

УДК 537.534.35:[616.155.32:537.312.54]

*И. А. Челнокова¹, А. Н. Шклярова¹, Н. И. Егоренков²,
Б. К. Кузнецов², М. Н. Стародубцева^{1,2}*

*¹Государственное научное учреждение
«Институт радиобиологии НАН Беларуси»,*

*²Учреждение образования
Гомельский государственный медицинский университет,
г. Гомель, Беларусь*

ВОЗМОЖНОСТИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СОСТОЯНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ РЕНТГЕНОВ- СКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Введение

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является современным биофизическим методом исследования свойств поверхности, включая поверхность биологических клеток, на микро- и наноровнях. АСМ позволяет получить не только трёхмерные изображения поверхности клеток с наноразмерным разрешением, но также позволяет создавать карты механических свойств (эластичных и адгезионных) поверхности клеток. Эти карты отражают пространственную структуру и подмембранного цитоплазматического слоя и характеризуют состояние клеток, степень их активации и пути их гибели. Используя режим количественного наномеханического картирования (PeakForce QNM для АСМ Bruker Bioscope Resolve), можно одновременно записывать несколько, обычно 8, карт свойств поверхности клеток для выбранного малого участка её поверхности размером от несколько десятков-сотен нанометров до несколько десятков микрометров. Таким образом, малый участок поверхности клетки можно охарактеризовать набором параметров усреднённых по его площади: например, модулем упругости E ; силой адгезии, F_a ; и шероховатостью карт сил адгезии, $R_q F_a$. Этот набор механических параметров клеток описывает механический фенотип клетки, характеризующий её тип и состояние. Некоторые параметры структуры клеток, измеряемые с помощью АСМ, например, диаметр и высота, а также шероховатость топографии клетки, R_q торо дополняют набор параметров для более полной характеристики типа и состояния клетки. Получаемые наборы параметров для единичных клеток могут характеризовать типы состояний клеток в клеточной популяции, связанные со степенью активации и путями гибели. Классические подходы статистического анализа позволяют кластеризировать клетки по наборам клеточных параметров, например, при использовании метода кластеризации k -средних, что может быть полезным при автоматическом анализе состояния клеток с использованием АСМ. Как бы ни была сложна процедура получения и обработки АСМ-сканов клеток на сегодняшний момент, технические возможности метода постоянно совершенствуются, позволяя обоснованно полагать включение АСМ в ряд методов, которые находят широкое применение в клинической медицине.

Цель

Возможности применения режима PeakForce QNM атомно-силового микроскопа для автоматического анализа состояния и программ гибели лимфоцитов после облучения крови ионизирующим излучением.

Материалы и методы исследования

В работе использовали кровь человека и крысы. Самцы крыс Wistar (6 месяцев) содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Кровь крысы была взята из воротной вены печени под глубокой анестезией. Кровь человека была взята натощак у здорового добровольца (24 года) мужчины. Цельную кровь облучали рентгеновским излучением *in vitro* с помощью установки X-RAD 320 (Precision X-Ray, USA) (320 кВ, 12,5 А, 50 см, фильтр 1,5 мм Al, 0,25 мм Cu, 0,75 мм Sn). Поглощённые дозы для образцов крови были: 1, 25, 50 и 100 Гр. Лимфоциты выделяли из крови (после суток хранения облучённой крови при 4 °С) в градиенте плотности (ROTI®Sep 1077, Carl Roth), помещали на поверхность стекол с покрытием с повышенной адгезивностью, фиксировали глутаровым альдегидом и промывали фосфатно-солевым буфером и дистиллированной водой. АСМ сканирование проводили с помощью Bruker BioScope Resolve AFM на воздухе зондом SCANASYST-AIR (Bruker, $k=0,4$ N/m, $R=2$ nm) в режиме PeakForce QNM. Сканировали целые клетки и малые участки поверхности размером 250 нм × 250 нм при разрешении 256×256 пикселей и пиковой силе 500 рН. Механические и структурные параметры (модуль упругости, E ; сила адгезии, F_a , шероховатость топографической карты, R_q топо, шероховатость карты адгезии, $R_q F_a$, диаметр и высота клетки) были оценены на основе данных каналов Height, DMT Modulus, Adhesion. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения NanoScope Analysis 1.9 (Bruker). Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием R-студии, MS Excel 2016, Statistics и Statistical Kingdom Online (<https://www.statskingdom.com/>). Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Был проведён кластерный анализ (метод k -средних, число кластеров - 4) на основе данных наборов параметров (E , F_a , R_q топо, $R_q F_a$, D , H).

Результаты исследования и их обсуждение

В работе мы предприняли попытку классифицировать лимфоциты (сформировать кластеры) в образцах крови человека и крысы без и после её облучения рентгеновским излучением *in vitro* на основе получаемого набора АСМ параметров, связанных со структурными и наномеханическими свойствами поверхности лимфоцитов. Набор параметров состоял из следующих параметров механических и структурных свойств клеток (E , F_a , $R_q F_a$, R_q топо, D , H). Кластеризацию данных проводили с использованием общих массивов параметров для всех доз, отдельно для образцов человека (24 года) и крысы (6 месяцев). В начале анализа мы предположили, что лимфоцитная популяция может содержать клетки в разных состояниях: в состоянии покоя (С, неактивный контроль), в состоянии активации (S), клетки, эволюционирующие по пути апоптоза, (А) и клетки, эволюционирующие по пути некроза (N). Поэтому в процессе кластеризации мы использовали четыре кластера: кластер 1 (C1), кластер 2 (C2), кластер 3 (C3) и кластер 4 (C4).

Наиболее информативными АФМ-параметрами для кластеризации данных для человека были E , F_a и $R_q F_a$. Для человека модуль упругости четырёх кластеров равнялся ($M \pm SD$): 120±10 МПа (C1); 152±11 МПа (C2); 83±12 МПа (C3); 209±31 МПа (C4). Для крысы модуль упругости, соответственно, равнялся ($M \pm SD$): 90±11 МПа (C1); 136±15 МПа (C2); 52±13 МПа (C3); 260±69 МПа (C4). Анализ полученных значений параметров каждого кластера для человека и крысы позволил связать выделенные кластеры с клеточными состояниями клеток и программами их гибели. Кластер 1 может соответствовать лимфоцитам (С) без видимых признаков активации или гибели. Кластер 2, вероятно, соответствует лимфоцитам в активированном состоянии (S) - происходит

СЕКЦИЯ Медико-биологические науки

увеличение модуля упругости в сравнении со значениями для неактивных (покоящихся) клеток. В активированном состоянии клетки обладают развитой структурой кортикального цитоскелета, что приводит к увеличению жёсткости поверхности клеток и сглаживанию их поверхности на наномасштабе. В литературе имеются данные об увеличении модуля упругости лимфоцитов при их активации. Например, Ни с соавторами наблюдали увеличение модуля упругости активированных лимфоцитов в сравнении с покоящимися клетками примерно в 1,9 раза [1]. Кластер 3 может соответствовать апоптотической (А) программе гибели клеток – уменьшается модуль упругости клеток. В апоптотических клетках деполаримеризация актиновых филаментов кортикального цитоскелета ведёт к значительному снижению жёсткости клеток. Уменьшение упругих свойств клеток при апоптозе выявлено для разных типов клеток. Например, для лимфоцитов, модуль упругости при апоптозе уменьшается в 1,6 раз [1]. Кластер 4 может соответствовать лимфоцитам, гибнущим по другим механизмам, например, по пути некроза (N). Кроме того, возможно присутствие в популяции лимфоцитов разных подтипов (В-, Т-лимфоциты, натуральные киллеры и др.), что не учитывается в проведённом анализе. Модуль упругости лимфоцитов этого кластера значительно превышает модуль упругости как неактивированных лимфоцитов, так и активированных и апоптотических лимфоцитов. Следует также отметить, что количество клеток, входящих в указанный кластер невелико, что предполагает и больший процент неопределённости в наборе характеризующих его параметров.

Распределение лимфоцитов разных кластеров в образцах контрольной и облучённой крови представлено в таблице. Данные свидетельствуют о присутствии клеток в разных состояниях в образцах крови, как контрольной (необлучённой), так и после её облучения рентгеновским излучением в разных дозах. При этом, доля активированных лимфоцитов (С2), изначально присутствующая в контрольных образцах крови, снижается с дозой облучения. В то время как, доля лимфоцитов кластера С3 (апоптотические лимфоциты) и кластера С4 (некротические и другие программы гибели) увеличивается с дозой облучения.

Таблица – Процентный вклад (в %) лимфоцитов, включённых в разные кластеры, в популяцию лимфоцитов крови человека и крысы, необлучённой (контрольной) и облучённой рентгеновским излучением в разных поглощённых дозах.

Вид	Доза, Гр	С1	С2	С3	С4
Человек (24 года)	0	83%	17%	0%	0%
	1	56%	11%	33%	0%
	25	17%	0%	83%	0%
	50	14%	0%	86%	0%
	100	43%	29%	0%	29%
Крыса (6 мес)	0	63%	37%	0%	0%
	1	18%	45%	36%	0%
	25	40%	40%	20%	0%
	50	50%	10%	30%	10%
	100	44%	0%	44%	11%

Результаты анализа кластеризации АСМ-данных в первом приближении удовлетворяют критерию классификации клеток по программам их гибели и состоянию их функциональной активности. Наилучшее различие между кластерами для обоих видов

организмов достигнуто (на основе анализа евклидовых расстояний между кластерами) между кластерами С1 и С4, С3 и С4, покоящимися и некротическими клетками и между апоптотическими и некротическими клетками, соответственно. Меньшая степень различия была между кластерами С1 и С2/С3, т.е. покоящимися клетками и клетками в состоянии активации или апоптоза, соответственно.

Заключение

Наши данные показывают возможность автоматического анализа состояния и программ гибели лимфоцитов на основе набора параметров структурных и механических свойств клеток (параметры морфологии клеток и параметры наноструктурных и наномеханических свойств поверхности лимфоцитов), получаемых с использованием атомно-силовой микроскопии.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда», подпрограмма «Радиация и биологические системы» задание 3.01.2 «Разработать критерии оценки радиационно-индуцированных изменений ткани внутренней среды, основанной на анализе структуры и механических свойств клеточного компонента на моделях *in vitro* и *in vivo*».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nanostructure and nanomechanics of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis. / M. Hu [et al.] // J. Biomech. – 2009. – Vol. 42, № 10. – P. 1513–1519.

УДК 537.312.54:[591.176:599.323.45]

***И. А. Челнокова¹, А. Н. Шклярова¹, Т. Д. Матвеевкова¹,
М. Н. Стародубцева^{1,2}***

¹*Государственное научное учреждение
«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»,
«Институт радиобиологии НАН Беларуси»,*

²*Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь*

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРНЫЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫС

Введение

Ионизирующее излучение является одной из важных физических факторов, имеющих множество применений в диагностике и лечении разного рода заболеваний. Оно может оказывать разрушительное действие на живые клетки или ткани или приводить к нарушению их функций. Влияние рентгеновского облучения в относительно высоких дозах (30, 60, 70, 80 Гр) снижает выживаемость, пролиферацию, миграцию фибробластов [1]. Характерными особенностями изменений ткани и клеток являются изменения их механических свойств. Существуют различные методы оценки механических свойств клеток, среди которых атомно-силовая микроскопия (АСМ) занимает особое