

изображения с достаточно высокой скоростью, при этом отличаясь помехоустойчивостью; в частности, возможна обработка кадров, на которых зрачок частично закрыт веками.

Разработанная система видеонистагмографии позволит точно фиксировать горизонтальные, вертикальные и круговые движения глаз, а так же реакцию зрачка в ответ на вестибулярные раздражения, регистрировать взаимодействия глаза и века в норме и в патологии, математически обработать данные в режиме реального времени. Отсутствие электродов даст возможность большей экономии времени для обследования.

Литература

1. Склют И.А., Цемахов С.Г. Нистагм – Минск : Вышэй. шк.; 1990.
2. Применение компьютерной электронистагмографии в оценке оптокинетических нистагменных реакций / С.В. Линенко [и др.] // Вестн. оториноларингологии. – 2000. – № 3. – С. 13–16.
3. Левашов, М.М. Нистагмометрия в оценке состояния вестибулярной функции / М.М. Левашов. – Л. : Наука, 1984. – 224 с.
4. Гурский И.С. Разработка программного обеспечения для видеоокулографической регистрации движений глаз. / И.С. Гурский, А.И. Кубарко // Сборник научных работ студентов высших учебных заведений Республики Беларусь «НИРС 2008» / редкол.: А.И. Жук (пред.) [и др.]. – Минск: Изд. Центр БГУ, 2009. – С. 235-236.

СРЕДСТВО И ТЕХНОЛОГИЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

**В.С. Осипович¹, В.П. Шонтя², Т.И. Терпинская³, В.С. Улащик³, С.К. Дик¹,
Е.А. Петрова³, О.Н. Машир¹, К.Д. Яшин¹**

¹ Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники
ул. П. Бровки, 6, БГУИР, каф. ИПиЭ, 220013, Минск, Беларусь, тел. +375 17 2938524
E-mail: seth22@yandex.ru

² Technical University of Moldova, 168, Stefan cel Mare av., MD-2004, Chisinau, Republic of Moldova
E-mail: sontea@mail.utm.md

³ ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Беларусь;
E-mail: terpinskayai@mail.ru

Аннотация.. Наночастицы поглощаются клетками карциномы Эрлиха в условиях *in vitro*, не оказывая цитотоксического эффекта. Мягкая трипсинизация клеток изменяет свойства клеточной мембраны, увеличивая ее адгезивность, оцененную методом атомно-силовой микроскопии, и способствуя интернализации наночастиц.

Исследовано взаимодействие флуоресцентных наночастиц CdSe/ZnS, покрытых функционализирующей оболочкой из цистеина, с клетками перевиваемой мышью опухоли асцитной карциномы Эрлиха в условиях *in vitro*. Работа направлена на поиск стабильного нетоксичного флуоресцентного маркера для опухолевых клеток. Использование в качестве клеточной модели перевиваемой экспериментальной опухоли обусловлено тем, что она будет применяться авторами в дальнейшем в качестве модели клеток, способных расти в организме животного. Стабильный нетоксичный флуоресцентный маркер расширит возможности изучения межклеточных взаимодействий как *in vitro*, так и *in vivo*.

Охарактеризована динамика проникновения наночастиц в клетки, исследовано влияние обработки клеток протеолитическим ферментом трипсином на свойства клеточной мембраны и поглощение наночастиц.

Анализ препаратов показывает, что уже через 5 мин после начала инкубации клеточной суспензии с наночастицами последние концентрировались вблизи клеток, постепенно оседая на их поверхности (рис. 1А). Через 20 мин наночастицы были хорошо видны в виде ярко флуоресцирующих крупных глобулярных конгломератов округлой формы

(рис. 1 В); в течение последующих 10 мин значительных изменений морфологической картины не наблюдалось (рис. 1 С). Через 60 мин инкубации флуоресценция внутри клеток становилась более равномерной, видна мелкая ярко флуоресцирующая зернистость (рис. 1 D). Различная интенсивность флуоресценции в разных клетках свидетельствует о том, что их способность поглощать наночастицы не одинакова: на препаратах встречались клетки как с очень яркой флуоресценцией по всему объему, так и с очень слабо светящейся областью вблизи мембраны, а также промежуточные формы. Так как в течение 30 мин окрашивания наночастицы концентрировались на клетках в виде гранул или скоплений, можно предположить, что их адсорбция и поглощение происходит в определенных участках клеточной мембраны. Затем, проникнув в клетку, наночастицы распределяются в цитоплазме более равномерно (рис. 1 D). Манипуляции с клетками (отмывки, перенос в инкубационную среду) сопровождались клеточным стрессом, признаком чего являлся мембранный блеббинг, однако при инкубировании с наночастицами большинство клеток сохраняли целостность и округлую форму ядра, не фрагментируясь на апоптотические тельца.

Процесс поглощения наночастиц разделяют на три основные стадии: эндоцитоз, распределение в ранних эндосомах и транслокация в поздние эндосомы и лизосомы [1, 2]. Вероятно, что скорость и интенсивность первой стадии в значительной степени должны зависеть от способности наночастиц сорбироваться на клеточной мембране. Наблюдаемая нами морфологическая картина свидетельствует о тропности наночастиц, покрытых цистеином, к мембране клеток. Возможно, сорбции способствует наличие заряженных групп на оболочке использованных наночастиц, что благоприятствует электростатическому взаимодействию с противоположно заряженными группами на клеточной мембране. Можно предположить, что основной вклад во взаимодействие с отрицательно заряженной клеточной мембраной вносят положительно заряженные аминокислотные группы цистеина. Действительно, в экспериментах Harush-Frenkel с соавт. поглощение наночастиц зарегистрировано через 5 мин инкубации, причем положительно заряженные частицы поглощались клетками HeLa более интенсивно [3]. Однако наличие положительно заряженных групп не всегда ведет к инициации механизмов клеточного поглощения. В исследовании Zhang и соавторов CdTe/CdS наночастицы диаметром ~ 6 нм, стабилизированные L-цистеином, в течение 1 часа не входили в клетки HeLa (люминесцентная микроскопия в этом случае не выявила также абсорбции наночастиц на мембране клеток), если не были конъюгированы с антителами к CD67 [4]. В нашей работе образующиеся крупные гранулы достаточно быстро (в течение 1 часа) разрушались до более мелкой зернистости. Один из механизмов мелкодисперсного распределения в цитоплазме предложен Duan и Nie [5], которые показали, что несущие положительные заряды наночастицы могут выходить из лизосом и равномерно распределяться в цитозоле. Эти авторы предложили конструкцию наночастиц с покрытием из ПЭГ-связанного полиэтиленимина, равномерно распределяющихся в цитоплазме. В данном случае высокий положительный заряд аминных групп на оболочке наночастицы обеспечивает «эффект протонной губки», который ведет к абсорбции протонов в кислых органеллах, возрастанию осмотического давления в лизосомах, их набуханию, разрушению и выходу содержимого в цитозоль [5].

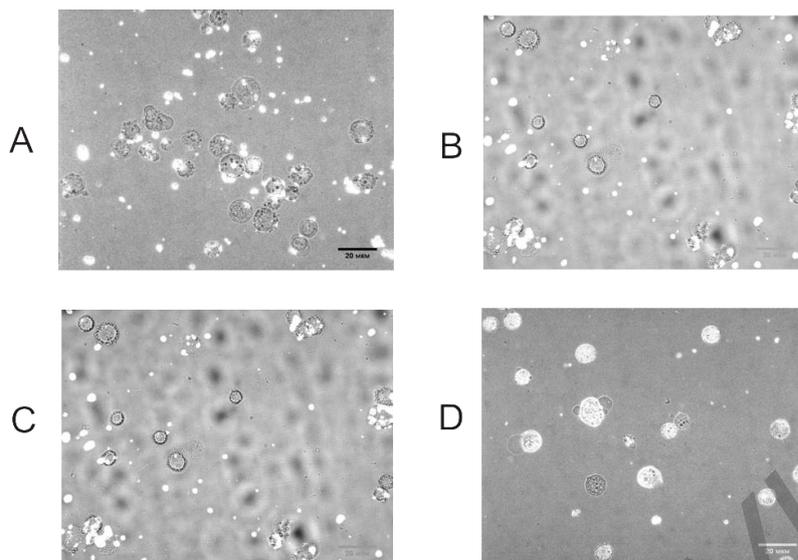


Рисунок 1 – Клетки АКЭ, различное время окрашивания наночастицами CdSe/ZnS/цистеин: А – 5 мин; В – 20 мин; С – 30 мин; D – 60 мин; изображения получены наложением снимков поля зрения в люминесцентном и обычном объективе

Исследовали влияние обработки клеток трипсином на жизнеспособность клеток, поглощение ими наночастиц и свойства клеточной мембраны. Жизнеспособность клеток оценивали после их обработки трипсином и инкубации с наночастицами. Результаты, представленные в таблице 1, показывают, что десятиминутная обработка трипсином не повлияла на жизнеспособность клеток, в то время как при 20-минутной обработке выявлялся цитотоксический эффект трипсина: жизнеспособность снизилась по сравнению с контролем на 15,0%, составив $75,6 \pm 1,6\%$. Инкубация с наночастицами не внесла дополнительного вклада в снижение жизнеспособности.

При обработке трипсином в клетках наблюдалось слабое свечение цитоплазмы и более яркая флуоресценция мембраны (рис 2, А). После 10-минутной трипсинизации флуоресценция была несколько ярче, при этом встречались клетки с очень ярким свечением по всему объему (рис. 2, В). После 20-минутной обработки клеток трипсином поглощение ими наночастиц заметно усиливалось, их флуоресценция после инкубации с суспензией квантовых точек была значительно интенсивнее, чем в клетках, не обработанных трипсином или обработанных этим препаратом в течение 10-ти минут (рис. 2, С). Для того чтобы дифференцировать живые клетки от погибших и проанализировать поглощение наночастиц живыми клетками, клетки в суспензиях были окрашены трипановым синим. При такой обработке наблюдается заметное снижение яркости свечения клеток, что, вероятно, объясняется тушением внеклеточной флуоресценции наночастиц (в том числе наночастиц, адсорбированных на мембране, но не вошедших в клетки) и флуоресценции погибших клеток, в которые проникает трипановый синий. Клетки, окрасившиеся трипановым синим, начинают светиться в красной области, что обусловлено флуоресценцией комплекса этого красителя, проникшего в клетки, с цитоплазматическими белками [6, 7]. В целом, рис. 3 демонстрирует, что более яркая флуоресценция трипсинизированных клеток, по сравнению с не обработанными трипсином, сохраняется и после окраски трипановым синим. Это свидетельствует, что живые клетки после трипсинизации более интенсивно поглощают наночастицы, а, следовательно, флуоресцируют ярче.

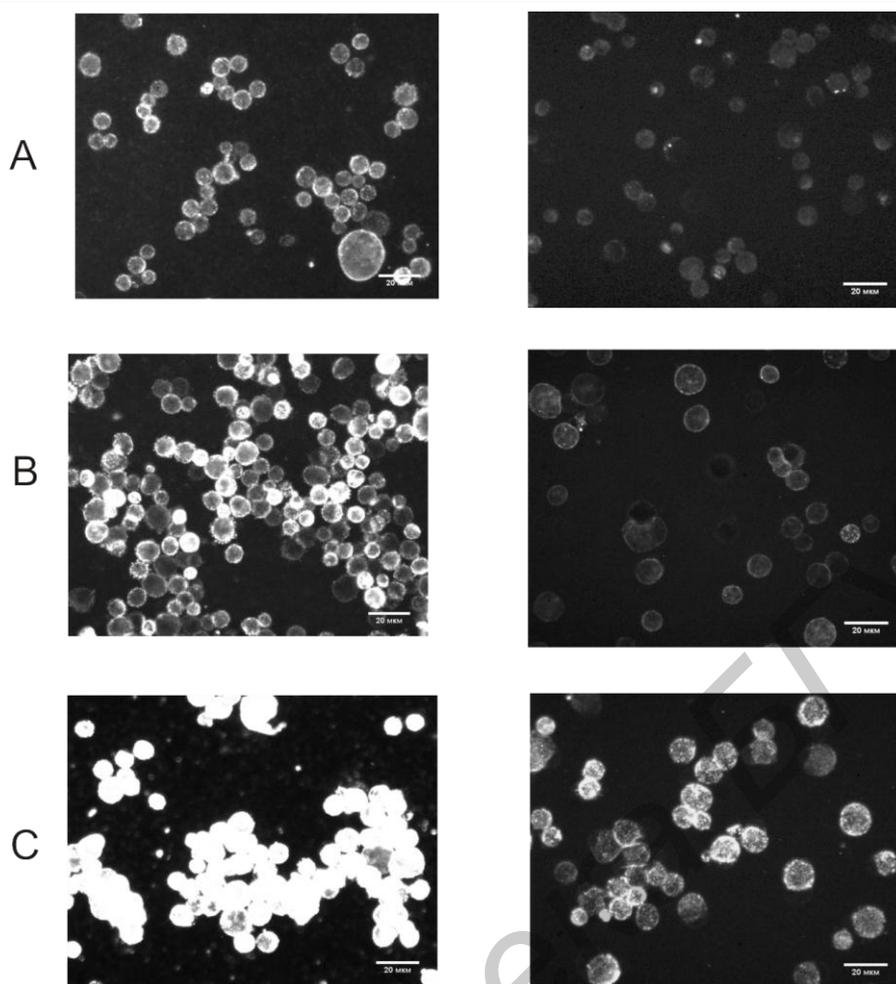


Рисунок 2 – Клетки АКЭ, окрашивание наночастицами CdSe/ZnS/цистеин после трипсинизации, люминесцентная микроскопия: А – без обработки трипсином; В – трипсинизация 10 мин; С – трипсинизация 20 мин. Справа - обработка трипановым синим после окрашивания наночастицами, слева - без обработки трипановым синим

Таким образом, после обработки трипсином изменяются свойства поверхности опухолевых клеток, уменьшается их жесткость и увеличивается адгезия клеточной мембраны к объекту зондирования поверхности.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что трипсин-чувствительные сайты на мембранах участвуют в регуляции процесса поглощения. Так как нарушение их структуры протеолитической обработкой ведет к усилению абсорбции и поглощения наночастиц, вероятно, эти структуры ограничивают проникновение наноразмерных объектов в клетку, играя барьерную роль и оказывая влияние на связывание наночастиц с мембраной. Один из предполагаемых механизмов может быть следующим. Первым шагом процесса интернализации является адсорбция частиц на мембране. При изучении процессов адсорбции высокомолекулярных белков плазмы крови на мембранах эритроцитов показано, что обработка этих клеток трипсином приводит к увеличению показателя адсорбции. Полагают, что под воздействием трипсина происходит протеолиз наружных фрагментов мембранных белков и образование на поверхности мембраны заряженных группировок, на которых может осуществляться адсорбция [8]. Возможно, что подобное увеличение заряда поверхности клеток, обработанных трипсином, является причиной более интенсивного поглощения наночастиц. В пользу этого предположения свидетельствуют и полученные нами помощью АСМ данные об увеличении адгезивности клеточной мембраны. Кроме того, протеолитическое расщепление также может обуславливать активацию

структур, участвующих в рецепции и трансмембранном переносе, например, трипсин способствует активации эпителиальных натриевых каналов [9, 10]. Однако не ясно, может ли подобный процесс иметь значение для усиления адсорбции и поглощения наночастиц.

Литература

1. **Zhang L. W.**, Monteiro-Riviere N.A. // *Toxicological sciences*. 2009. V. 110. № 1. P. 138–155.
2. **Xiao Y.**, Forry S. P, Gao X., Holbrook R.D., Telford W.G., Tona A. // *Journal of Nanobiotechnology*. 2010. V. 8. № 13. P. 8–13.
3. **Harush-Frenkel O.**, Debotton N., Benita S., Altschuler Y. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2007. V. 353. № 1. P. 26–32.
4. **Zhang H.**, Sun P., Liu C., Gao H., Xu L., Fang J., Wang M., Liu J., Xu S. // *Luminescence*. 2011. V. 26. P.
5. **Duan H. W.**, Nie S. M. // *J. Am. Chem.* 2007. V. 129. P. 3333 – 3338.
6. **Busetto S.**, Trevisan E., Patriarca P., Menegazzi R. // *Cytometry*. 2004. P. A. V. 58A. P. 201 – 206.
7. **Avelar-Freitas B.A.**, Almeida V.G., Pinto M.C.X., Moura F.A.G., Massensini A.R., Martins-Filho O.A., Rocha-Vieira E., Brito-Melo G.E.A. // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2014. V. 47. № 4. P. 307 – 315.
8. **Чирикова О.А.** Факторы, определяющие процесс адсорбции высокомолекулярных белков плазмы крови на мембранах эритроцитов при мышечных нагрузках. Авт. дис. канд. биол. наук 03.00.13 – физиология. Ярославль. 2006. 22с.
9. **Bengrine A.**, Li J., Hamm L. L., Awayda M. S. // *J Biol Chem*. 2007. V. 282. № 37. P. 26884 – 26896.
10. **Gondzik V1**, Weber WM, Awayda MS. // *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012. V. 303. № 9. P. 936 – 346.

КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРИБОРАМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПАЦИЕНТОВ

Н.И. Силков¹, Г.М. Ревяко¹, А.Е. Новиков²

¹Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники
ул. П. Бровки, 6, БГУИР, каф. ИПиЭ, 220013, Минск, Беларусь, тел. +375 17 2938824
E-mail: silkou-rti@bsuir.by

² ЧУП «Promvad» г. Минск, Беларусь

Аннотация. Устройства медицинского назначения являются важным компонентом обеспечения медицинской помощи и улучшения здоровья населения. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признает это. Улучшение здоровья многих людей связано с недавно открывшимися возможностями прогнозировать, предотвращать, диагностировать, а также лечить при помощи технологий, ставшими доступными лишь в последние десятилетия, когда отмечается экспоненциальный рост наименований устройств медицинского назначения. Однако, несмотря на быстрый научно-технический прогресс, не всё население Республики Беларусь может либо хочет пользоваться этими новшествами. Для этого есть несколько причин.

Согласно [1], промышленность, возможно, в состоянии поставлять медицинские диагностические устройства, способные удовлетворить потребности всего мира. Но зачастую наблюдается беспорядочное разнообразие таких устройств, которые приобретаются без необходимости или необдуманно, применяются без соблюдения мер безопасности, применяются неэффективно с точки зрения целей, для которых они предназначались, или даже не применяются вообще.

Кроме того, недостаточное количество информации о потребности, которая будет удовлетворяться диагностическим устройством, влияет на функциональные характеристи-