

Таким образом, медленное течение процесса канцерогенеза у пациентов с раком желудка приводит к относительно небольшим изменениям механических свойств мембраны клеток СОЖ и формированию нескольких кластеров клеток. Высокая динамика развития COVID-19 и системный характер заболевания приводят к более выраженным изменениям механических свойств мембраны эритроцитов и изменению свойств поверхности всех эритроцитов.

Заключение

Анализ механических свойств мембраны исследуемых клеток у пациентов с раком желудка и COVID-19 свидетельствует о наличии связи характера изменения и распределения показателя силы трения F_1 с особенностями течения рассматриваемых патологий. Таким образом, метод атомно-силовой микроскопии обладает высоким потенциалом в аспекте исследования механизмов течения соматических и инфекционных патологий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рак желудка. Клинические рекомендации / Н.С. Бесова [и др.] // Journal of Modern Oncology. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 541–571.
2. *Rodriguez-Brenes, I. A.* Tumor growth dynamics: insights into evolutionary processes / I. A. Rodriguez-Brenes, N. L. Komarova, D. Wodarz // Trends in Ecology & Evolution. – 2013. – Vol. 28, № 10. – P. 597–604.
3. Atomic Force Microscopy: In Sickness and in Health / S.-V. Kontomaris [et al.] // Scanning. – 2019. – Vol. 2019. – P. 6149247.
4. АСМ-диагностика патологии эритроцитов на основе физико-механического образа клеточной поверхности / М. Н. Стародубцева [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 2 (44). – С. 99–104.
5. Механические свойства поверхности клеток эпителия желудка у пациентов с онкологической патологией / А. С. Шафорост [и др.] // Проблемы Здоровья и экологии. – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 152–159.

УДК 537.312.54:[569.323.4:616.24-006.327-092.9]

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

¹Государственное научное учреждение
«Институт радиобиологии НАН Беларуси»,

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

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКОГО КРЫСЫ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ВЕРХНЕЙ ЧАСТИ ТУЛОВИЩА РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Введение

Ионизирующее излучение вызывает преждевременное старение клеток, тканей и организма в целом, притом степень выраженности зависит от дозы облучения [1]. Для экспериментальной модели первичной культуры фибробластов и облучении *in vitro* было показано, что облучение молодых фибробластов 2 Гр рентгеновским излучением вызывает в течение 24 ч экспрессию генов и активацию клеточных сигнальных путей, что более соответствует процессам, имеющим место при нерадиационно-индуцированном старении клеток, чем облучение фибробластов рентгеновским излучением в меньшей дозе (5 сГр). При облучении в дозе 2 Гр в фибробластах имеет место регуляция экспрессии генов, ответственных за осуществление клеточной смерти, p53-опосредо-

ванного ответа клеток на повреждение ДНК, остановки клеточного цикла и аутофагии. В то же время экспрессия генов, вовлеченных в репарацию ДНК и митоз, подавлена [1]. В литературных источниках показано, что стареющие фибробласты имеют сниженную активность немышечного миозина II, повышенное содержание актина и сниженное содержание промежуточных филаментов, что вызывает снижение механического напряжения цитоскелета в целом [2]. Как известно, изменения механических свойств ткани и клеток является характерной особенностью их старения. Ответы клеток при облучении *in vivo*, всего организма или его части, являются более сложными, так как в них вовлекаются различные системы организма. Однако изучение изменения свойств фибробластов, являющихся основой клеточного компонента соединительной ткани, на облучение организма ионизирующим излучением вызывает наибольший интерес в связи с необходимостью детального понимания молекулярно-клеточных механизмов действия радиационного фактора многих диагностических и терапевтических медицинских процедур на человека. Существуют различные методы оценки механических свойств клеток, среди которых атомно-силовая микроскопия (АСМ) занимает особое положение. С помощью АСМ получают не только трехмерный образ поверхности отдельных клеток и их участков с высоким разрешением, но и карты распределения механических свойств поверхностного слоя клеток, позволяющие оценить структуру кортикального цитоскелета и его состояние.

Цель

Изучение свойств фибробластов, изолированных из легкого крыс, после облучения верхней части туловища животного рентгеновским излучением в дозе 1 Гр и ниже.

Материал и методы исследования

До начала эксперимента было получено одобрение комитета по этике УО «Гомельский государственный медицинский университет» на проведение исследования (протокол № 2 от 24.03.2021). Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 года. Однократное облучение верхней части туловища самцов крыс линии Wistar (возраст 14 мес.) проводили с использованием рентгеновского аппарата биологического назначения X-Rad 320 Precision X-ray Inc (U=50 кВ, I=12,5 мА, P= 2,57 сГр/мин, фильтр № 1 (2 мм Al) в дозах 0,1 Гр и 1 Гр расстояние до объекта – 50 см). Было 5 крыс в контрольной группе и по 4 крысы в группах животных, облученных в дозах 0,1 и 1 Гр. Выведение животных из эксперимента проводили на 21 сутки после облучения. Долю легкого промывали дважды в растворе HBSS, затем измельчали ножницами и помещали в эппендорф, содержащий 0,1% раствор коллагеназы (на 30 мин при температуре 37°C) с последующей отмывкой в растворе Хэнса. Ферментативное расщепление проходило с использованием 0,25% раствора трипсина при 37°C с последующим центрифугированием. После этого доли легкого помещали в 6-луночный планшет вместе со средой DMEM/F-12 с добавлением 10% сыворотки и 1% раствор антибиотик-антимикотика до полного выхода клеток. Через день производили замену среды. По достижению 75% конфлюентности культуры осуществляли описанный ниже пассаж. В данном эксперименте использовали второй пассаж клеток.

Клетки, находящиеся на дне чашек Петри, сканировали с использованием атомно-силового микроскопа Bruker Bioscope Resolve (игла-зонд NTG 03) в режиме записи силовых кривых Force Volume в жидкости. Сканирование живых клеток проводили

над их ядерной областью (размер области – 15 мкм×15 мкм, разрешение – 20×20 пикселей). Полученные силовые кривые анализировали с использованием модели Снедонна для оценки величины модуля упругости E , измеряемого в Па, и силы адгезии, измеряемой в нН.

Флуоресцентные изображения получали на инвертированном световом микроскопе Axio Observer 3 (Zeiss) со светодиодным источником света Colibri 7 для многоканальной флуоресценции, увеличение объектива – ×40. Запись изображений проводили в программе Zen Blue. Клетки в нативном состоянии фиксировали раствором 3,7% формальдегид, в течение 10 минут при комнатной температуре. Для премеабиллизации использовали раствор клеточного детергента 0,1% Triton в течение 5 минут. Для окраски F-актина клетки инкубировали с фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Phalloidin 488 (Cayman) (1:50) в течение 1 часа при комнатной температуре. Для окраски коллагена использовали антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 647 (1:100) (Abcam) (инкубация 30 мин. при комнатной температуре). Ядра клеток окрашивали монтажной средой с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Abcam).

Флуоресцентные изображения были проанализированы с помощью программного обеспечения FIJI (версия 2.0.0-rc-49/1.51a) путем выбора одной клетки за раз на изображении и измерения площади, интегрированной плотности и среднего значения серого. Используя расчет для скорректированной общей флуоресценции клеток, (CTCF) = интегрированная плотность – (площадь выбранной клетки × средняя флуоресценция фоновых показаний).

Данные представлены в виде медианы и границ интерквартильного интервала. Множественный сравнительный анализ данных выполняли с использованием непараметрического теста ANOVA и апостериорного теста (тест Краскелла – Уоллиса и тест Данна).

Результаты исследования и их обсуждение

Доза 1 Гр считается малой в экспериментах при облучении культур клеток *in vitro*, в то время как доза 0,1 Гр является верхним пределом области малых доз в медицине. С учетом того, что полулетальная доза для крыс превышает по величине полулетальную дозу для человека, доза 0,1 Гр является для крыс малой.

Для клеток первичных культур фибробластов, изолированных из необлученных и облученных животных, было исследовано состояние актинового цитоскелета и производство ими белка коллагена (рисунок 1). Общее содержание филаментного актина не отличалось в фибробластах крыс, облученных в дозе 0,1 Гр и контроле. Содержание филаментного актина значительно увеличено в фибробластах крыс после облучения животных в дозе 1 Гр (рисунок 1а). Общая оценка средних значений количества коллагена в фибробластах крыс, не облученных и облученных в дозах 1 Гр и ниже, не выявила существенных различий между ними. Однако данные для крыс после облучения в дозе 1 Гр сильно неоднородны и могут говорить о наличии двух субпопуляций клеток с разным уровнем производства коллагена: с высокой и низкой скоростью производства. При моделировании распределения данных по производству коллагена в этой группе суммой двух гауссовских субпопуляций мы получили, что примерно 63% клеток производят коллаген с эффективностью, сравнимой с эффективностью контрольной группы, а примерно 37% клеток имеют повышенный в 3 раза уровень производства коллагена. Так, распределение интенсивности флуоресцентного красителя на коллаген в контроле имеет один максимум ($1,00 \pm 1,00$ в отн. ед. по отношению к среднему значению контрольного образца, $R^2=0,9981$), а в образце 1 Гр два максимума: $1,10 \pm 1,18$ отн. ед. (63%); $3,16 \pm 2,46$ отн. ед. (37%); $R^2=0,9998$.

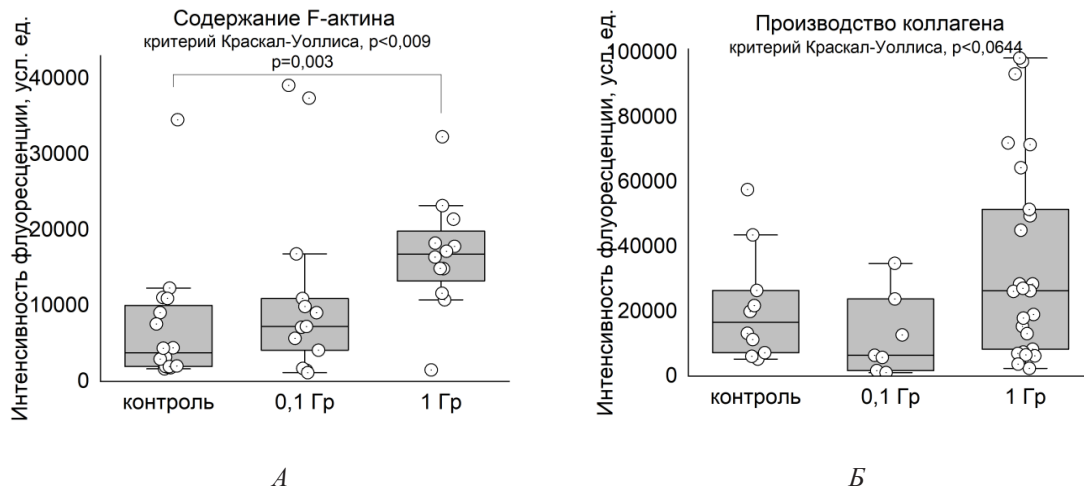


Рисунок 1 – Содержание F-актина и производство коллагена в фибробластах крыс:
 А – без облучения рентгеновским излучением верхней части туловища;
 Б – после облучения рентгеновским излучением верхней части туловища

При оценке методом атомно-силовой микроскопии параметров механических свойств поверхности фибробластов необлученных и облученных крыс выявлено значительное ослабление упругих свойств поверхностного слоя фибробластов крыс после облучения в дозе 0,1 Гр. Различий в средних значениях параметра упругих свойствах фибробластов необлученного контроля и облученных крыс в дозе 1 Гр не выявлено. Более того, средние значения параметра адгезионных свойств после облучения крыс в дозах 0,1 и 1 Гр не менялись (рисунок 2).

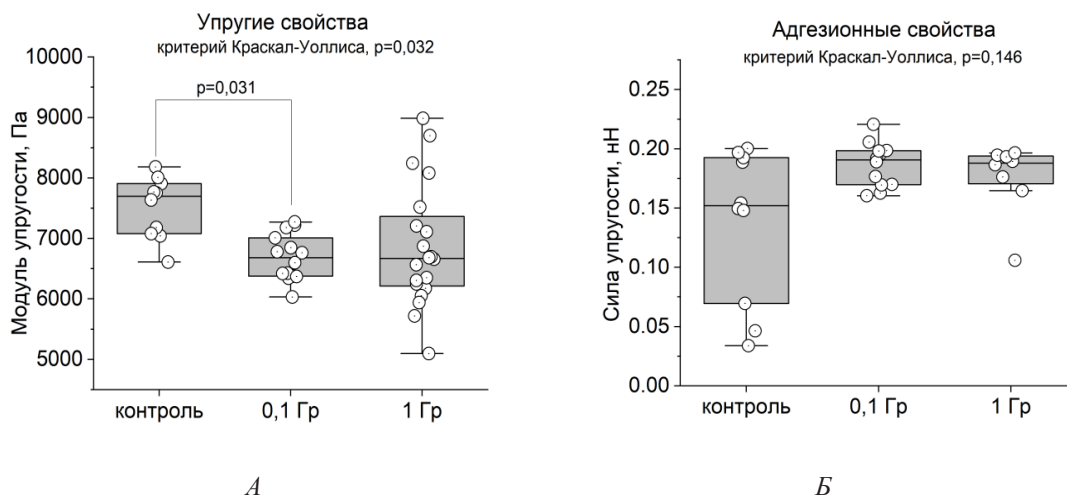


Рисунок 2 – Параметры упругих и адгезионных свойств поверхности фибробластов крыс:
 А – без облучения рентгеновским излучением верхней части туловища;
 Б – после облучения рентгеновским излучением верхней части туловища

Однако распределение модуля упругости фибробластов крыс после облучения в дозе 1 Гр было неоднородным с повышением доли более жестких в сравнении с контролем клеток, что в целом согласуется с данными о повышении общего содержания филаментного актина в фибробластах после облучения крыс в дозе 1 Гр в сравнении с контрольными образцами. Повышение жесткости поверхности клеток и синтеза коллагена может свидетельствовать о трансформации фибробластов в миофибробласты, которые характеризуются чрезмерным синтезом и секрецией коллагена I и III типов,

снижением продукции ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс, и экспрессией α -актина гладкомышечных клеток, который способствует сборке в клетках структур стрессовых волокон [3].

Заключение

В результате модельного эксперимента установлено, что при дозе 0,1 и 1 Гр локального облучения организма после 3-недельного постлучевого периода сохраняются значительные изменения состояния актинового цитоскелета фибробластов в сравнении с необлученным организмом, что ведет к изменению механических свойств фибробластов. При дозе облучения 0,1 Гр для 14-месячных крыс имеет место ослабление механической жесткости клеточной мембраны, что изменяет ряд клеточных процессов (например, способствует процессам экзоцитоза). При дозе облучения 1 Гр, вероятно, имеет место начало трансформации фибробластов в миофибробласты, для которых характерно повышение содержания актиновых элементов цитоскелета (стрессовых фибрилл), повышение жесткости клеток и уровня производства коллагена. Полученные данные позволяют углубить понимание механизмов развития постлучевых патологических состояний, проявляющихся в соединительной ткани после 3-недельного постлучевого периода.

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. Replicative and radiation-induced aging: a comparison of gene expression profiles / A. M. Aliper [et al.] // *Aging* (Albany NY). – 2019. – Vol. 11(8). – P. 2378–2387. doi: 10.18632/aging.101921.
2. The weakness of senescent dermal fibroblasts / L. Rebehn [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2023. – Vol. 120(34). – P. 2301880120. doi: 10.1073/pnas.2301880120.
3. Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast / A van Caam [et al.] // *Front Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2452. doi: 10.3389/fimmu.2018.02452.