

вать периодические подъемы заболеваемости не только в последние десятилетия исключительно на территории Республики Беларусь, но и ранее в разных популяциях в процессе своей эволюции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермолович, М. А. Генетические варианты парвовируса В19, циркулирующие в Беларуси в течение эпидемического цикла инфекции (2005–2016) / М. А. Ермолович, Г. В. Семейко, Е. О. Самойлович // Вест. Нац. акад. Наук Беларуси. Сер. Мед. Наук. — 2019. — № 1. — С. 35–45.
2. Transcription-associated mutational pressure in the Parvovirus B19 genome: Reactivated genomes contribute to the variability of viral populations / V. V. Khrustalev [et al.] // J. Theor. Biol. — 2017. — Vol. 435. — P. 199–207.
3. Биохимические особенности геноварианта 1a2 парвовируса В19, доминирующего во время подъемов заболеваемости в Беларуси / М. А. Ермолович [и др.] // Вест. Нац. акад. Наук Беларуси. Сер. Мед. Наук. — 2020. — № 2. — С. 211–220.
4. A comprehensive RNA sequencing analysis of the Adeno-associated virus (AAV) type 2 transcriptome reveals novel AAV transcripts, splice variants, and derived proteins / C. Stutika [et al.] // J. Virol. — 2016. — Vol. 90. — P. 1278–1289.
5. Identification of recombination in the NS1 and VPs genes of parvovirus B19 / H. Shen [et al.] // J. Med. Virol. — 2016. — Vol. 88. — P. 1457–1461.

УДК 537.534.35:[576.524:547.962.9:616-097.3]

АНАЛИЗ БОЛЬШИХ МАССИВОВ ДАННЫХ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ АДГЕЗИОННЫЕ И УПРУГИЕ СВОЙСТВА КЕРАТИНОЦИТОВ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С АНТИТЕЛАМИ

**Шклярова А. Н.¹, Цуканова Е. В.¹,
Надыров Э. А.², Стародубцева М. Н.^{1,2}**

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

Введение

Оценка механических свойств отдельных клеток стала возможной с развитием локальных методов измерения, таких как атомно-силовая микроскопия (АСМ). С момента открытия основного принципа АСМ были исследованы различные типы клеток, например, клетки крови или клетки эндотелия при различных условиях [1–3]. Кератиноциты являются основным типом клеток, присутствующих в эпидермисе, которые способны продуцировать структурные белки матрикса, такие как филаггрин, инволюкрин, лорикрин и кератины. Большинство белков промежуточных филаментов содержат кератины типа I и типа II. Было показано, что перестройка кератинового цитоскелета имеет решающее значение для обеспечения механических свойств клеток при адгезии клеток и клеточного матрикса, ключевого механизма подвижности клеток во время заживления ран или воспаления. Хотя клетки эпидермиса важны для формирования физического барьера против факторов окружающей среды, а также для состояния кожи, об их биомеханических свойствах мало известно [4], особенно, об их изменении в процессе взаимодействия клеток с антителами.

Цель

Выявить различие параметров наномеханических свойств микромасштабных участков поверхности кератиноцитов при их взаимодействии с антителами (IgG и анти-CD109 антителами (АТ)) с помощью АСМ карт адгезии и модуля упругости и их математического анализа с использованием языка программирования R.

Материал и методы исследования

Линия кератиноцитов (НАСАТ) культивировали в среде DMEM/F-12 с содержанием L-глутамин (SIGMA, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей

сыворотки (FBS, Life Technologies, США), 10 мМ HEPES (Life Technologies, США), и антибиотиков (100 ед/мл пенициллина, 0,25 мкг/мл сульфата стрептомицина). Клетки выращивали при 37 °С в инкубаторе с 5 % CO₂, затем пересаживали на поверхность чашек Петри с адгезивным покрытием, инкубировали в течение 24 ч, фиксировали раствором 1 % глутарового альдегида, промывали и высушивали на воздухе. Атомно-силовой микроскоп (АСМ) Bruker BioScope Resolve использовался для изучения механических свойств поверхности клеток на воздухе с помощью зонда SCANASYST-AIR (Bruker, $k = 0,4$ Н/м, $R = 2$ нм) в режиме MIROview. Небольшие участки поверхности клеток сканировались в 3 типичных зонах клеток: ядерной, окооядерной и периферической зонах (размер сканирования — 1 мкм × 1 мкм, частота — 0,3 Гц, разрешение — 256 × 256 пикселей. Калибровку зонда проводили перед сканированием образцов клеток контактным методом в соответствии с протоколом производителя микроскопа.

Результаты исследования и их обсуждение

В работе проанализированы АСМ-данные для микромасштабных участков поверхности НАСАТ клеток контрольных, IgG- и IgG+анти-CD109 АТ-обработанных клеток, записанные по каналам «сила адгезии» и «модуль упругости (DMT-модуль)». В режиме сканирования PeakForce QNM модуль упругости в каждом пикселе АСМ-изображения определяется автоматически по результатам анализа линейного сегмента кривой отвода с использованием модели Дерягина — Мюллера — Топорова (DMT). Сила адгезии также записывается автоматически в каждом пикселе АСМ-карты по анализу кривых отвода как сила в точке, где расстояние между кончиком иглы и поверхность минимально. Силы адгезии включают в себя любые силы притяжения между наконечником и образцом на воздухе: силу Ван-дер-Ваальса, электростатические и капиллярные силы. Первичные данные, полученные АСМ Bioscope Resolve Bruker в процессе сканирования по разным каналам, были преобразованы в txt-файлы. Данные для отдельных участков поверхности для ядерной зоны для разных клеток сгруппированы в 3 массива данных: контроль, IgG, IgG + анти-CD109 АТ. Статистический анализ данных из подготовленных txt-файлов был выполнен с использованием языка программирования *R version 4.0.5 (2021-03-31)*. Статистический анализ проводился с использованием пакетов: *cluster_2.1.2*, *factoextra_1.0.7*, *ggpubr_0.4.0*, *tidyr_1.1.3*, *dplyr_1.0.6*, *scales_1.1.1*, *ggplot2_3.3.3*. В связи с тем, что в программе RStudio существует лимит на количество строк двумерного массива данных, равный $2e^{16}$, а объем экспериментальных данных превышал этот лимит, то была применена фильтрация данных с помощью команды `data %>% filter(row_number() %% 3 != 1)`, которая производит удаление каждой третьей строки числового двумерного массива данных, начиная с первой. На рисунке 1 представлены результаты статистического анализа модуля упругости для ядерной зоны. Значимых различий между значениями параметра жесткости поверхности в области ядра клеток НАСАТ после их обработки разными антителами не обнаружено с помощью классического статистического метода.

После уменьшения объема данных были также проанализированы зависимости DMT-модуля от силы адгезии для разных экспериментальных групп. В связи с тем, что распределение данных соответствовало нормальному распределению согласно критерию Шапиро — Уилка ($p > 0,05$), для оценки связи изучаемых параметров был использован корреляционный критерий Пирсона с использованием команды `cor.test()`. Критерий корреляции Пирсона — это метод параметрической статистики, позволяющий определить наличие или отсутствие линейной связи между двумя количественными показателями, а также оценить ее тесноту и статистическую значимость. Так как размер анализируемых массивов данных велик, были получены статистически значимые коэффициенты

корреляции Пирсона (рисунок 2). Однако значения этих коэффициентов пренебрежительно малы и не могут иметь какого-либо практического смысла.

На рисунке 2 представлены также зависимости DMT-модуля от силы адгезии для разных экспериментальных групп в двойном логарифмическом масштабе.

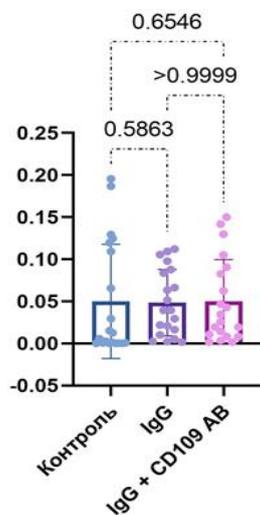


Рисунок 1 — Модуль упругости поверхности высушенных клеток НАСАТ в области ядра после обработки клеток IgG и IgG+анти-CD109 АТ, оцененный на воздухе методом PeakForce QNM (в МПа)

Примечание. Данные представлены как медиана, интерквартильный интервал, максимальные и минимальные значения. Критерий Краскелла — Уоллиса, поправка Бонферрони.

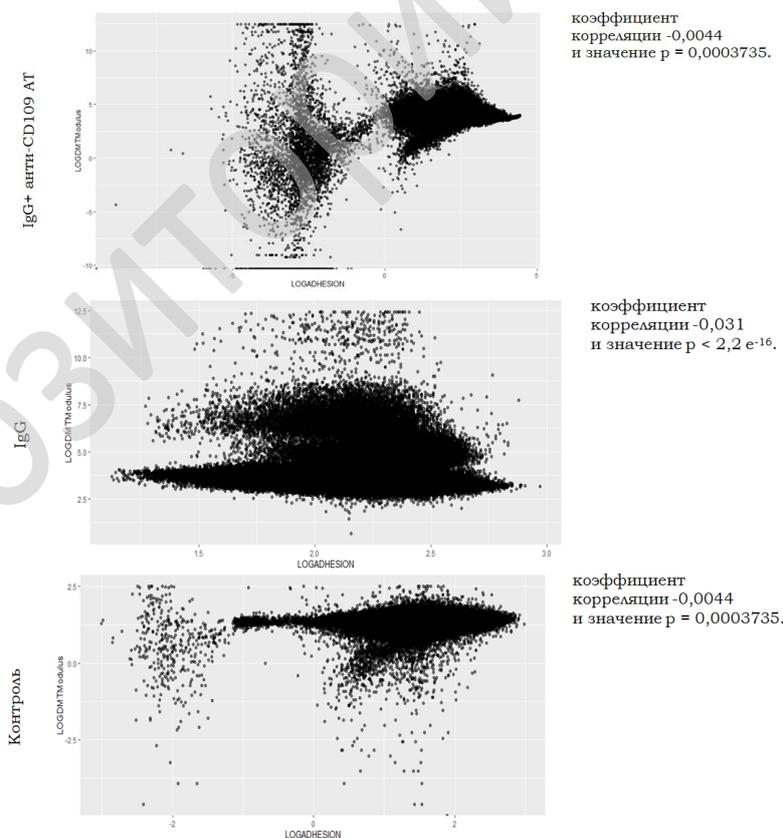


Рисунок 2 — Взаимосвязь модуля упругости и силы адгезии для микромасштабных участков (в области ядра) поверхности НАСАТ клеток разных экспериментальных групп

Визуальный анализ распределения экспериментальных точек в плоскости (сила адгезии, модуль упругости) для разных экспериментальных групп показал наличие резкой неоднородности распределения параметров механических свойств поверхности клеток в контроле, а также увеличение степени неоднородности и образование выраженных кластеров параметров механических свойств после обработки клеток антителами: IgG и IgG+анти-CD109 АТ (рисунок 2). Особенно хорошо заметно наличие двух кластеров значений для поверхности клеток после обработки двумя антителами IgG+анти-CD109 АТ: один кластер содержит точки с низкими значениями силы адгезии и модулем упругости и другой (более многочисленный) — с более высокими значениями силы адгезии и модуля упругости. Анализ топографии поверхности кератиноцитов (в зоне над ядром) этой экспериментальной группы показывает наличие множества тонких выростов, коротких филоподий, концы которых характеризуются низкими значениями силы адгезии и модуля упругости.

Заключение

Использование методов обработки больших массивов данных и статистического анализа при изучении АСМ-карт параметров механических свойств поверхности кератиноцитов после их взаимодействия с антителами позволило выявить особенности распределения этих параметров (формирование выраженных кластеров параметров) на наномасштабном уровне, связанные с типом антител. Дальнейший детальный анализ выявленных кластеров параметров и их сравнение с параметрами кластеров других экспериментальных групп необходимо для более глубокого понимания механизмов изменения структуры поверхности и распределения наномеханических свойств по поверхности клеток НАСАТ после их обработки разными антителами.

Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ (М20КИ-026 «CD109-регулируемые механические свойства эндотелиальных клеток», 2020–2021 гг.)

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние рентгеновского излучения на наномеханические свойства поверхности эритроцитов крыс при гиперхолестериновой диете / И. А. Челнокова [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. — 2021. — Vol. 3. — P. 105–115.
2. Nanomechanical properties of the HUVEC cell surface studied by PeakForce QMN mode of atomic force microscopy / M. N. Starodubtseva [et al.]. — M.: Katowice & Publishing House of University of Technology, Innovative approaches to ensuring the quality of education, scientific research and technological processes, 2020. — Vol. 202. — P. 25–31.
3. Heterogeneity of nanomechanical properties of the human umbilical vein endothelial cell surface / M. N. Starodubtseva [et al.] // Microvasc. Res. — 2021. — Vol. 136. — P. 104–168.
4. The Effect of Anti-aging Peptides on Mechanical and Biological Properties of HaCaT Keratinocytes / T. Kobiela [et al.] // Int. J. Pept. Res. Ther. — 2018. — Vol. 24(4). — P. 577–587.