

Сравнительная оценка полученных нами значений сил трения для фибробластов и раковых клеток линий A549 и HEP-2c (между острием АСМ-зонда и поверхностью клеток) показывает, что значения сил трения и фибробластов раковых клеток различаются (рисунок 2 в). Фрактальные размерности карт латеральных сил, несущие информацию об особенностях структурно-механических свойств поверхностного слоя клеток и обусловленные, в основном, свойствами кортикального цитоскелета, для раковых клеток и фибробластов также различаются. Раковые клетки линий A549 и HEP-2c характеризуются меньшими значениями  $D_F$  в сравнении со значением  $D_F$  для фибробластов. Следует отметить, что исследования проводились при температуре ниже температуры основного структурно-релаксационного перехода в поверхностном слое клеток (45–50 °С), связанного с тепловой денатурацией белков.

Таким образом, полученные методами АСМ значения микромеханических параметров (модуль упругости, силы неспецифической адгезии, силы трения, фрактальная размерность карт латеральных сил) поверхностного слоя и морфологические черты клеток A549 и HEP-2c, фибробластов и стволовых клеток указывают на существенное различие в структурном состоянии кортикального цитоскелета раковых и нормальных клеток. Для всех микромеханических параметров характерно уменьшение их значений для раковых клеток в сравнении с фибробластами и стволовыми клетками в исследованных условиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells / A. Fuhrmann [et al.] // Phys. Biol. — 2011. — Vol. 8, № 1. — P. 015007.
2. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells / S. E. Cross [et al.] // Nanotechnology. — 2008. — Vol. 19. — P. 384003.
3. The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process / J. R. Ramos [et al.] // Beilstein J. Nanotechnol. — 2014. — Vol. 5. — P. 447–457.
4. Atomic force microscopy based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines / J. Rother [et al.] // Open Biol. — 2014. — Vol. 4. — P. 140046.
5. Cell surface as a fractal: normal and cancerous cervical cells demonstrate different fractal behavior of surface adhesion maps at the nanoscale / M. E. Dokukin [et al.] // Phys. Rev. Lett. — 2011. — Vol. 107, № 2. — P. 028101.

УДК 53.081.5:531.214.7]:[611.018.1:616-006]

### ФРАКТАЛЬНАЯ РАЗМЕРНОСТЬ АСМ-КАРТ ЛАТЕРАЛЬНЫХ СИЛ ПОВЕРХНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК КАК ЕЕ МИКРОМЕХАНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

*Стародубцева М. Н., Стародубцев И. Е., Егоренков Н. И.*

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

#### *Введение*

Фрактальная размерность является одним из параметров, характеризующих поверхность твердых тел, в том числе поверхность биологических клеток [1, 2]. Она характеризует степень сложности (развитости) поверхности, точнее степень «заполненности поверхностью объема». Фрактальная размерность не плоской поверхности имеет промежуточное между 2 (топологическая размерность плоскости) и 3 (топологическая размерность объема) значение, то есть она является дробной величиной. Получаемые с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) карты латеральных сил (сил трения скольжения, возникающих между острием иглы-зонда и поверхностью клетки) поверхности биологических клеток описывают распределение физико-механических свойств на участке исследуемого поверхностного слоя клетки, т. е. являются функциями латеральных сил (ось  $z$ ) от координат  $x$  и  $y$ . При сканировании от точки к точке поверхности значение латеральных сил изменяется. Основными элементами поверхностного слоя клетки, влияющими на его физико-механические свойства, являются элементы примыкающего к мембране слоя цитоскелета (его кортикальной части, часто именуемой кортикальным цитоскелетом), в частности двумерного кортикального цитоскелета (эритроциты). Насколько развита структура кортикального цитоскелета, настолько зависит и степень сложности (фрактальная размерность) карт латеральных сил. Структура кортикального цитоскелета изменяется в зависимости от способа и степени активации клетки: контакт клетки с субстратом, взаимодействие клетки с веществами (например, фиксация клетки с помощью глутарового альдегида). При этом цитоскелет разных типов клеток (например, опухолевые и нормальные клетки) может по-разному реагировать на одни и те же стимулы. Актиновые микрофиламенты, которые формируют структуру кортикального цитоскелета, имеют толщину всего 5–9 нм. Естественно, что для оценки  $D_F$  необходимо исследовать изображение поверхности при условии, когда шаг сканирования сопоставим с размерами неровностей на поверхности [3]. Следовательно, оценивать влияние структуры кортикального цитоскелета на сложность организации поверхностного слоя клетки с помощью АСМ целесообразно при шаге сканирования не более 10–15 нм.

### **Цель**

Изучение изменений значений фрактальной размерности карт латеральных сил фиксированных глутаровым альдегидом опухолевых клеток и клеток нормальных тканей при изменении времени действия глутарового альдегида и шага АСМ-сканирования.

### **Материал и методы исследования**

В работе использованы культуры первичных фибробластов кожи человека (FB) и стромальных стволовых клеток жировой ткани человека (MSC), клеток карциномы Эрлиха (CE) мыши, полученные в НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет»; культуры эпителиальных клеток карциномы легкого (A549) и карциномы гортани (HEp-2), полученные в ГНУ «Институт радиобиологии НАН РБ». Для приготовления образцов клеток для АСМ на специально подготовленные предметные стекла наносили суспензию клеток в питательной среде и инкубировали в течение 24 ч (37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>, для FB, MSC, A549, HEp-2с) или 1 ч (20 °С для CE), затем клетки фиксировали 0,5 % солевым буферным раствором глутарового альдегида (5–35 мин), трижды отмывали препараты клеток деионизированной водой и высушивали в вертикально-наклонном положении (75–85°) в ламинарном потоке воздуха (0,42 м/с) при комнатной температуре. АСМ-исследования клеток проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашины», Беларусь) в контактном режиме сканирования с использованием игл-зондов CSC38 («MicroMash»): уровни А и В, коэффициент жесткости 0,01–0,08 Н/м. Сканирование проводили при стандартных комнатных условиях: влажность 55 ± 10 % и температура 22 ± 5 °С. Изображения рельефа (топографию) и карты латеральных сил записывали при термостатировании образца при температурах 20–35 °С. Термостатирование образца в интервале температур 20–35 °С. для записи изображения рельефа (топографии) и карты латеральных сил его поверхности осуществляли с помощью термоплатформы ТТ-01. Фрактальную размерность карт латеральных сил оценивали с помощью специально разработанного программного комплекса, расчет фрактальной размерности в котором основан на методе подсчета кубов.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В таблице 1 представлены результаты анализа  $D_F$  для карт латеральных сил и топографии участков поверхности клеток карциномы Эрлиха мыши. Наблюдается существенное увеличение величины  $D_F$  карт латеральных сил при уменьшении шага сканирования, начиная с 10–15 нм. При этом существенных изменений в  $D_F$  топографии при таком изменении шага сканирования не наблюдается. Увеличение  $D_F$  карт латеральных сил при уменьшении шага сканирования меньше 10–15 нм имеет место и для других клеток: фибробластов человека, нейтрофилов человека, раковых клеток линии А549.

АСМ-сканирование в наших экспериментах было проведено в контактном режиме на воздухе, а не в жидкости, что обеспечило высокое разрешение получаемых изображений клеточной поверхности. Однако при подготовке образцов клеток для АСМ-исследования на воздухе клетки подвергались химической фиксации и высушиванию. При высушивании (дегидратации) клеток может происходить изменение нативной структуры белков, подобное явлению их денатурации, но имеющее, в основном, обратимый характер. Одним из наиболее часто используемых реагентов, фиксирующих структуру клеток и тканей для проведения электронной, световой и атомно-силовой микроскопии является глутаровый альдегид. В коммерческих препаратах глутаровый альдегид является, как правило, мультикомпонентной смесью его мономеров, олигомеров и полимеров. Фиксация структуры клеток с помощью глутарового альдегида происходит достаточно быстро и необратимо. Фиксация может происходить вследствие образования поперечных сшивок между биомолекулами, в основном, молекулами белков.

Таблица 1 — Зависимость фрактальной размерности карт латеральных сил и топографии для клеток карциномы Эрлиха мыши от шага сканирования

Шаг сканирования, нм	Карты латеральных сил	Топография
3,9	2,257 ± 0,034	2,006 ± 0,066
9,8	2,181 ± 0,054	1,957 ± 0,039
15,7	2,037 ± 0,069	2,032 ± 0,069
23,5	2,007 ± 0,034	2,078 ± 0,083

*Примечание.* Размеры области сканирования: от 1 × 1 мкм до 6 мкм × 6 мкм, разрешение — 256 × 256 пикселей. Данные представлены как границы 95 % доверительного интервала (n = 8)

Существенные изменения фрактальных размерностей, как для карт латеральных сил, так и топографии клеток наблюдаются в случае фиксации 0,5 % глутарового альдегида для времени фиксации 20–30 минут. Разнонаправленность влияния времени фиксации клеток глутаровым альдегидом (увеличение числа сшивок между биомакромолекулами) на фрактальные размерности участков поверхности клеток (поверхностного рельефа и карт физико-механических свойств поверхностного слоя)

может указывать на то, что сгущение трехмерной сети кортикального цитоскелета клеток способствует выглаживанию рельефа их поверхности, в том числе «выглаживанию» вследствие уменьшения площади контакта клеток с АСМ-зондом.

Таблица 2 — Зависимость фрактальной размерности карт латеральных сил и топографии для стволовых клеток человека от времени фиксации клеток 0,5 % глутаровым альдегидом

Время фиксации, мин	Карты латеральных сил			Топография		
	$D_F$	$R^2$	n	$D_F$	$R^2$	n
5	$2,092 \pm 0,084$	0,999	34	$2,156 \pm 0,065$	0,999	35
10	$2,067 \pm 0,104$	0,995	34	$2,121 \pm 0,088$	0,992	36
15	$2,102 \pm 0,096$	0,955	33	$2,151 \pm 0,086$	0,996	34
25	$2,156 \pm 0,140$	0,927	34	$2,039 \pm 0,026$	0,893	33
35	$2,200 \pm 0,040$	0,965	16	$2,041 \pm 0,041$	0,992	17

*Примечание.* Фрактальная размерность оценена методом подсчета кубов. Данные представлены как мода  $\pm$  1/2 ширины пика Гаусса; n — размер выборки,  $R^2$  — коэффициент корреляции

Таким образом, наилучшими условиями для анализа  $D_F$  АСМ-карт латеральных сил участков поверхности различных клеток при их фиксации с помощью 0,5 % глутарового альдегида являются: время фиксации 30 минут, шаг сканирования не более 10–15 нм. В этих условиях нами оценена  $D_F$  для опухолевых клеток и фибробластов (таблица 3).

Значения  $D_F$  для опухолевых клеток и нормальных фибробластов различаются существенно ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента). Кроме того, есть отличия в значениях  $D_F$  и среди опухолевых клеток (например, А549 и Нер-2с) (таблица 3).

Таблица 3 — Фрактальная размерность карт латеральных сил для разных типов клеток

Тип клеток	$D_F$
А549	$2,196 \pm 0,017$
Нер-2с	$2,121 \pm 0,023$
FB	$2,329 \pm 0,016$
CE	$2,181 \pm 0,054$

*Примечание.* Данные представлены как границы 95 % доверительного интервала (n = 18–96)

### Заключение

Фрактальная размерность АСМ-карт латеральных сил (сил трения скольжения иглы-зонда по поверхности клетки при ее сканировании) является важной характеристикой физико-механических свойств поверхностного слоя клетки, связанной с состоянием кортикального цитоскелета. Для оценки значений фрактальной размерности АСМ-карт латеральных сил время предварительной фиксации структуры клетки 0,5 % глутаровым альдегидом должно быть не менее 20–30 минут, а шаг сканирования не более 10–15 нм. Установлено различие значений фрактальной размерности карт латеральных сил для опухолевых клеток и фибробластов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Cell type classifiers for breast cancer microscopic images based on fractal dimension texture analysis of image color layers. / S. Jitreee [et al.] // Scanning. — 2015. — Vol. 9999. — P. 1–7.
2. Dokukin, M. E. Cell surface as a fractal: normal and cancerous cervical cells demonstrate different fractal behavior of surface adhesion maps at the nanoscale / M. E. Dokukin, N. V. Guz, I. Sokolov. // Phys. Rev. Lett. — 2011. — Vol. 107. — P. 028101.
3. Определение фрактальной размерности поверхности эпитаксиального n-GaAs в локальном пределе / Н. А. Торхов [и др.] // Физика и техника полупроводников. — 2009. — Т. 43, № 1. — С. 38–47.

УДК 615.9 (075.8)

## РАЗРАБОТКА НАУЧНЫХ ОСНОВ ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКОГО ОБОСНОВАНИЯ ВРЕМЕННЫХ ОТКЛОНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ АВАРИЙНО ОПАСНЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ВОДЕ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ХОЗЯЙСТВЕННО-ПИТЬЕВОГО ВОДОПОЛЬЗОВАНИЯ НА ПЕРИОД ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЙ

*Стельмах В. А., Власенко Е. К., Деменкова Т. В.*

Республиканское унитарное предприятие  
«Научно-практический центр гигиены»  
г. Минск, Республика Беларусь

### Введение

Мировой опыт свидетельствует, что значительное влияние на распространенность острых и хронических болезней химической этиологии (включая массовые интоксикации) оказывают чрезвычай-