

УДК 57.085.2:[591.176:599.323.45]:537.312.54

**О. В. Шаховская¹, Т. Д. Матвеевкова¹, М. Н. Стародубцева^{1,2},
Е. А. Медведева¹**

¹Государственное научное учреждение
«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»,
²Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь

РЕДОКС-СВОЙСТВА СРЕДЫ ИНКУБАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА, ПРИ ОБЛУЧЕНИИ РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ IN VITRO

Введение

Одним из важных последствий действия ионизирующего излучения на соединительную ткань является радиационный фиброз, развитие которого определяется радиационно-индуцированными изменениями свойств и функций фибробластов. Он представляет собой прогрессирующее фиброзно-склерозирующее поражение тканей с различной клинической симптоматикой в области облучения и является серьёзным и продолжающимся всю жизнь заболеванием, которое, тем не менее, часто можно предотвратить при раннем выявлении и реабилитации [1–3].

Фибробласты являются наиболее изученными клетками соединительной ткани при исследовании радиационного фиброза. Важным звеньями в процессе развития радиационного фиброза являются активация воспаления, переход фибробластов в хронически активированное состояние и их дифференцировка в миофибробласты, в норме играющие важную роль в заживлении ран после травмы [4]. Радиационно-индуцированное изменение состояния фибробластов ведёт к изменению свойств и состава межклеточного вещества, что может способствовать вовлечению более обширных областей в патологический процесс.

Цель

Определить редокс-свойства среды инкубирования первичных культур фибробластов крыс разного возраста, облучённых рентгеновским излучением *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были фибробласты, выделенные из кожи крыс линии Wistar, возрастом 6 и 13 месяцев, методом первичных эксплантов с предварительной ферментативной обработкой. Для культивирования использовали общую процедуру субкультивирования адгезионных клеток млекопитающих в культуре. Из флакона для культивирования удаляли использованную питательную среду DMEM/F-12 и промывали клетки, используя сбалансированный солевой раствор без кальция и магния (примерно 2 мл на 10 см² площади поверхности культуры). Удаляли раствор из флакона и добавляли предварительно подогретый раствор для открепления и дезагрегации клеток (0,05 % трипсина и 50 мМ ЭДТА в фосфатно-солевом буфере; 0,5 мл на 10 см²). Инкубировали при 37°C в течение 5 минут. При отделении от поверхности флакона $\geq 90\%$ клеток добавляли примерно 4 мл на 10 см² монослоя предварительно нагретой культу-

СЕКЦИЯ Медико-биологические науки

ральной среды. Затем переносили клетки в пробирку на 15 мл и осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл культуральной среды и отбирали образец для подсчёта числа клеток. Общее количество клеток определяли с помощью камеры Горяева. Отбирали часть клеточной суспензии, необходимую для достижения требуемой плотности посева клеток (1/5 от конфлюэнтного монослоя), и переносили пипеткой соответствующий объем в новые флаконы для культивирования клеток. Пассажи клеток проводили 3 раза в неделю.

Облучение клеток рентгеновским излучением проводили с использованием рентгеновской установке биологического назначения X-RAD 320 (Precision X-Ray, США) в дозах 1, 3 и 10 Гр (параметры облучения: мощность дозы ~0.86 Гр/мин, напряжение на трубке 100 кВ, сила тока 12,5 мА, фильтр: 2 мм Al, расстояние до объекта 40 см), контрольный образец выдерживался при таких же условиях, исключая воздействие рентгеновского излучения.

Оценку редокс-свойств среды инкубации фибробластов проводили через 24 ч после облучения. Для оценки редокс-параметров среды инкубации фибробластов использовали методику, основанную на люминол-зависимой хемилюминесценции системы с генератором свободных радикалов – органическим азосоединением АБАП [5] с небольшими изменениями. Кинетику хемилюминесценции записывали с помощью многофункционального планшетного ридера Tecan Infinite M200. Все измерения проводили при температуре 37 °С. Были использованы следующие реагенты: люминол, 2,2'-азобис (2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП), натрий-фосфатный буфер (PBS). Кинетическую кривую хемилюминесценции аппроксимировали с помощью логистической функции:

$$y = A_0 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (1)$$

где A_1 – начальное значение интенсивности; A_2 – конечное (максимальное) значение интенсивности; x_0 – точка перегиба кривой; p – степень. Пример, показывающий смысл входящих в формулу постоянных, представлен на рисунке 1.

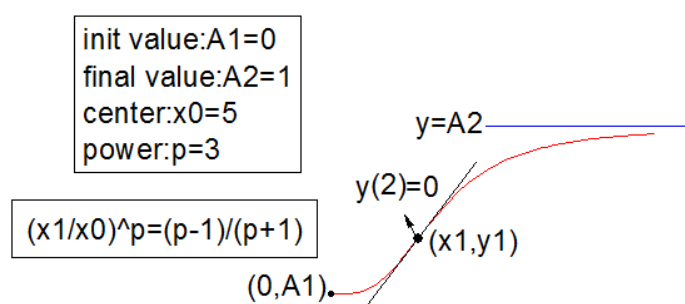


Рисунок 1 – Пример анализа S-образной экспериментальной кривой кинетики хемилюминесценции с помощью логистической функции

Для анализа кинетики хемилюминесценции в системе АБАП + люминол + культуральная среда использовали 2 параметра: x_0 , зависящий, в основном, от антиоксидантных свойств системы; p , связанный со способностью системы продуцировать АФК.

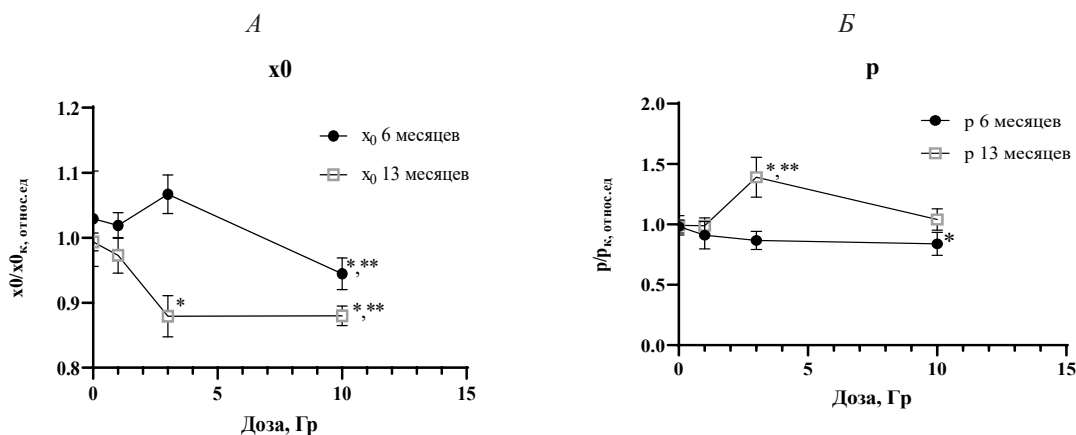
Статистический анализ данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2016, GraphPad Prism 8. Оценивали нормальность распределения признака методами Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Данные статистического анализа представлены в виде медианы и границ интерквартильного интервала: Me (Q1;Q3). Использован тест Краскела–Уоллиса ($p < 0,001$).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ параметров редокс-свойств среды инкубирования культивирования фибробластов крыс 6 месяцев и фибробластов крыс 13 месяцев, облучённых рентгеновским излучением *in vitro*, позволил выявить важные закономерности изменения свойств межклеточной среды фибробластов с дозой облучения.

На рисунке 2 А, В показано изменение параметра x_0 . Этот параметр, зависит как от антиоксидантных свойств систем – он увеличивается с увеличением начальной лаг-фазы, связанной с антиоксидантной ёмкостью клеточной среды фибробластов, так и прооксидантных свойств системы – параметр уменьшается с увеличением скорости нарастания производства АФК в системе. Для молодых крыс 6 месяцев (рисунок 2 А) существенное уменьшение параметра имеет место при высоких, более 5 Гр и выше, значений поглощённой дозы. Однако в диапазоне доз от 1 до 3 Гр параметр возрастает, что говорит об увеличении антиоксидантных свойств. Из литературы известно что, при поглощённых дозах 0–6 Гр повышается радиорезистентность клеток. Для крыс в возрасте 13 месяцев (рисунок 2 А) наблюдается значительное снижение значений параметра после облучения рентгеновским излучением в диапазоне поглощённой дозы от 1 и до 3 Гр, что свидетельствует, о значительном ослаблении антиоксидантных свойств среды инкубирования фибробластов.

На рисунке 2 Б представлены зависимости параметра p от поглощённой дозы для среды инкубирования фибробластов крыс 6 и 13 месячного возраста. Для крыс 13 месяцев (рисунок 2 Б) наблюдается увеличение значений параметра при поглощённых дозах от 1 до 3 Гр, что говорит о росте производства АФК в среде инкубации фибробластов крыс старшего возраста. В диапазоне доз от 3 Гр до 10 Гр наблюдается снижение параметра для обоих возрастов крыс, что говорит о радиационно-индуцированном подавлении активности фибробластов.



Примечание. $p < 0,01$; тест Краскела–Уоллиса: * – в сравнении с 0 Гр, ** – в сравнении с 1 Гр, *** – в сравнении с 3 Гр.

Рисунок 2 – Зависимость параметров кинетики хемилуминесценции от поглощённой дозы для клеточной среды фибробластов крыс разного возраста

Выводы

С помощью метода люминол-зависимой хемилюминесценции системы с АБАП выявлены возрастные особенности активности фибробластов кожи дермы в отношении выделения в окружающую среду редокс-активных соединений при действии рентгеновского излучения в дозе до 10 Гр включительно. Полученные данные помогут глубже понять механизмы непрямого действия ионизирующего излучения на соединительные ткани, основным клеточным компонентом которых являются фибробласты.

Работа выполнена в рамках задания «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*» «Природные ресурсы и окружающая среда 3.01» ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда», подпрограмма 3 «Радиация и биологические системы» на 2021–2025 год.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ashokkumar, M. Materials science perspective of multifunctional materials derived from collagen / M. Ashokkumar, P. M. Ajayan // International Materials Reviews. – 2021. – Vol. 66, № 3. – P. 160–187.
2. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy / J. M. Straub [et al.] // Journal of cancer research and clinical oncology. – 2015. – Vol. 141, № 11. – P. 1985–1994.
3. Radiation fibrosis syndrome: The evergreen menace of radiation therapy / A. Purkayastha [et al.] // Asia-Pacific journal of oncology nursing. – 2019. – Vol. 6, № 3. – P. 238–245.
4. Kosmacek, E. A. Adipocytes protect fibroblasts from radiation-induced damage by adiponectin secretion / E. A. Kosmacek, R. E. Oberley-Deegan // Scientific reports. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 1–12.
5. Изменения в кинетике хемилюминесценции плазмы как мера системного окислительного стресса в организме человека / М. М. Созарукова [и др.] // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 337–344.

УДК 616-007.1-053.31

Е. К. Шестерина¹, Т. М. Бернадская², Д. В. Лашкевич¹

¹*Учреждение образования*

«Гомельский государственный медицинский университет»,

²*Учреждение*

«Гомельская областная клиническая больница»,

г. Гомель, Республика Беларусь

СТРУКТУРА ВРОЖДЕННЫХ АНОМАЛИЙ РАЗВИТИЯ У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Введение

Врожденные аномалии развития плода – одно из самых серьезных осложнений беременности, которое выходит на первое место среди причин, приводящих к детской инвалидности и смертности. Причины, вызывающие формирование врожденных пороков развития разнообразны. С одной стороны, к этому может привести наследственность, когда у будущих родителей есть отклонения в хромосомном наборе. С другой стороны, этому может способствовать влияние различных вредных факторов, таких, как, инфекции, курение, употребление алкоголя, наркотики, недостаток питательных веществ в рационе беременной женщины и т. д. [1].

В зависимости от распространенности пороки развития могут быть: изолированными (аномальное развитие одного единственного органа); системными (несколько по-