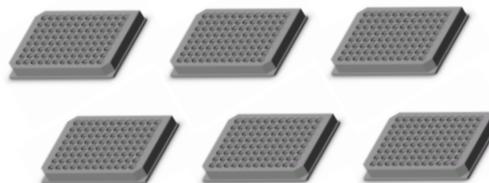


Слайды



- **Скорость**

→ Быстрое получение результатов



Скрининг соединения
n x 384 плашек за день

- **Удобное ПО обеспечение для представления и обсчета данных Powerful**



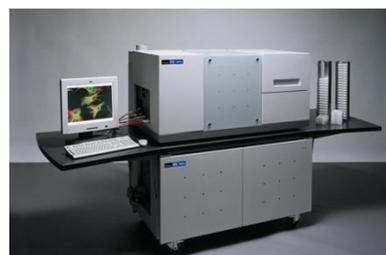
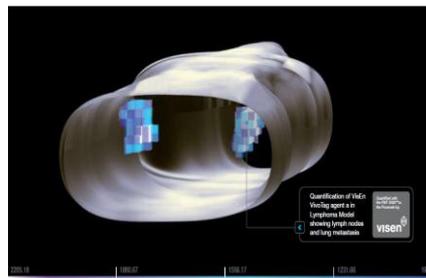
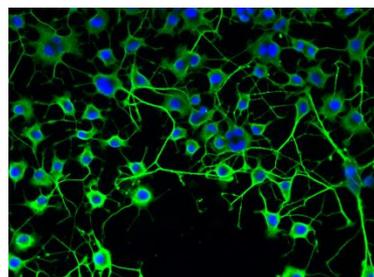
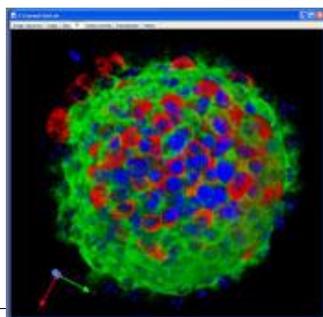
→ Более точная интерпретация результатов и верное принятие решений

КЛЕТКА

ПЛАШКА

ЖИВОТНОЕ

ЧЕЛОВЕК



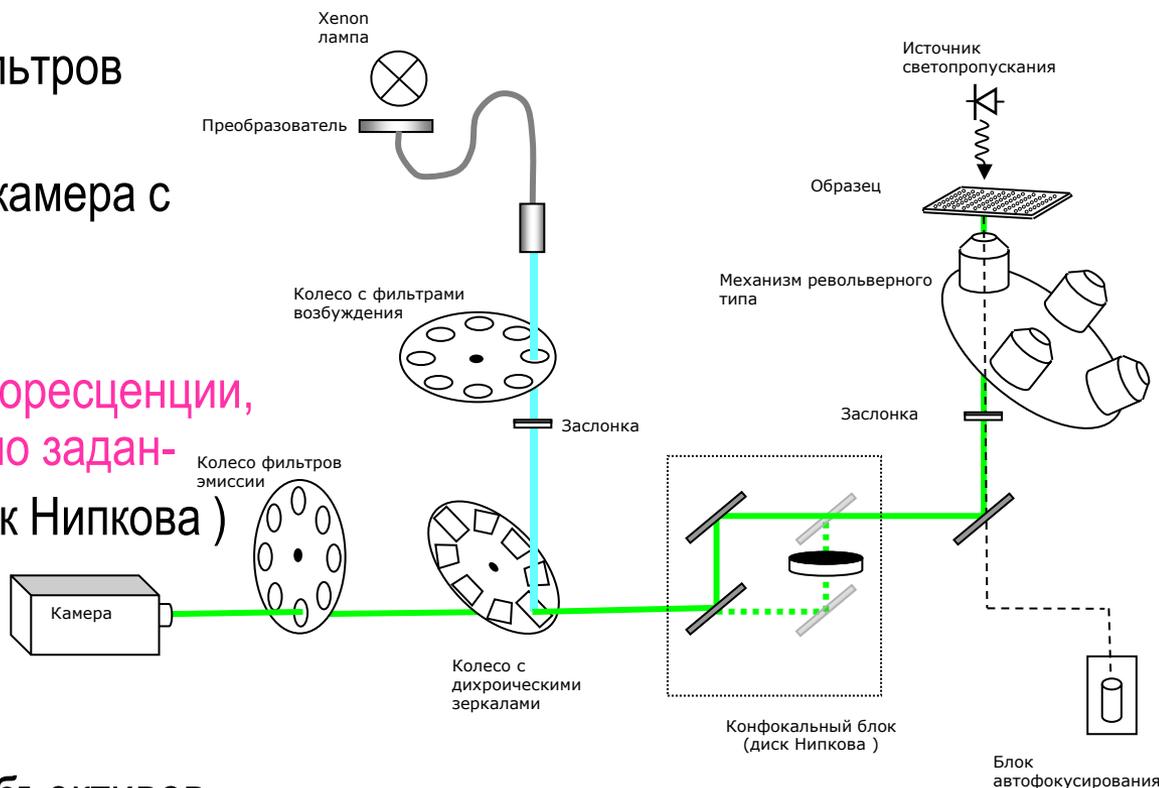
Columbus™



- Автоматизированная система с функцией ері-флуоресценции по 2-м каналам
 - * Широкоугольный обзор
 - * Возможность сканирования по выбранным точкам пространства



- **Хелон-лампа повышенной интенсивности** для возбуждения сигнала флуоресценции (360 – 640 нм)
- Независимые механизмы фильтров возбуждения и эмиссии
- Высоко чувствительная CCD камера с охлаждением
- Широкоугольный формат флуоресценции, конфокальное сканирования по заданным точкам возможность (диск Нипкова)
- Высокоточный, скоростной автофокус
- Кофок. микроскоп (под заказ)
- 4-х позиционное колесо для объективов (2X-100X) увеличением
- Возможность использования доп. источника светопропускания



- ▶ Заменяемые фильтры возбуждения и эмиссии
- ▶ Встроенный термостат для клеток
- ▶ 14 бит Камера для широкого динамического диапазона
- ▶ Широкое поле наблюдения
- ▶ PhenoLOGIC™ – самообучающееся ПО
 - Простое сегментирование и классификация результатов

Последовательность работы на ПО



Установка



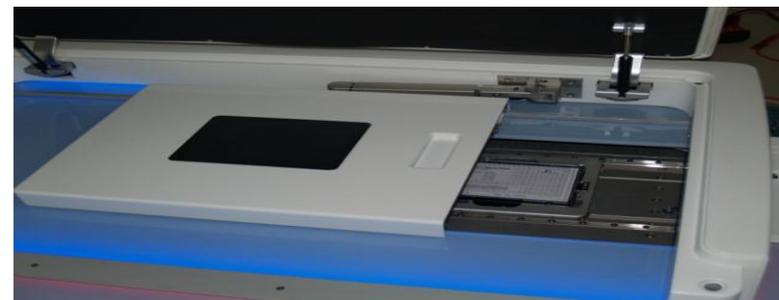
Проведение
Эксперимента



Анализ
результатов



Обработка



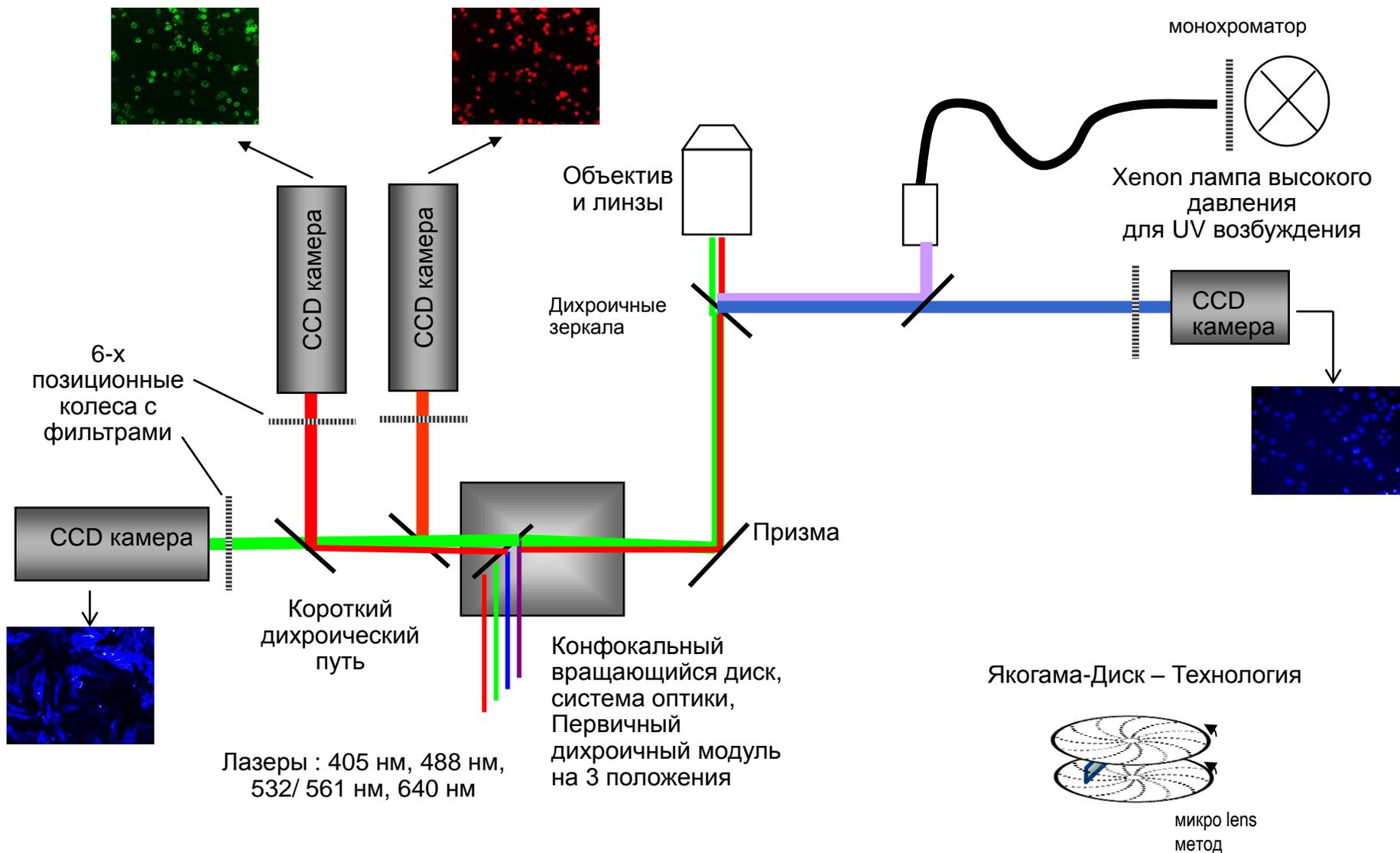
- Инвертированный , **конфокальный, флуоресцентный микроскоп**
- Полностью автоматизированная (моторизованная часть стола и механизма выбора объективов, ...)
- Охлаждающая CCD камера с элементами Пелтье, b/w, 12 бит, 1,3 МВ изображения
- **Возможность использования водных объективов с высоким разрешением (High NA)**
- Лазер с высокой мощностью возбуждения (твердотельные или диодные лазеры)
- **Параллельный анализ данных на ПО Asapella** со сложными алгоритмами
- Хранение / „Meta” анализ данных на серверной платформе Columbus

LX (Largely Xtendable)



QENS (Quadruple Excitation High Sensitivity)





- ▶ Роботизированная интегрированная станция
робот с 5-манипуляторами и “упаковщиком”

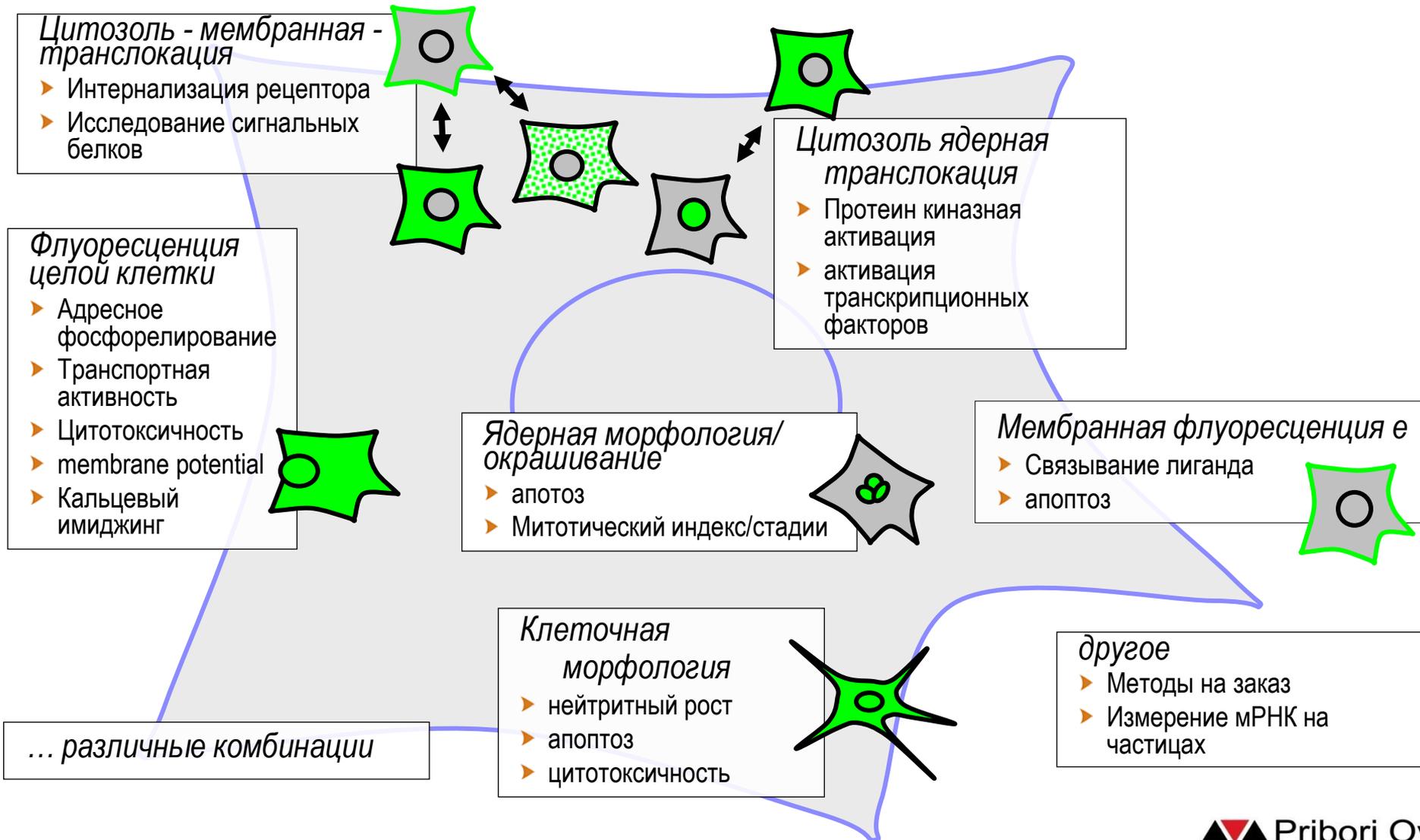


- ▶ Станция для работы с живыми клетками
Opera с инкубационным блоком и FlexDrop
раскапыватель, с автоматической подачей
крышек



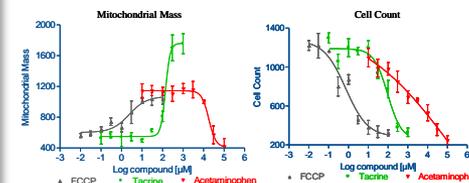
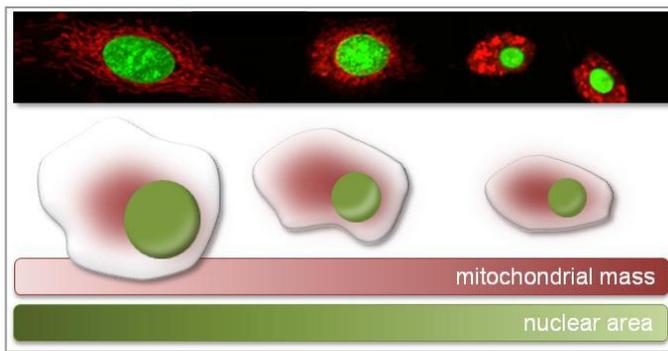
- ▶ Cell::explorer™
Полная система HCS с системой
автоматической подачи, хранением планшетов
устройством по раскапыванию веществ, термо-
блоком для инкубирования, распознающей
системой, мощнейшей системой планшетов и
различными планшетными ридерами





Цитотоксичность

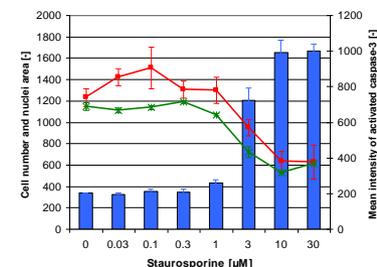
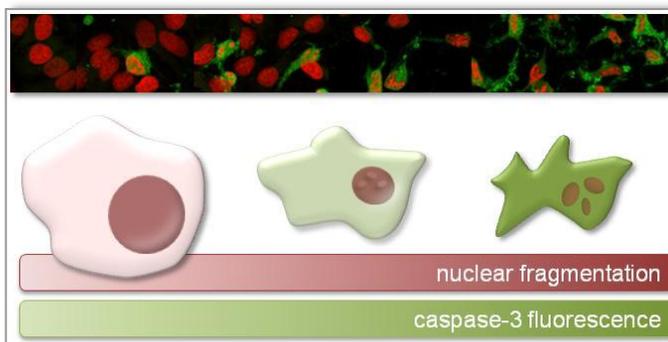
- Подсчет клеток
- Клеточная жизнеспособность
- Размер ядра
- Митохондриальная масса



Митохондриальная масса (левый),
клеточный подсчет (правый)

Апоптоз

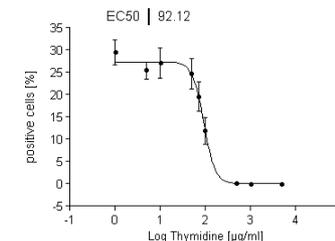
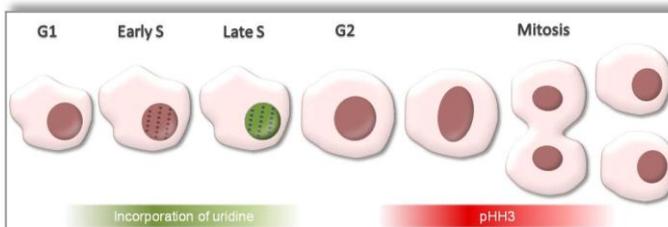
- Подсчет клеток
- Ядерная фрагментация
- Размер ядра
- Caspase-3 активация



Каспазная активность (голубой), число
клеток (красный), размер ядра
(зеленый)

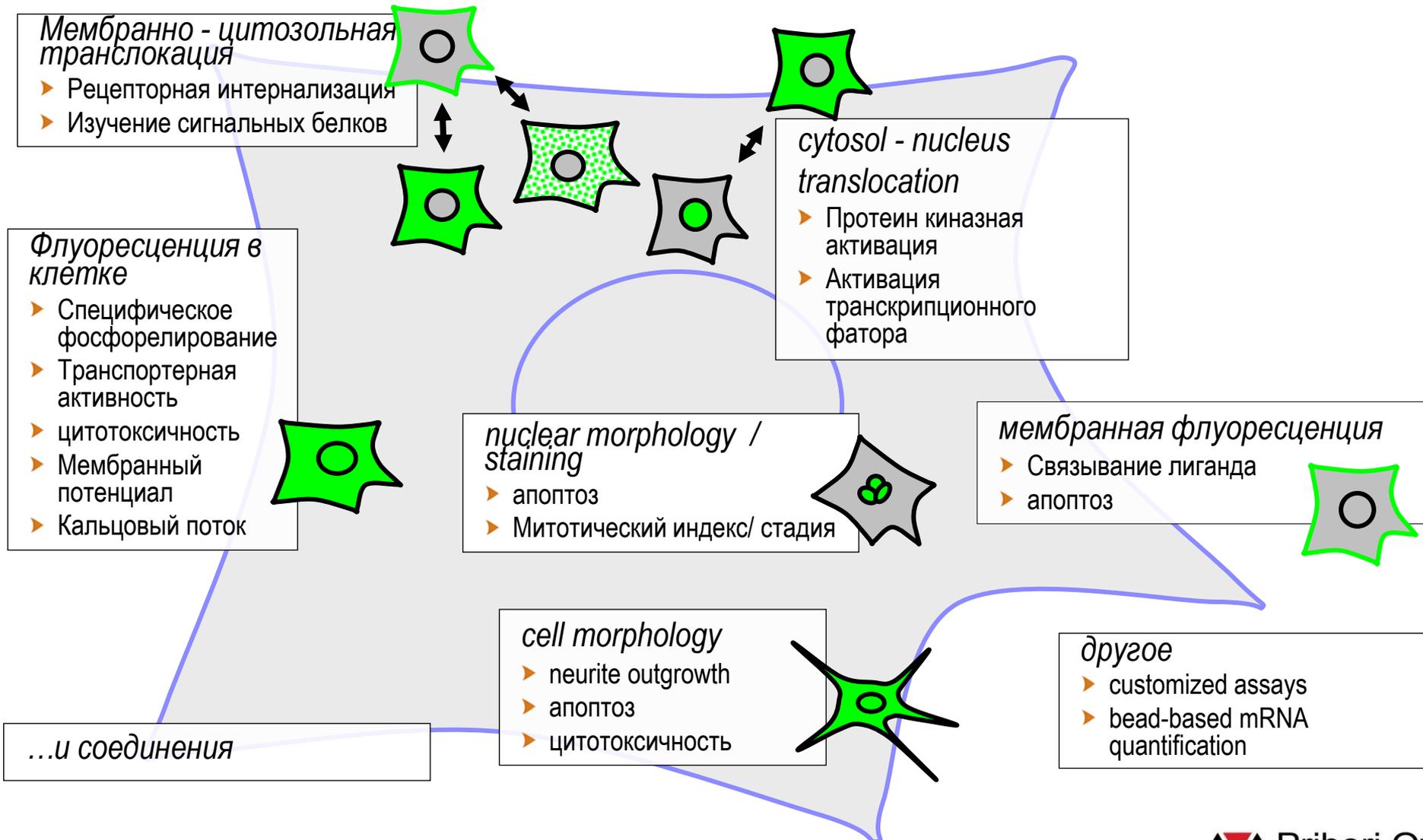
Клеточный цикл

- Митотический индекс
- Клетки в S-фазе
- DNA состав

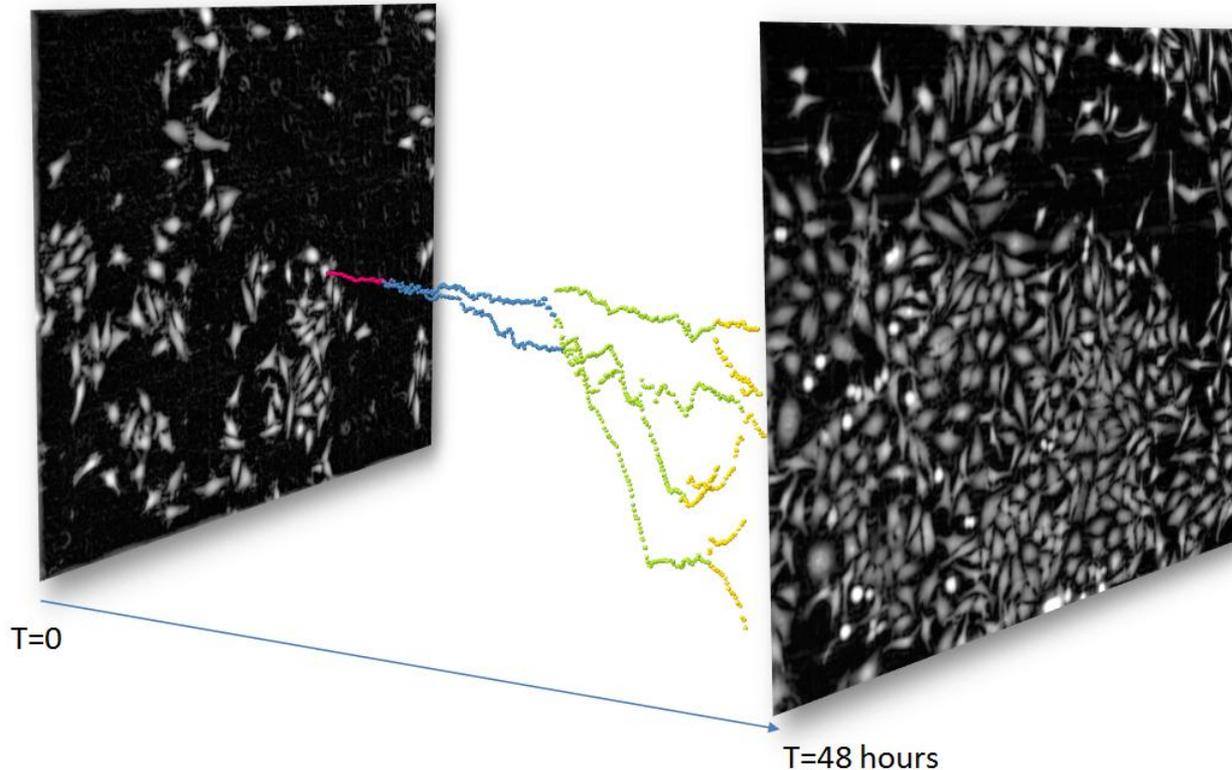


Клетки в S-фазе

и далее ...



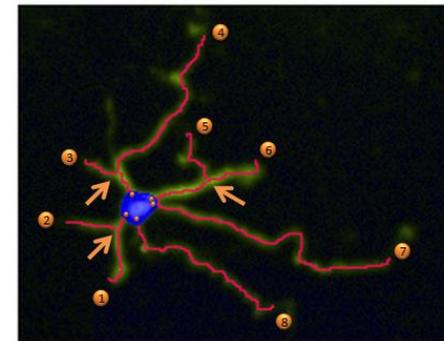
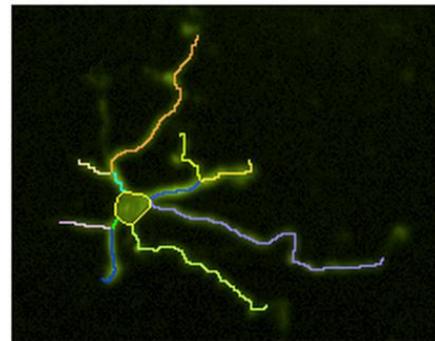
- ▶ Автоматическое отслеживание и анализ движения объектов
- ▶ Работает также с DPC



Tracking of HeLa cells on digital phase image. The track of one cell starting at $T=0$ (red line) is shown over 48 hours. Several cell divisions occur, each color represents a new generation of daughter cells.

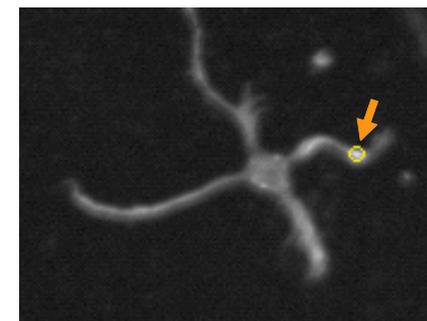
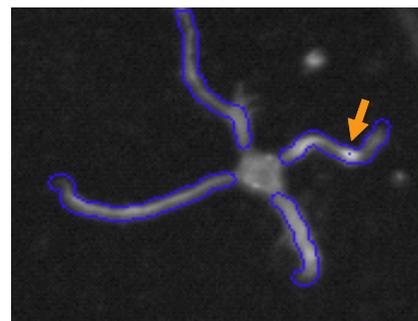
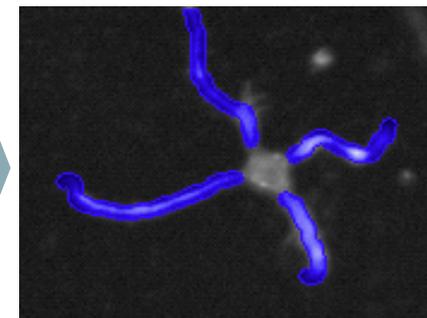
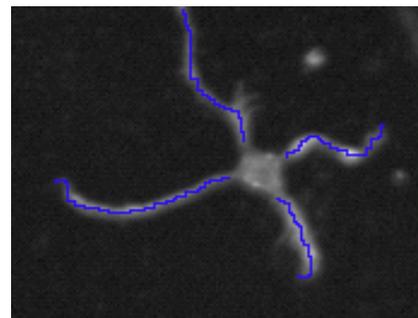
▶ Мощный нейтритный анализ

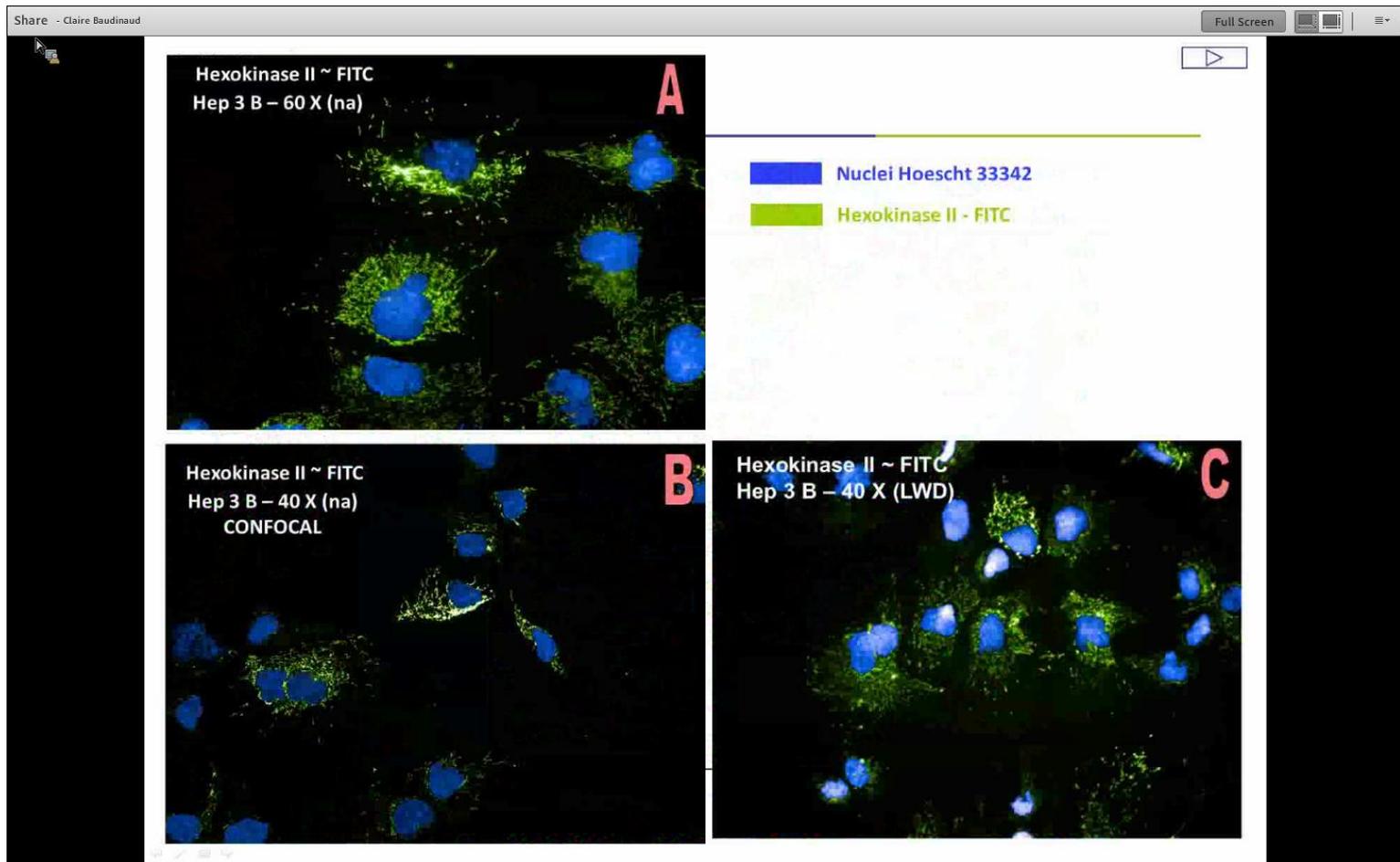
- левой стороне: индивидуальные сегменты (различных цветов)
- Правая сторона: “корни” (кружки), узлы (стрелки) и окончания (номера)

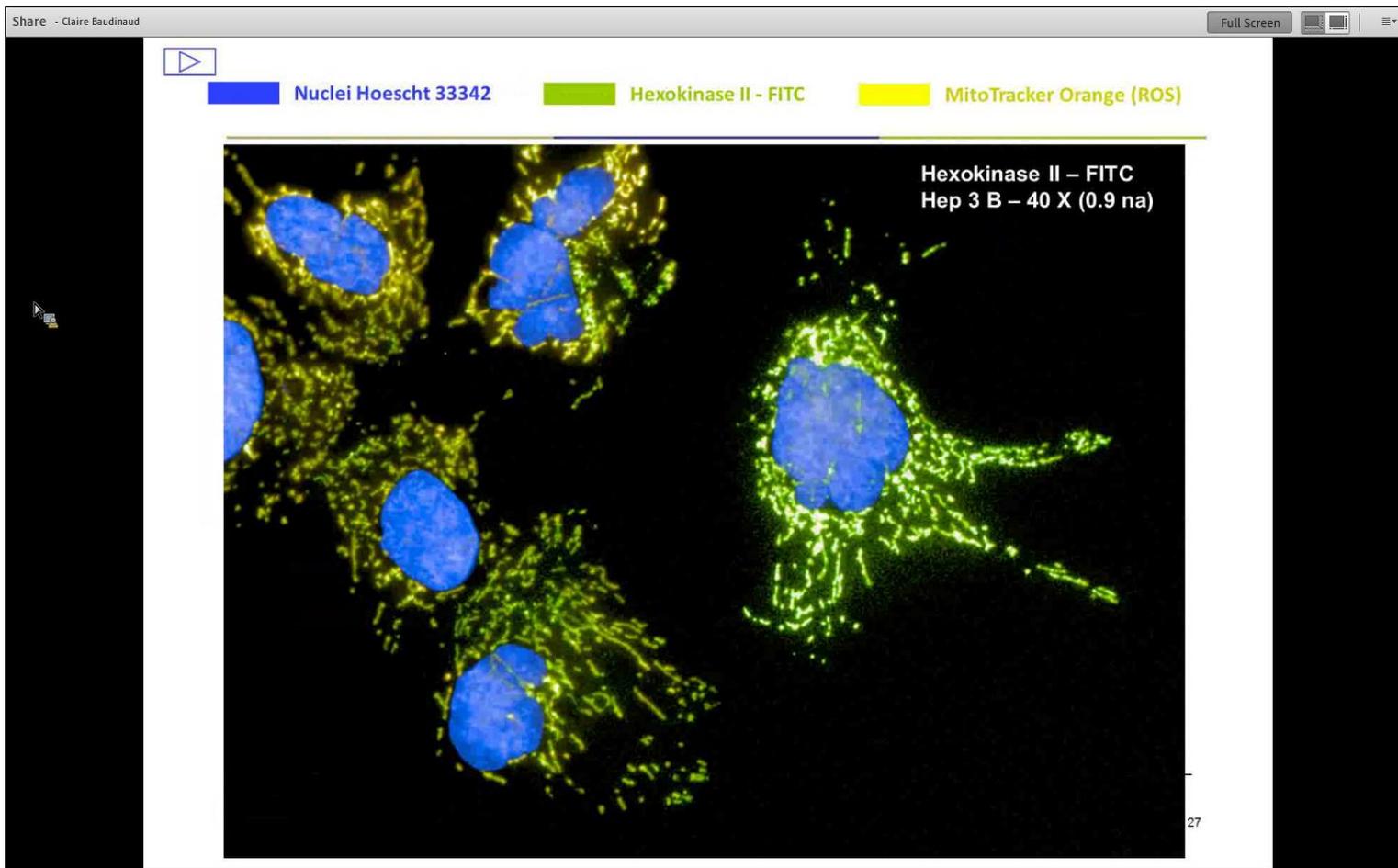


▶ Уникальный колокализационный анализ

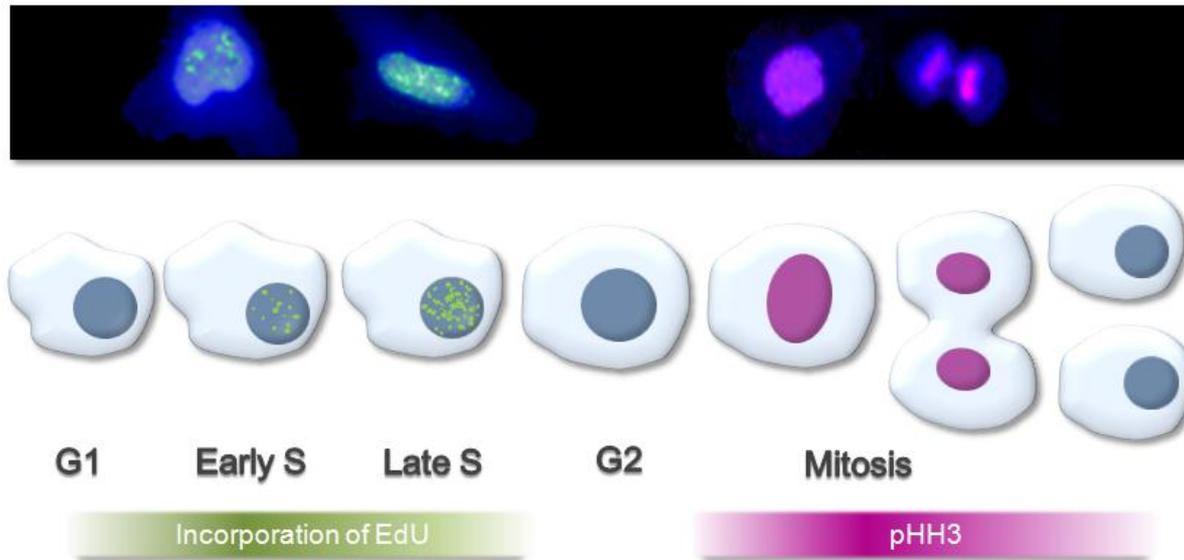
- Аксоны могут быть использованы, в качестве поисковых мест для выявления сигналов, колаколизированных на них ⇔ необходимых для аксонового анализа
- Середина: “маска” созданная из аксонов
- Нижний рисунок : локализация места на аксоне (стрелка)

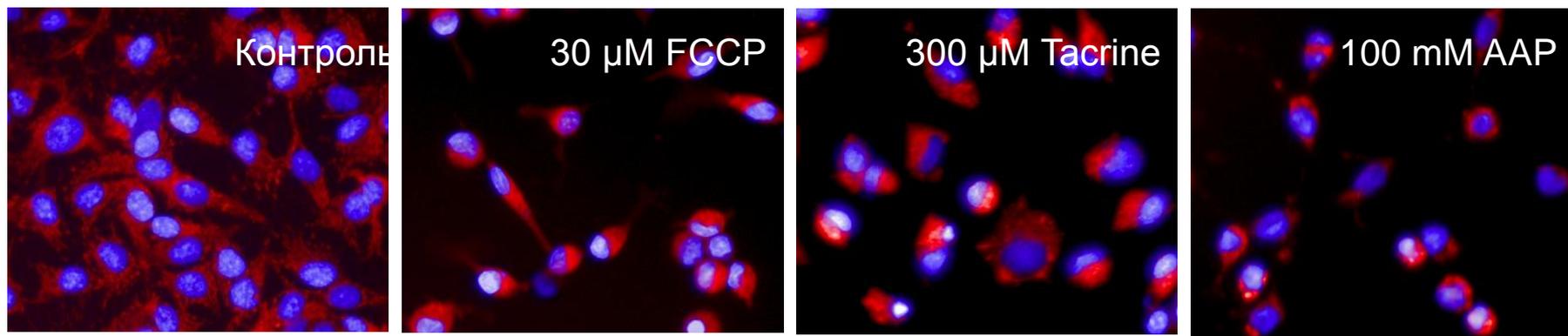






- ▶ Клеточный цикл
 - Киназные клеточные циклы ключевые направления для создания анти раковых методов лечения
 - Functional cellular imaging cell cycle assays can be used for studying on-target and compound side effects on other cell cycle kinases
 - Failures in spindle functions have been linked with tumorigenesis
 - Mitotic spindle formation assay
- ▶ Signal molecule recruitment
 - Signal molecule recruitment using antibodies, translocation
- ▶ Транскрипционные факторы
 - Functional imaging assays based on nuclear receptor translocation between cytosol and nucleus
- ▶ Метастазирование
 - **Key phenotypic cellular imaging assays** for identifying inhibitors of metastatic potential:
 - Цитоскелетная реорганизация
 - Клеточная миграция / cell invasion is another key phenotypic cellular imaging assay





Клеточный подсчет

Мембранная проницаемость у

Митохондриальная масса

Изменения в ядре увеличение/сжатие

Hoechst 33342

BOBO™-3 (не показано), Hoechst 33342

Mitotracker® Deep Red

Hoechst 33342

- 20x long WD объектив, 5 позиций на ячейку
- Иmidжы показывают цитотоксических эффект 3-х токсичных соединений (Carbonyl Cyanide P-(Trifluoromethoxy) Phenylhydrazone, Tacrine и Acetaminophen) на HepG2 клетках
- Воздействие выражается в потере ряда клеток, увеличение проницаемости плазменной мембраны усиливающей биогенезис митохондрии, увеличение митохондриальной массы и уменьшение размера ядра

Оценка безопасности препарата : Не GLP технология с невысокой производительностью

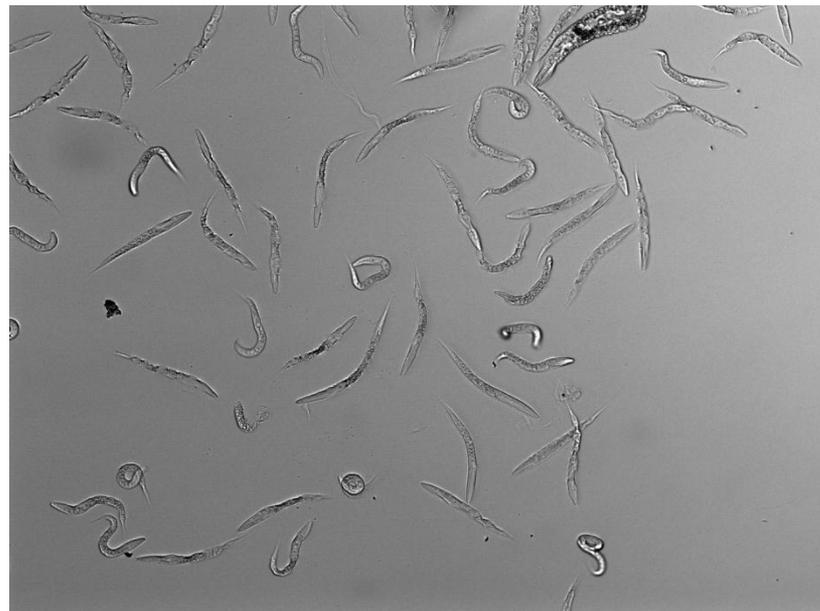
- ▶ CNS
- ▶ Сердечная функция
- ▶ Функции визуализации
- ▶ Коагулирование крови
- ▶ Оценка плотности костей
- ▶ Оценка желудочно-кишечного тракта

Плюсы от использования скрининга на Zebrafish

- ▶ Большое количество данных при изучении *in vivo* мг количеств соединения
- ▶ Уменьшенная стоимость исследований препаратов из за возможности получения результатов на ранних стадиях изучения токсичности, высокая стоимость исследований на моделях *in vivo*
- ▶ Определение основного и резервного препарата из списка соединений
- ▶ Возможность раннего прогнозирования эффективности вещества в различных моделях заболеваний, что позволяет уменьшить расходы на исследования



Zebrafish эмбрион, 4 дня после
оплодотворения



C. elegans

- ▶ Официальный представитель компании PerkinElmer Inc. «Pribori Oy» ЗАО
“Приборы” на Россию - СНГ

ЗАО “Приборы”

Москва, 109028 Певческий пер., 4, стр.1,

Тел. (495) 937-45-94

факс (495) 937-45-92

www.pribori.com