

Таблица 1 — Состояние ИСК и индекс сперматогенеза крыс после острого 3-часового иммобилизационного стресса

Параметры	II группа	I группа	p
Канальцы с 4 генерациями половых клеток, (%)	67,0 (63,5; 69,5)	73,0 (72,0; 75,0)	0,002
Канальцы с 3 генерациями половых клеток, (%)	33,0 (29,5; 36,5)	26,0 (24,0; 29,0)	0,008
Канальцы с 2 генерациями половых клеток, (%)	0 (0; 0,5)	0 (0; 1,0)	0,469
Канальцы с 1-й генерацией половых клеток, (%)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,884
Индекс сперматогенеза, (%)	3,67 (3,64; 3,69)	3,72 (3,71; 3,75)	0,008

В исследованиях Ю. Н. Королева с соавт. [2] было продемонстрировано, что однократное воздействие 6 часового иммобилизационного стресса через сутки приводит к отчетливому снижению индекса сперматогенеза в семенниках крыс.

Проведенные нами исследования показали, что острый 3 часовой иммобилизационный стресс вызывает у самцов беспородных белых крыс снижение числа ИСК с 4 генерациями половых клеток (на 8,2 %;  $p < 0,01$ ) и увеличение ИСК с 3-мя генерациями (на 26,9 %;  $p < 0,01$ ), что приводит к незначительному, но статистически значимому снижению индекса сперматогенеза ( $p < 0,01$ ). Эти изменения, по нашему мнению, могут быть обусловлены замедлением (частичным блокированием) процессов дифференцировки половых клеток в направлении сперматиды — сперматозоиды.

#### **Выводы**

Однократное воздействие 3-часового иммобилизационного стресса вызывает нарушения процессов сперматогенеза в семенниках крыс, что указывает на высокую чувствительность сперматогенного эпителия к действию иммобилизационного стресса даже в условиях кратковременной иммобилизации животных.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Богомолова, Н. В. Функциональная морфология клеток крови в условиях острого иммобилизационного стресса при облучении электромагнитными волнами миллиметрового диапазона / Н. В. Богомолова, В. Ф. Киричук, С. И. Киреев // Современные наукоемкие технологии. — 2006. — № 6. — С. 43–44.
2. Структурно-функциональные нарушения в семенниках крыс в условиях острого иммобилизационного стресса / Ю. Н. Королев [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. — 2012. — № 4. — С. 25–29.
3. Ухов, Ю. И. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников / Ю. И. Ухов, А. Ф. Астраханцев // Архив анатомии. — 1983. — Т. 84, № 3. — С. 66–72.
4. Потемина, Т. Е. Нарушение сперматогенеза в условиях стресса у самцов крыс / Т. Е. Потемина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2008. — Т. 145, № 6. — С. 643–647.
5. Tash, J. S. Long-term (6-wk) hindlimb suspension inhibits spermatogenesis in adult male rats / J. S. Tash, D. C. Johnson, G. C. Enders // Journal of Applied Physiology. — 2002. — № 3, Vol. 92. — P. 1191–1198.

УДК 577.15.158:612,42]:616-092.9

### **СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИКСИРОВАННЫХ СПИРТМ ФИБРОБЛАСТОВ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО**

*Стародубцева М. Н., Дрозд Е. С., Егоренков Н. И.*

**Учреждение образования**

**«Гомельский государственный медицинский университет»**

**г. Гомель, Республика Беларусь**

**Государственное научное учреждение**

**«Институт тепло- и массообмена им. А. И. Лыкова Национальной академии наук Беларуси»**

**г. Минск, Республика Беларусь**

#### **Введение**

При развитии онкологической патологии клеток и тканей изменяются их структурные и механические свойства. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является новым перспективным методом исследования структурно-механических (микромеханических) свойств различных тел, включая биологические клетки. В АСМ исследуются непосредственно клетки, а не их реплики, как в электронной микроскопии, и не требуется исполь-

зования дорогостоящих флуоресцентных красителей в отличие от флуоресцентной микроскопии. АСМ лучше других методов соответствует требованиям, предъявляемым к простому и дешевому методу массовой диагностики рака на клеточном уровне. В статическом (контактном) режиме сканирования имеются несколько опций АСМ, часто используемых для исследования биологических клеток: запись топографии, микроскопия латеральных сил (сил трения или фрикционных сил), а также статическая силовая спектроскопия. Измеренные методом АСМ силы трения, возникающие между поверхностью клетки и острием АСМ-зонда при сканировании, характеризуют локальные механические (микромеханические) ее свойства. Ранее нами было выявлено существенное изменение фрикционных свойств поверхности нормальных клеток (эритроцитов, тимоцитов) при изменении температуры испытаний [1, 2]. Методом силовой спектроскопии установлено, что раковые клетки человека и животных являются менее упругими и вязкими в сравнении с клетками нормальных тканей [3, 4]. Полученные другими методами данные свидетельствуют о том, что упругие свойства клеток для разных степеней развития рака (предраковые, начальной стадии рака и метастазирующие) различаются [5, 6].

#### **Цель**

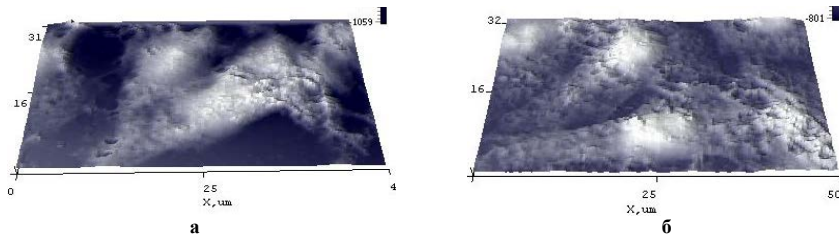
Выявление различия параметров фрикционных свойств поверхности адгезированных к стеклянным пластинкам и фиксированных спиртом иммортализованных фибробластов и эпителиальных клеток рака легкого человека (A549), оцениваемых с помощью атомно-силовой микроскопии (микроскопии латеральных сил).

#### **Материалы и методы исследования**

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. Изучение температурных зависимостей АСМ-параметров клеток проводили в диапазоне температур от 20 до 100 °С, используя входящую в комплект прибора «НТ-206» термоплатформу ТТ-01. Средняя скорость нагрева образцов составляла около 0,5 °С в минуту. Скорость (частота) сканирования составляла 0,2–0,5 Гц. Нагрузку на АСМ консоль поддерживали на уровне 1,2–1,6 нН. Сканирование проводили при стандартных комнатных условиях: влажность 55 ± 10 % и температура 22 ± 5 °С. Записывали изображения рельефа (топографию) и карты латеральных сил. Культуры клеток (спонтанно иммортализованные фибробласты человека (ИФ) и эпителиальные клетки рака легкого человека (A549)) выращивали на специально подготовленных стеклах размером 1 мм × 1 мм. Клеточные образцы последовательно обрабатывали 24, 48 и 96 % растворами этилового спирта (1 мин) и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Полученные карты латеральных сил поверхности клеток обрабатывали с помощью программы «SurfaceXplore 1.3.11» («МикроТестМашины», Беларусь). Силы трения рассчитывали как полуразность латеральных сил, полученных при сканировании поверхности в двух противоположных направлениях, и характеризовали двумя параметрами: средним значением ( $F_f$ ) и среднеквадратическим отклонением от среднего значения ( $\sigma_f$ ) для участка поверхности клетки размером 5 мкм × 5 мкм. Результаты статистического анализа экспериментальных данных представлены на рисунках в виде границ доверительного интервала с доверительной вероятностью 0,95 ( $n = 2-10$ ).

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

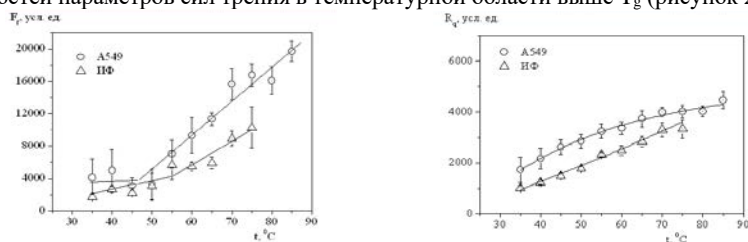
На рисунке 1 представлены трехмерные изображения (топография) фиксированных спиртом иммортализованных фибробластов человека и эпителиальных клеток рака легкого человека. Для записи карт латеральных сил в условиях сканирования в двух противоположных направлениях в пограничной с внутренней, более плотной частью цитоплазмы клеток (эндоплазмой) были выбраны участки поверхности размером 5 мкм × 5 мкм.



**Рисунок 1 — Трехмерные АСМ-изображения иммортализованных фибробластов (а) и эпителиальных клеток рака легкого человека (А549) (б), фиксированных спиртом**

Ранее нами было показано, что с увеличением температуры по достижению определенной температуры ( $T_g$ ) параметры фрикционных сил (средние значения сил трения ( $F_f$ ) и отклонение от среднего значения ( $\sigma_f$ ) сил трения на участках поверхности клеток микронного размера) между острием АСМ-зонда и поверхностью клеток существенно увеличиваются [1, 2]. При этом характер изменения фрикционных свойств поверхности клеток аналогичен характеру изменения фрикционных свойств поверхности аморфных полимеров при переходе через температуру структурного стеклования и указывает на проявление в исследованном температурном интервале структурно-релаксационного перехода в поверхностном слое клеток (денатурация белков кортикального цитоскелета). Температура  $T_g$  характеризует начало этого структурно-релаксационного перехода.

Для исследованных в данной работе фибробластов и раковых клеток А549 в целом характерны такие же закономерности, как и для эритроцитов и тимоцитов. Для фибробластов и клеток А549 выявлено некоторые различия в характере температурных зависимостей параметров сил трения в температурной области выше  $T_g$  (рисунок 2).



**Рисунок 2 — Температурные зависимости параметров сил трения, возникающих между острием АСМ-зонда и поверхностью клеток: иммортализованных фибробластов (ИФ) и эпителиальных клеток рака легкого человека (А549)**

Так, для раковых клеток А549 скорость роста сил трения с увеличением температуры ( $dF_f/dT$ ) в температурной области структурно-релаксационного перехода значительно выше скорости роста сил трения для иммортализованных фибробластов. Средние значения ( $F_f$ ) и среднее квадратическое отклонение ( $\sigma_f$ ) сил трения для клеток А549 также выше, чем для фибробластов. Особенно ярко это проявляется при переходе через область температур, в которой реализуется структурно-релаксационный переход. Как показывает анализ данных литературы, имеются отличия в структуре цитоскелета, включая кортикальный, для клеток А549 в сравнении со структурой цитоскелета клеток нормальных тканей. Выявлено, например, что для клеток А549 характерна высокая степень нитрования белков цитоскелета в связи с повышенной активностью NO синтаз в клетках этого типа [7]. В наибольшей степени нитруется белок цитоскелета — актин, что влияет на сборку и разборку актиновых элементов цитоскелета, ответственных за метастазирование раковых клеток.

### **Выводы**

Полученные с помощью атомно-силовой микроскопии данные указывают на существенные отличия значений микромеханических (фрикционных) свойств и характера их температурных зависимостей для иммортализованных фибробластов и эпителиальных клеток рака легкого человека (A549), что указывает на различия в структурно-функциональном состоянии их белков кортикального цитоскелета.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Стародубцева, М. Н. Анализ релаксационных состояний полимеров и биополимеров на основе карт латеральных сил, получаемых методом атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Вестник Фонда фундаментальных исследований. — 2010. — № 4. — С. 51–57.
2. Starodubtseva, M. N. Thermo-mechanical properties of the cell surface assessed by atomic force microscopy / M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, I. A. Nikitina // Micron. — 2012. — Vol. 43, № 12. — P. 1232–1238.
3. Characterization of cell elasticity correlated with cell morphology by atomic force microscope. / Q. Guo [et al.]. // J. Biomech. — 2012. — Vol. 45, № 2. — P. 304–309.
4. Cancer cell detection in tissue sections using AFM / M. Lekka [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. — 2012. — Vol. 518, № 2. — P. 151–156.
5. The effects of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures / A. N. Ketene [et al.] // Nanomedicine. — 2012. — Vol. 8, № 1. — P. 93–102.
6. Swaminathan, V. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines / V. Swaminathan [et al.] // Cancer. Res. — 2011. — Vol. 71, № 15. — P. 5075–5080.
7. Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria / K. S. Aulak [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 2004. — Vol. 286. — P. H30–H38.

### **УДК 616.155.1**

### **ИЗМЕНЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ КРОВИ**

*Стародубцева М. Н., Петренёв Д. Р., Егоренков Н. И.*

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

### **Введение**

Изменение механических свойств и морфологии эритроцитов при хранении крови является одним из важных аспектов развития посттрансфузионных осложнений [1]. Эти изменения происходят в результате ряда химических процессов, вызванных нарушениями нормальных для эритроцитов условий существования (физиологических условий), обусловленными изъятием крови и изоляцией ее от организма и включающими истощение эритроцитов по АТФ, перекисное окисление липидов, потерю асимметрии липидного бислоя и потерю части фосфолипидов в результате везикуляции, реорганизацию мембранного скелета и др. [2, 3]. Изменение механических свойств эритроцитов включает изменение их деформируемости (оценивается по изменению отношения площади поверхности к объему клетки или модуля упругости мембраны), вязкости цитоплазмы, осмотической резистентности клеток и способности к агрегации. Изменение морфологии эритроцитов включает трансформацию нормоцитов-дискоцитов (легко деформируемой формы эритроцитов) в эхиноциты с морфологическим индексом 1 (слабо деформируемую форму эритроцитов) или в сфероэхиноциты (форму эритроцитов, практически не способную к деформациям в кровотоке) [2, 4].

Микроскопия латеральных сил (МЛС) является одним из методов (опций) атомно-силовой микроскопии (АСМ), используемых для изучения механических (фрикционных) свойств поверхностей. При этом для характеристики фрикционных свойств поверхностей используют параметры боковых (латеральных) сил — сил трения, возникающих между острием АСМ-зонда и поверхностью изучаемого объекта при ее сканировании (скольжении наноразмерного зонда-индентора по поверхности). Значения этих сил зависят, в основном, от структурно-релаксационного состояния белков цитоскелета [5].