

организмов достигнуто (на основе анализа евклидовых расстояний между кластерами) между кластерами С1 и С4, С3 и С4, покоящимися и некротическими клетками и между апоптотическими и некротическими клетками, соответственно. Меньшая степень различия была между кластерами С1 и С2/С3, т.е. покоящимися клетками и клетками в состоянии активации или апоптоза, соответственно.

Заключение

Наши данные показывают возможность автоматического анализа состояния и программ гибели лимфоцитов на основе набора параметров структурных и механических свойств клеток (параметры морфологии клеток и параметры наноструктурных и наномеханических свойств поверхности лимфоцитов), получаемых с использованием атомно-силовой микроскопии.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда», подпрограмма «Радиация и биологические системы» задание 3.01.2 «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*».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nanostructure and nanomechanics of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis. / M. Hu [et al.] // J. Biomech. – 2009. – Vol. 42, № 10. – P. 1513–1519.

УДК 537.312.54:[591.176:599.323.45]

***И. А. Челнокова¹, А. Н. Шклярова¹, Т. Д. Матвеевкова¹,
М. Н. Стародубцева^{1,2}***

¹*Государственное научное учреждение
«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»,
«Институт радиобиологии НАН Беларуси»,*

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

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРНЫЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫС

Введение

Ионизирующее излучение является одной из важных физических факторов, имеющих множество применений в диагностике и лечении разного рода заболеваний. Оно может оказывать разрушительное действие на живые клетки или ткани или приводить к нарушению их функций. Влияние рентгеновского облучения в относительно высоких дозах (30, 60, 70, 80 Гр) снижает выживаемость, пролиферацию, миграцию фибробластов [1]. Характерными особенностями изменений ткани и клеток являются изменения их механических свойств. Существуют различные методы оценки механических свойств клеток, среди которых атомно-силовая микроскопия (АСМ) занимает особое

СЕКЦИЯ Медико-биологические науки

положение. С помощью АСМ получают не только трёхмерный образ поверхности отдельных клеток и малых участков их поверхности с нанометровым разрешением, но и записывают карты распределения механических свойств (упругих и адгезионных) поверхностного слоя клеток, позволяющие, например, оценить структуру кортикального цитоскелета и его состояние [2]. Анализ параметров механических свойств поверхности фибробластов на микро- и наноуровнях с помощью АСМ при действии рентгеновского излучения позволит оценить состояние их цитоскелета и их способность взаимодействовать с другими клетками и межклеточным матриксом, что будет способствовать пониманию механизмов радиационно-индуцированных патологических изменений соединительных тканей, основным клеточным компонентом которых являются фибробласты.

Цель

Установление индикаторов патологических изменений структурных и механических свойств фибробластов, связанных с действием ионизирующего (рентгеновского) излучения, в экспериментальных моделях *in vitro* с целью разработки критериев оценки радиационно-индуцированных патологических изменений тканей внутренней среды.

Материалы и методы исследования

Фибробласты выделяли из кожи крыс линии Wistar (возраст – 6 месяцев) методом первичных эксплантов с предварительной ферментативной обработкой [3]. Клетки культивировали в питательной среде DMEM/F-12 и промывали сбалансированным солевым раствором без кальция и магния. Для открепления и дезагрегации клеток добавляли предварительно подогретый раствор 0,05 % трипсина и 50 мМ ЭДТА в фосфатно-солевом буфере с инкубацией при 37°C в течение 5 минут. Клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 минут. Пассажи клеток проводили 3 раза в неделю. Облучение культуры клеток проводили на рентгеновской установке биологического назначения X-RAD 320 (Precision X-Ray, США) с напряжением на трубке 100 кВ, расстоянием до объекта 40 см, и мощностью дозы ~0,86 Гр/мин в дозах 1, 3 и 10 Гр. Контрольный образец выдерживался при таких же условиях, исключая воздействие рентгеновского излучения. Фибробласты фиксировали через 24 ч. после облучения в 2 % растворе глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере (20 мин) с последующей отмывкой деионизированной водой и высушивали в ламинарном потоке воздуха (0,42 м/с) при комнатной температуре. АСМ-сканирование поверхности фиксированных фибробластов проводили с помощью атомно-силового микроскопа Bruker BioScope Resolve в режиме PeakForce QMN in Air (частота – 0,5 Гц, область сканирования – 1 мкм × 1 мкм, разрешение – 256 × 256 пикселей, пиковая нагрузка – 290 пН) иглой-зондом SCANASYST-AIR с радиусом закругления 2 нм. Обработку полученных изображений проводили в программе NanoScopeAnalysis 1.9. Статистический анализ данных проводили с помощью on-line статического калькулятора StatisticalKingdom. Построение графиков осуществляли в программе OriginPro (версия 2019b).

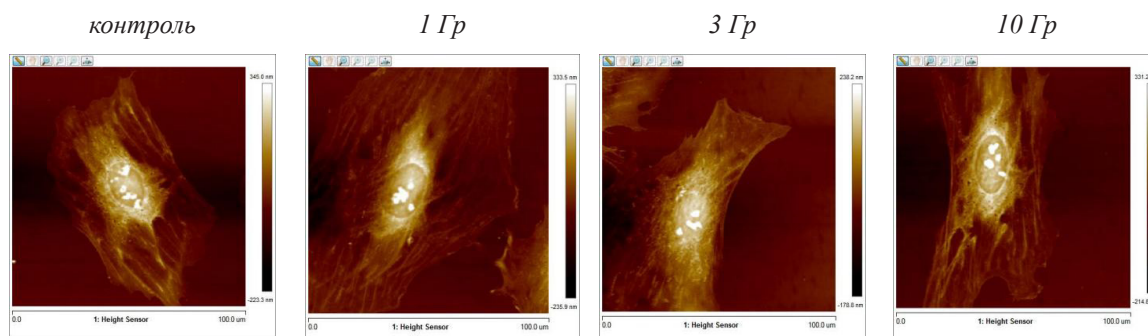
Результаты исследования и их обсуждение

Для сканирования малых участков клеточной поверхности выбирали одиночные клетки типичной для фибробластов морфологии (рисунок 1).

Оценку шероховатости (Rq) поверхности на малых участках размером 1 мкм×1 мкм проводили с использованием их топографических изображений (канал Height) после использования опции Flatten (удаляет нежелательные элементы из линий

СЕКЦИЯ Медико-биологические науки

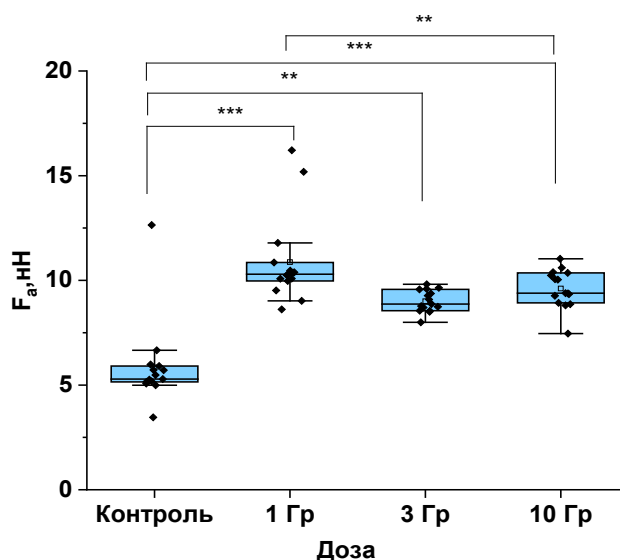
сканирования, например, шум, изгиб и наклон). Действие рентгеновского излучения на клетки *in vitro* не вызывало статистически значимых отличий по параметру шероховатости поверхности фибробластов в дозах 1, 3 и 10 Гр в сравнении с контрольным образцом ($p > 0,05$, критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Бонферрони), т. е. значительных изменений структурных свойств поверхности фибробластов на наномасштабном уровне не наблюдалось.



Примечание: размер сканирования 100 мкм × 100 мкм, разрешение 256 × 256 пикселей

Рисунок 1 – Типичные топографические изображения фибробластов дермы крыс в контрольной и опытных клеточных культурах, облучённых рентгеновским излучением в разных дозах

Адгезионные свойства поверхности фибробластов оценивали с использованием параметра сила адгезии (F_a), рассчитываемого на основе данных канал Adhesion. Применение рентгеновского излучения в дозах 1–10 Гр приводило к статистически значимому увеличению средних значений силы адгезии в сравнении со значением параметра для контрольного образца ($p < 0,01$, критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Бонферрони) (рисунок 2).

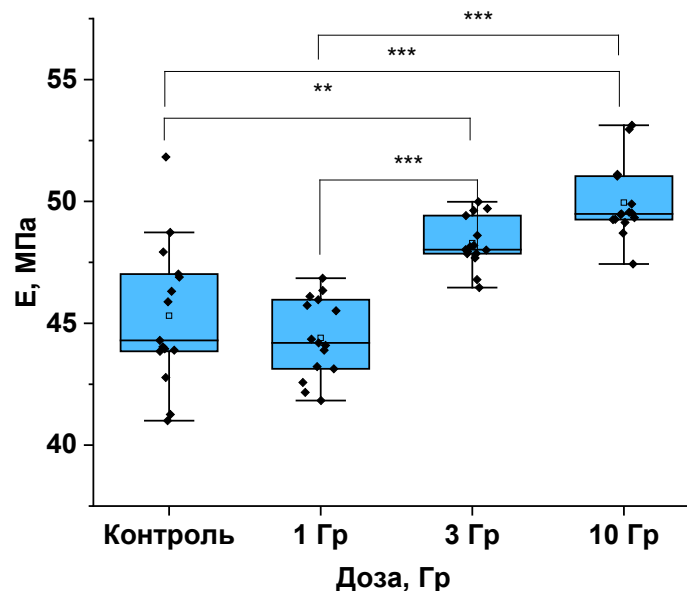


Примечание: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Рисунок 2 – Сила адгезии поверхности фибробластов контрольной культуры и культур, облучённых рентгеновским излучением в разных дозах

СЕКЦИЯ Медико-биологические науки

Модуль упругости (E) оценивали, анализируя данные канала DMT Modulus, содержащие численные значения модуля, оцениваемого на основе модели Дерягина–Мюллера–Топорова. При облучении культуры фибробластов крыс рентгеновским излучением *in vitro* в дозах 1, 3 и 10 Гр имеет место дозозависимое увеличение жёсткости их поверхности (рисунок 3).



Примечание: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Рисунок 3 – Модуля упругости поверхности фибробластов контрольной культуры и культур, облучённых рентгеновским излучением в разных дозах

При этом, увеличение параметра адгезионных свойств поверхности фибробластов наблюдалось при более низкой поглощённой дозе (1 Гр), в сравнении с увеличением модуля упругости.

Заключение

Проведено изучение структурных и механических параметров микромасштабных участков поверхности фибробластов дермы крыс методом атомно-силовой микроскопии. Результаты исследования свидетельствуют о зависимости параметров упругих и адгезионных свойств поверхности фибробластов дермы крыс от дозы облучения рентгеновским излучением *in vitro* в дозах 1–10 Гр, что может свидетельствовать о реорганизации кортикального актинового цитоскелета под действием ионизирующего излучения в указанном диапазоне доз и изменении их способности контактировать с другими клетками и структурами соединительной ткани.

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. Irradiación subletal de fibroblastos murinos 3T3 con rayos X para su utilización como capa celular alimentadora / A. Ramírez-Téllez [et al.] // Tecnología en Marcha. Edición especial Ingeniería de Tejidos. – 2014. – Vol. 28, Suppl.1. – P. 15–26.

2. Atomic force microscopy for cell mechanics and diseases / S. Pérez-Domínguez [et al.]. – 2020. – V. 26. – P. 101–109. – doi:10.1515/nf-2020-0001.

3. Seluanov, A. Establishing Primary Adult Fibroblast Cultures from Rodents / A. Seluanov, A. Vaidya, V. Gorbunova // Journal of visualized experiments. – 2010. – № 44. – Art. 2033. – doi: 10.3791/2033.

УДК 614.875+599.323.4+611.018

Н. В. Чуешова, Е. А. Щурова

Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»,

г. Гомель, Республика Беларусь

ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

Введение

С развитием передовых телекоммуникационных технологий, и, соответственно с ростом числа пользователей беспроводной сотовой связи, увеличивается электромагнитная нагрузка на окружающую среду, в связи с чем, растет обеспокоенность о влиянии данного вида излучения на здоровье. В настоящее время Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ, WHO – World Health Organization) признано, что электромагнитные поля (ЭМП) искусственного происхождения являются одними из наиболее опасных и значимых для здоровья человека факторов, оказывающих выраженное биологическое действие. Важно отметить, что с 2011 года ЭМП отнесено Международным агентством по исследованию рака (Agency for Research on Cancer – IARC) к категории «возможно канцерогенных для человека» – группа 2B по критериям Хилла.

Основываясь на знании о высокой чувствительности стволовых клеток к влиянию различных стресс-факторов, например, воздействию ионизирующего излучения, представляется актуальным изучение влияния ЭМП устройств Wi-Fi на морфофункциональное состояние клеток костного мозга, обладающих высоким пролиферативным потенциалом.

Цель

Целью исследования являлась экспериментальная оценка морфофункционального состояния клеток костного мозга в условиях хронического воздействия электромагнитного поля устройства Wi-Fi (2,45 ГГц).

Материалы и методы исследования

Исследования были выполнены на 14 белых крысах-самцах линии Вистар в возрасте 50–52 сут и массой $160,14 \pm 1,44$ г на начало эксперимента. Все животные были разделены на две группы ($n=7$): 1. – Контроль; 2. Wi-Fi – животные, подвергнутые воздействию ЭМП устройства Wi-Fi до 12-месячного возраста.

Все животные содержались в оптимальных условиях (с обеспечением температурного, светового режима, полноценного питания, защиты от инфекций, шума и других помех окружающей среды) вивария Института радиобиологии НАН Беларуси согласно