

сти базальной мембраны. В обеих группах исследования отмечалось преобладание доли капилляры с выраженными нарушениями целостности базальной мембраны. Однако, более выраженное повреждение базальной мембраны достоверно отмечено в группе пациентов, страдавших болезнью Альцгеймера ($p = 0,0194$).

Результаты проведенного нами исследования измерения диаметра капилляров свидетельствуют о перекрестной встречаемости изменений в микрососудах, как при деменции альцгеймеровского типа, так и при сосудистой деменции. Однако, анализ целостности базальной мембраны капилляров, позволил выявить более выраженные нарушения капилляров в группе пациентов, страдавших болезнью Альцгеймера. Полученные данные, с одной стороны указывают на сочетание нейродегенеративных процессов и сосудистой патологии в неокортексе головного мозга человека при развитии болезни Альцгеймера, с другой стороны, на прогрессирование патологии капилляров при данном заболевании.

Выводы

Таким образом, в коре головного мозга пациентов, которые страдали как сосудистой деменцией, так и болезнью Альцгеймера, отмечены проявления сосудистой патологии, которая сопровождалась нарушением непрерывности базальных мембран капилляров. При этом поражение базальной мембраны капилляров было более выражено при болезни Альцгеймера, что, на наш взгляд, может быть связано с прогрессированием гибели нейронов и излишним накоплением бета-амилоида в головном мозге пациентов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenblat, C. Improve support for rising numbers living with dementia [Electronic resource] / C. Greenblat // WHO. – Mode off access: <https://news.un.org/en/story/2021/09/1098922> WHO/. – Date of access: 20.09.2022.
2. Табеева, Г. Р. Смешанная деменция: роль цереброваскулярной патологии / Г. Р. Табеева // Журнал неврологии и психиатрии. – 2018. – № 9. – С. 111–116.
3. Яхно, Н. Н. Сосудистые когнитивные расстройства / Н. Н. Яхно, В. В. Захаров // РМЖ. – 2005. – № 12. – С. 789.
4. Iadecola, C. The pathobiology of vascular dementia / C. Iadecola // Neuron. – 2013. – Vol. 80, № 4. – P. 844–866.
5. Alcohol-Induced Alterations in the Vascular Basement Membrane in the Substantia Nigra of the Adult Human Brain / S. Skuja [et al.] // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10, № 830. – P. 1–25.

УДК [537.533.35:612.112.94]:537.312.53

И. А. Челнокова¹, А. Н. Шклярова¹, Н. И. Егоренков², М. Н. Стародубцева^{1,2}

¹ Государственное научное учреждение
«Институт радиобиологии НАН Беларуси»

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

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Введение

С увеличением числа процедур медицинской визуализации с использованием ионизирующего излучения (рентгенография, рентгеноскопия, компьютерная томография

и т. д.), а так же процедур лучевой терапии, возрастает суммарная нагрузка излучения на организм. Являясь радиочувствительными клетками, лимфоциты даже при действии небольших доз, могут утратить способность участвовать в иммунном ответе и, как следствие, приводить к снижению иммунитета. Изменение структуры и механических свойств клетки связаны с изменениями её функциональной активности. Установление изменений механических свойств и геометрии клеточной поверхности на наномасштабе при действии ионизирующего излучения может использоваться в дальнейшем в качестве диагностических критериев рацационно-индуцированных изменений клеток. Одним из методов исследования клеток на наноуровне является атомно-силовая микроскопия. С помощью этого метода возможно получать не только изображения участков поверхности клеток с нанометровым разрешением, но и карты распределения механических свойств поверхности.

Цель

Оценка изменения параметров структурных и механических свойств наномасштабных участков поверхностного слоя лимфоцитов крови крысы после облучения цельной крови рентгеновским излучением *in vitro* в диапазоне доз 1–100 Гр.

Материал и методы исследования

Самцы крыс линии Вистар (возраст — 1 год 4 месяца) содержались в стационарных условиях вивария на полноценном стандартном пищевом рационе со свободным доступом к воде, согласно установленным нормам. Кровь отбирали из воротной вены печени на фоне глубокого наркоза. Облучение цельной крови крыс проводили на рентгеновской установке биологического назначения X-RAD 320 (Precision X-Ray, США) с напряжением на трубке 320 кВ, расстоянием до объекта 50 см, фильтр 1,5 мм Al, 0,25 мм Cu, 0,75 мм Sn. Лимфоциты выделяли после суток хранения при 4°С в градиенте плотности (ROTI®Sep 1077, Carl Roth) и иммобилизовали на стёкла с адгезивным покрытием с последующей фиксацией 1% глутаровым альдегидом в течении 30 минут и отмывкой фосфатно-солевым буфером и дистиллированной водой. Изучение механических свойств и шероховатости поверхности лимфоцитов проводили методом атомно-силовой микроскопии с помощью Bruker BioScope Resolve в режиме PeakForce QMN in Air (частота — 0,5 Гц, область сканирования — 250 нм × 250 нм, разрешение — 256 × 256 пикселей, пиковая нагрузка — 500 пН) иглой-зондом SCANASYST-AIR (Bruker) с радиусом закругления 2 нм. Обработку полученных изображений проводили в программе NanoScope-Analysis 1.9. Оценку механических свойств проводили по каналу записи DMT-Modulus. Статистический анализ данных проводили с помощью онлайн статистического калькулятора Statistics Kingdom. Визуализация АСМ-изображений и построение профилей проводилась в программе Gwyddion.

Результаты исследования и их обсуждение

Значение шероховатости поверхности крыс рассчитывалось как среднеквадратическое значение отклонений высоты участка поверхности клетки. Оценку шероховатости (R_q) проводили после использования опции Flatten (удаляет нежелательные элементы из линий сканирования (например, шум, изгиб и наклон)) в АСМ-изображениях, полученных по каналу Height Sensor.

На рисунке 1 представлены типичные топографические изображения наномасштабных участков поверхности лимфоцитов контрольного образца и образца, подвергнутого действию рентгеновского излучения в дозе 50 Гр. На рисунке заметны изменения структуры поверхности участков, вызванные действием рентгеновского излучения. Для

лимфоцитов стареющих крыс, при действии излучения, наблюдается более сглаженный профиль наномасштабных участков поверхности клеток, что свидетельствует об изменении структуры кортикального цитоскелета лимфоцитов.

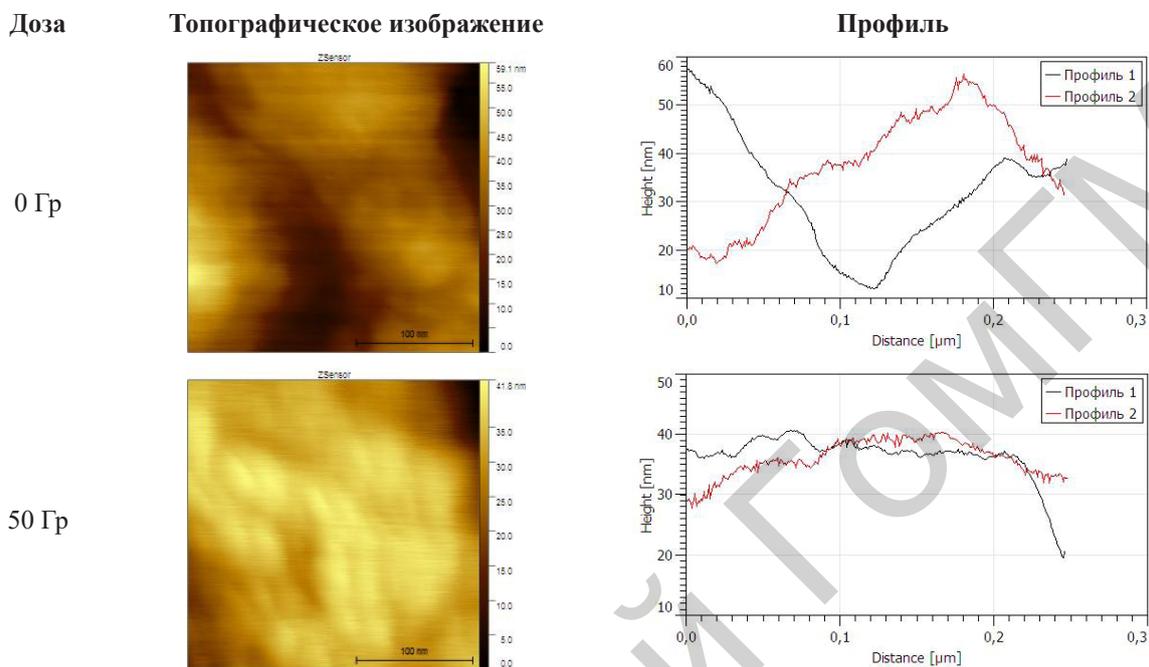


Рисунок 1 – Типичные топографические АСМ-изображения участков (250 нм×250 нм) поверхности лимфоцитов крыс и их профили в двух взаимоперпендикулярных направлениях

Действие рентгеновского излучения на цельную кровь *in vitro* вызывает статистически значимое уменьшение значения параметра шероховатости поверхности лимфоцитов в сравнении с контрольным образцом ($p < 0,002$, критерий Краскела — Уоллиса с поправкой Бонферрони) в диапазоне доз 1, 25, 50 и 100 Гр, т.е. поверхность клеток на наномасштабном уровне становилась более гладкой (рисунок 2).

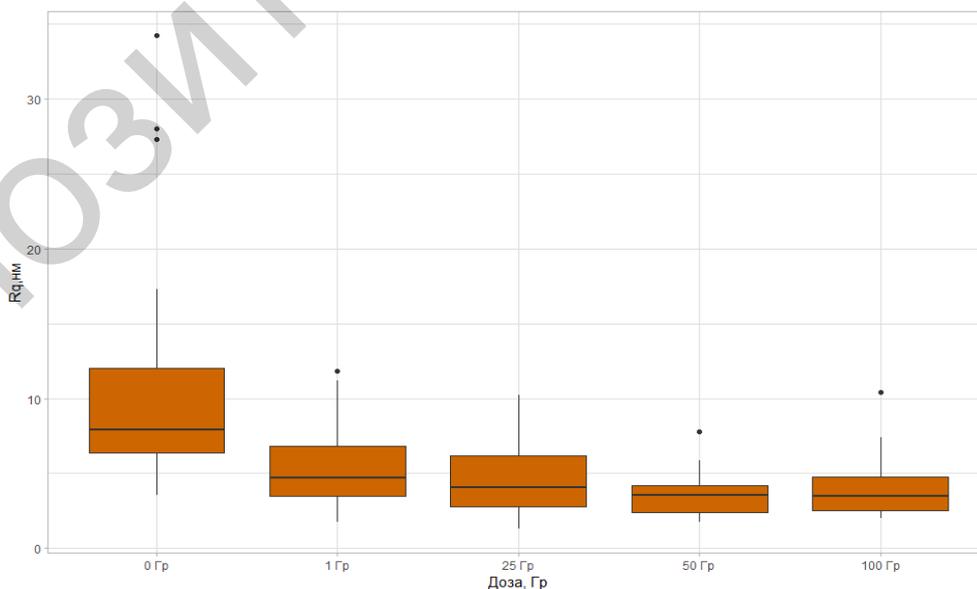


Рисунок 2 — Значения шероховатости топографических АСМ-изображений участков (250 нм×250 нм) поверхности лимфоцитов крыс

Оценку механических свойств проводили с использованием данных канала DMT-Modulus. При построении карт модуля упругости в этом случае используется модель Дерягина-Мюллера-Топорова и данные кривых подвода-отвода зонда относительно поверхности в каждом пикселе карты.

Данная модель применима для зондов с малым радиусом закругления и большой жёсткостью. Средние значения модуля упругости лимфоцитов стареющих крыс представлены в таблице 1. Распределение модуля упругости для контрольного образца хорошо описывается одной функцией Гаусса со средним значением модуля упругости $102,62 \pm 30,26$ МПа ($M \pm \sigma$), что говорит об относительно однородном распределении упругих свойств на участках поверхности клеток. При облучении цельной крови рентгеновским излучением в дозах 1–100 Гр распределение значений модуля упругости становилось неоднородным. Кривая плотности вероятности распределения значений модуля упругости в этих случаях наилучшим образом описывается функцией, представляющей собой сумму двух функций Гаусса (таблица 1). Этот факт говорит о наличии на наномасштабном уровне двух типов участков областей с разными по упругим свойствам: менее или более упругими в сравнении с упругими свойствами контрольных клеток. При этом, максимум разделения поверхности клеток на разные по механическим свойствам наночасти наблюдается после получения поглощённой дозы 1 Гр. С увеличением поглощённой дозы доля относительно мягких областей увеличивается.

Таблица 1 — Значения (в МПа) и процентный вклад (в %) пиков в распределении модуля упругости лимфоцитов крыс без облучения и после облучения цельной крови рентгеновским излучением

| | 0 Гр | 1 Гр | 25 Гр | 50 Гр | 100 Гр |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 пик, МПа | 102,62 (100%) | 80,23 (45,64%) | 89,67 (83,28%) | 88,84 (74,04%) | 89,38 (61,67%) |
| 2 пик, МПа | 0 (0%) | 144,28 (54,36%) | 141,90 (16,72%) | 142,79 (25,96%) | 165,39 (38,33%) |

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют, что рентгеновское излучение вызывает реорганизацию структуры поверхности лимфоцитов на наномасштабном уровне и цитоскелета лимфоцитов. Установлено, что шероховатость наноразмерных (250×250 нм) участков поверхности лимфоцитов значительно уменьшается при действии рентгеновского излучения (1–100 Гр) на цельную кровь *in vitro*. Рентгеновское излучение вызывает неоднородность распределения упругих свойств поверхностного слоя лимфоцитов на наномасштабном уровне, свидетельствующее об изменении структуры кортикального цитоскелета.

Работа выполнена в рамках задания 3.1.2 темы ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда», подпрограмма 3 «Радиация и биологические системы».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kiiо, T. M. Nano-scientific Application of Atomic Force Microscopy in Pathology: from Molecules to Tissues / T. M. Kiiо, S. Park // Int. J. Med. Sci. – 2020. – 17(7) – P. 844–858.