

По частоте использования их опередили даже карбопенемы — 24 (6,9 %). Шире стали использоваться и респираторные фторхинолоны (левофлоксацин). Сравнивая частоту использования АБП при различных морфологических формах заболевания, мы отметили, что цефалоспорины значительно преобладали в группах пациентов с очаговой и сегментарной пневмониями. У детей с лобарным поражением эта группа АБ и макролиды назначались с одинаковой частотой.

При очаговых пневмониях более часто использовалась монотерапия цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим) — 47 (64,4 %), аминогликозидами (амикацин) — 12 (16,5 %), защищенными пенициллинами (амписульбин) — 10 (13,7 %). При сегментарных пневмониях у 22 (39,3 %) больных использовалась комбинация двух антибактериальных препаратов (цефалоспорины III поколения с аминогликозидами), при лобарных — у 12 (70,6 %) из 2-х и у 5 (29,4 %) — из 3-х препаратов. Из антибиотиков резерва назначались ванкомицин и меропенем.

Анализ АБТ в различных возрастных группах показал, что у детей всех возрастных групп также наиболее часто применялись цефалоспорины. Однако в старшем возрасте значительно увеличивается применение фторхинолонов. Так, к примеру, у пациентов старше двенадцати лет их назначали почти каждому второму ребенку (таблица 2).

Таблица 2 — Частота использования групп антибиотиков у детей различного возраста с пневмониями

Антибиотики	До 1 года	1–3 года	3–6 лет	6–12 лет	Старше 12 лет
Цефалоспорины	8	15	19	40	38
Макролиды	1	4	9	21	15
Аминогликозиды	2	6	9	28	30
Произв. имидазола	0	0	1	3	1
Фторхинолоны	0	1	4	9	23
Карбопенемы	2	1	8	3	11
Пенициллины	3	3	2	7	6
Гликопептиды	0	3	2	5	7

Таким образом, анализ 146 карт стационарных пациентов с внегоспитальными пневмониями позволил сделать следующие **выводы**:

1. У половины детей воспалительный процесс локализовался в правом легком. Двустороннее поражение легочной паренхимы встречалось преимущественно при очаговых пневмониях.
2. Гендерные различия с преобладанием лиц мужского пола были выражены во всех младших возрастных группах, в старшей распределение по полу было равным.
3. Антибиотиками выбора при различных формах пневмоний и во всех возрастных группах были цефалоспорины.
4. При очаговых пневмониях более часто использовалась монотерапия антибактериальными препаратами, при сегментарных и лобарных — комбинированная.

ЛИТЕРАТУРА

1. Внебольничная пневмония у детей. Распространенность, диагностика, лечение и профилактика. — М., 2011. — 68 с.
2. Жерносек, В. Ф. Острые пневмонии у детей / В. Ф. Жерносек. — Белорусская медицинская академия последипломного образования. — Минск, 2005. — 36 с.
3. Самсыгина, Г. А. Тяжелые внебольничные пневмонии у детей: особенности клиники и терапии / Г. А. Самсыгина, Т. А. Дудина // Consilium medicum. — 2002. — № 5. — С. 31–35.
4. Страчунский, Л. С. Антибактериальная терапия пневмоний у детей: руководство по фармакотерапии в педиатрии и детской хирургии / Л. С. Самсыгина. — М.: Медпрактика, 2002. — Т. 1. — С. 65–103.

УДК 531.714.7:[611.018.1:616-006]

МИКРОМЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ЛИНИЙ А549 И НЕР-2С

*Стародубцева М. Н.¹, Егоренков Н. И.¹, Константинова Е. Э.³,
Кужель Н. С.³, Стародубцев И. Е.¹, Мельникова Г. Б.³, Петренев Д. Р.²*

¹ Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

² Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии Национальной академии наук Республики Беларусь»

г. Гомель, Республика Беларусь

³ Государственное научное учреждение

«Институт тепло-массообмена им. А. И. Лыкова
Национальной академии наук Республики Беларусь»

г. Минск, Республика Беларусь

Введение

В клетках злокачественного новообразования имеют место не только геномные нарушения, ведущие к нарушениям процессов клеточного деления, но, но и другие важные изменения, включая из-

менение трансмембранного потенциала, структурной организации клеток, их способности к межклеточным контактам, адгезии и миграции. Ключевым моментом в образовании метастазов является появление у раковых клеток способности к инвазии в окружающие ткани и входу/выходу в кровеносную и лимфатическую системы. Эти процессы связаны с изменениями физико-механических свойств клеток, обусловленными реорганизацией их цитоскелета. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является новым перспективным методом исследования физико-механических свойств биологических клеток на микро- и нано-масштабном уровнях. С помощью АСМ установлено, что раковые клетки в сравнении с клетками нормальных тканей являются менее упругими (меньше значения модуля Юнга, E) [1–3]. Rother с соавторами на основе изучения вязкоупругих характеристик (динамические модули упругости G' и потеря G'' при сдвиге; тангенс угла или коэффициент механических потерь $\text{tg}\delta$, G''/G' ; комплексная вязкость и др.) раковых клеток 9 клеточных линий установил, что исследованные раковые клетки являются более мягкими в сравнении с фибробластами и эпителиальными клетками одного органа или организма, а при сравнении характеристик раковых и нормальных клеток разных органов или организмов различия между ними могут иными [4]. Выявлено также различие в значениях сил неспецифической адгезии (F_a) между поверхностью клетки и поверхностью АСМ-зонда, оцененной с помощью силовой спектроскопии, для раковых и нормальных клеток. Авторы исследования [5] отмечают увеличение значений фрактальной размерности карт сил неспецифической адгезии участков раковых клеток в сравнении со значениями фрактальной размерности для нормальных клеток.

Цель

Оценка с помощью АСМ значений E , F_a , $F_{\text{тр}}$ (латеральных сил — сил трения между поверхностью клетки и поверхностью АСМ-зонда), D_F (фрактальной размерности карт латеральных сил) адгезированных к стеклянным пластинкам и фиксированных глутаровым альдегидом опухолевых клеток человека линий А549 (карцинома легкого) и НЕР-2с (эпидермоидная карцинома гортани), а также фибробластов и стволовых клеток человека.

Материал и методы исследования

В работе использованы культуры первичных фибробластов кожи человека (FB) и мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека (MSC), полученные в НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет» и ГНУ «Институт радиобиологии НАН РБ» при выполнении заданий ГПНИ 1.3.59 и 5.3.09. Культура эпителиальных клеток карциномы легкого (А549) любезно предоставлена заведующим кафедрой микробиологии биологического факультета БГУ В. А. Прокулевичем. Эпидермоидная карцинома гортани (НЕР-2с) получена из коллекции РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ. Для приготовления образцов клеток для АСМ-исследования на специально подготовленные предметные стекла, помещенные в чашки Петри, вносили суспензию клеток в питательной среде и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С и 5 % CO_2 , затем клетки фиксировали 0,5 % соевым буферным раствором глутарового альдегида (30 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»): уровень В, коэффициент жесткости 0,01–0,08 Н/м. Сканирование проводили при стандартных комнатных условиях: влажность 55 ± 10 %, температура 22 ± 5 °С. Изображения рельефа (топографию) и карты латеральных сил записывали при термостатировании образца при температурах 20–35 °С с помощью термоплатформы ТТ-01. Силы трения рассчитывали как полуразность латеральных сил, полученных при сканировании поверхности в двух противоположных направлениях для участка поверхности клетки размером $2,5 \times 2,5$ мкм. Упругие и адгезионные свойства поверхностного слоя клеток оценивали с помощью метода силовой спектроскопии с помощью игл-зондов NSC11 (коэффициент жесткости 3 Н/м). Обработку АСМ-данных осуществляли с помощью программы «SurfaceXplore 1.3.11» («МикроТестМашины», Беларусь). 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

На рисунке 1 представлены трехмерные изображения (топография) клеток линий А549, НЕР-2с, культур фибробластов кожи и стволовых клеток человека, адгезированных к стеклянной пластине и фиксированных глутаровым альдегидом. Фибробласты и стволовые клетки в отличие от клеток раковых линий имеют хорошо развитый цитоскелет: клетки распластаны по поверхности, заметны структуры цитоскелета (филлоподии, ламеллоподии, стрессовые волокна) и ядра (ядрышки) (рисунок 1 в,г). Клетки обеих раковых линий имеют более выпуклую колоколообразную форму с многочисленными микроворсинками и неровностями поверхности. Структуры цитоскелета и ядра отчетливо не выражены (рисунок 1 а,б).

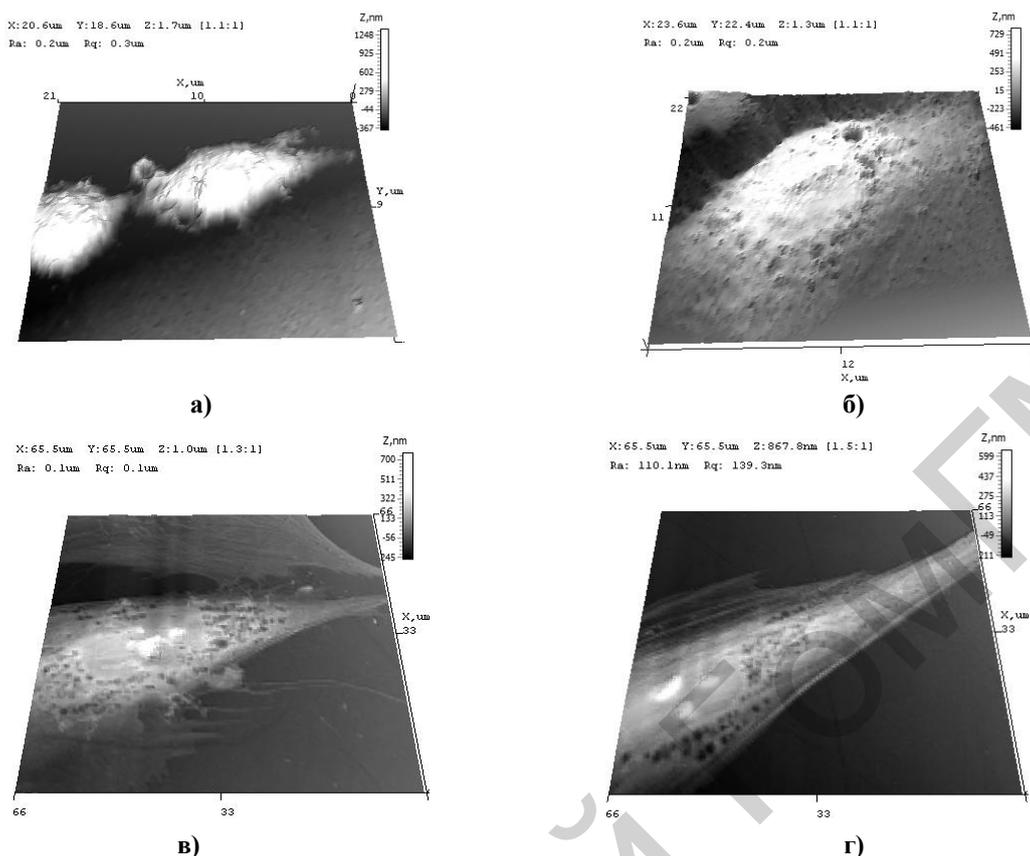


Рисунок 1 — Трехмерные АСМ-изображения (топография) фиксированных 0,5 % глутаровым альдегидом (30 мин) клеток линий А549 (а), НЕР-2с (б), культур фибробластов (в) и стволовых клеток (г) после адгезирования к стеклу в течение 24 часов и высушивания мазков на воздухе

По данным силовой спектроскопии препаратов клеток средний модуль упругости клеток раковых линий (А549 и НЕР-2с) примерно в три раза меньше среднего модуля упругости фибробластов и стволовых клеток (рисунок 2 а). Оцененная сила неспецифической адгезии поверхности препаратов клеток линии НЕР-2с в 3–4 раза меньше силы адгезии для фибробластов и стволовых клеток (рисунок 2 б). Эти данные хорошо согласуются с данными A. Fuhnmann, S. E. Cross, J. P. Ramas и других авторов, выявивших меньшие значения упругих свойств и сил адгезии клеток раковых линий в сравнении с клетками нормальных тканей в жидких средах [6–8].

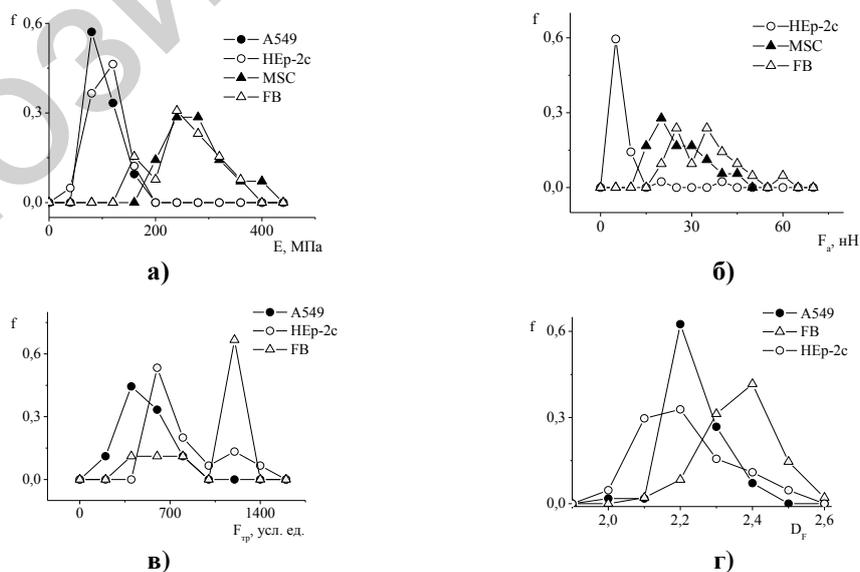


Рисунок 2 — Гистограммы модуля упругости (а), силы адгезии (б), силы трения (в) и фрактальной размерности карт латеральных сил (г) микроучастков поверхности клеток различных типов

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.