

через окрашенный раствор продували воздух в течение 1–2 часов для удаления из раствора остатков брома. Реакционную смесь нейтрализовали раствором натрия бикарбоната с последующим добавлением раствора натрия бисульфита. Образовавшуюся суспензию выдерживали в холодильнике в течение 18–20 часов, и отфильтровывали выпавший осадок. Дальнейшее выделение 8-бромаденозина проводили так, как описано в примере 1. Выход 8-бромаденозина составлял 0,49 г (38 %) до и 0,15 г (34 %) после перекристаллизации, соответственно.

Таблица 1 – Выход 8-бромаденозина (3) в зависимости от pH реакционной среды

№	pH	Выход продукта до перекристаллизации, г / %	Суммарный выход продукта после перекристаллизации, г / %
1	4.3	1 / 90	0.9 / 70
2	4.7	0.6 / 47	0.5 / 42
3	5.3	0.56 / 43	0.3 / 39
4	7	0.49 / 38	0.15 / 34

Таким образом, в результате выполненного исследования было установлено, что использование натрия ацетатного буфера с pH 4,3 является оптимальным для получения 8-бромаденозина реакцией бромирования аденозина с помощью раствора брома в воде.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shelton J.* Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs / Shelton J [et al.] // *Chemical Reviews*. 2016;116:14379–14455.
2. *Gandi V.* 8-Chloro-cAMP and 8-chloro-adenosine act by the same mechanism in multiple myeloma cells // *Gandi V* [et al.] // *Cancer Research*. 2001;61:5474–5479.
3. *Frey JA.* 8-Amino-adenosine inhibits multiple mechanisms of transcription / Frey JA, Gandi V // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2010;9:1:236–245.
4. *Suzuki T.* Formation of 8-S-L-cysteinyladenosine from 8-bromoadenosine and cysteine / Suzuki T [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* 2018;66:2:184–187.
5. *Mieczkowski A.* Preparation of cyclonucleosides / Mieczkowski A, Roy V, Agrofoglio LA // *Chemical Reviews*. – 2010;110:1828–1856.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР АЛЬВЕОЛЯРНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК METHODOLOGICAL APPROACHES FOR ALVEOLAR EPITHELIAL CELL PRIMARY CULTURES OBTAINING

А. А. Царик, М. А. Кохнюк, П. В. Альховик, М. Ю. Юркевич
A. A. Tsarik, M. A. Kokhnyuk, P. V. Alkhovik, M. Yu. Yurkevich

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
marja4567@gmail.com
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Проведена оценка эффективности использования различных протеолитических ферментов для дезагрегации ткани легких и представлен оптимизированный метод выделения альвеолярных эпителиоцитов, включающий механическую дезагрегацию ткани с последующей обработкой полученных эксплантов 0,25% раствором трипсина в сочетании с фильтрованием клеточной суспензии через поры диаметром 100 мкм и 50 мкм. Полученные культуры клеток характеризовались высокой жизнеспособностью (более 91%) и морфологической гетерогенностью. Наряду с активно делящимися округлыми клетками, визуализировались дифференцированные альвеолярные эпителиоциты с кубовидной или полигональной морфологией, характеризующиеся высокой секреторной активностью.

Evaluation of various proteolytic enzymes efficiency for disaggregation of lung tissue is carried out and an optimized method for alveolar epithelial cells isolation is presented. This method includes mechanical disaggregation of tissue followed by processing of explanations with 0.25% trypsin solution in combination with filtration of the cell suspension through pores with a diameter of 100 µm and 50 µm. The obtained cell cultures were characterized by high viability (more than 91%) and morphological heterogeneity. Along with actively dividing rounded cells,

differentiated alveolar epithelial cells with cuboid or polygonal morphology, characterized by high secretory activity, were visualized.

Ключевые слова: альвеолярные эпителиальные клетки, клеточные культуры, трипсин, коллагеназа, жизнеспособность.

Keywords: alveolar epithelial cells, cell cultures, trypsin, collagenase, viability.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-135-138>

Последние годы знаменуются ухудшением экологических условий, что связано и с ростом заболеваемости болезнями органов дыхания. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции являются наиболее массовыми заболеваниями, которые занимают ведущее место в структуре инфекционных болезней и составляют 80-90% от всех случаев данных патологий. Если учитывать способность ряда вирусов вызывать частые эпидемии и даже пандемии, то можно утверждать, что они являются проблемой мирового значения. Мировая вспышка тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), связанного с обнаружением новой коронавирусной инфекции (COVID-19), способствовало активному изучению молекулярно-клеточных механизмов развития инфекционных патологий, в частности процессов взаимодействия вирусных частиц с альвеолоцитами [1, 2].

Клетки эпителия дыхательных путей и альвеол подвергаются воздействию большого количества вдыхаемого воздуха, содержащего загрязнители и патогены. Альвеолярные эпителиальные клетки входят в состав аэрогематического барьера, участвуют в транспорте жидких и газообразных веществ, выполняют защитно-барьерную функцию. Данные клетки ответственны за секрецию компонентов сурфактанта, а также за реутилизацию молекул деградированного сурфактантного комплекса. Сурфактант состоит из фосфолипидов и специфических сурфактант-ассоциированных белков и выполняет ряд функций: стимулирует фагоцитоз альвеолярных макрофагов, стабилизирует альвеолоциты, агрегирует бактерии и вирусы, снижает темпы развития системной воспалительной реакции. Наряду с выполнением секреторной функции, альвеолоциты являются активно пролиферирующей популяцией клеток и служат источником для регенерации эпителиальной выстилки легких при ее повреждении и/или гибели части клеток [3].

Функциональное состояние альвеолярных эпителиальных клеток в норме и при ряде патологических процессов можно изучить на тканях легких человека, на животных моделях и с использованием клеточных культур. При этом использование культур клеток обладает рядом преимуществ, так как изолированные альвеолоциты могут подвергаться воздействию патогенетических факторов в контролируемых условиях и ими можно манипулировать, используя различные методы. Существующие иммортализованные клеточные линии, полученные из клеток трахеального / бронхиального эпителия легких человека и других животных, не обладают всем спектром функций альвеолярных эпителиальных клеток [4]. В связи с этим, огромный интерес представляет разработка методов выделения альвеолоцитов из легочной ткани.

Целью данного исследования являлась оптимизация метода выделения жизнеспособных альвеолярных эпителиальных клеток путем механической и ферментативной дезагрегации легочной ткани лабораторных животных.

Методы исследования. Экспериментальное исследование проводили с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в научных целях (Страсбург, 1991 г.), и в соответствии с постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 21.05.2010 №36 «Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в vivariaх научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках.

Объектами исследования являлись первичные культуры клеток легкого, полученные от 4 беспородных половозрелых крыс с массой тела 270 – 320 г. Лабораторных животных вводили в наркоз путем интракардиального введения раствора тиопентала натрия (45 мг/кг веса), проводили продольную лапаротомию и осуществляли забор обескровленного легкого. Легочную ткань механически измельчали до эксплантов объемом 1-3 мм³ в фермент-содержащем растворе и инкубировали в течение 30 мин при 37°C в условиях постоянного перемешивания. Для ферментативной дезагрегации легочной ткани использовали два подхода: 0,01% раствор коллагеназы IV типа («Sigma», Германия) и 0,25% раствор трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, «Gibco», США). Ферментативную активность инактивировали путем центрифугирования полученных суспензий в физиологическом растворе (РУП «Белмедпрепараты», РБ) с 10% инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой («Cargicorn Scientific», Германия) в течение 10 мин. при 1500 об/мин. К осадкам добавляли физиологический раствор с 5% эмбриональной телячьей сывороткой, суспензии последовательно пропускали через фильтры с диаметром пор 100 и 50 мкм и дважды центрифугировали 10 мин. при 1500 об/мин.

Клеточную суспензию высевали в адгезивные чашки Петри в полную культуральную среду DMEM (минимальная среда Игла с низким содержанием глюкозы, модифицированная по способу Дульбекко, «Gibco», США), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, смесь антибиотика – антимикотика (100 Ед/мл бензилпенициллин натрия, 100 Ед/мл стрептомицин сульфата, 100 Ед/мл неомицин сульфата, «Lonza», США). Клетки культивировали при 37°C в условиях 5% CO₂. Первая замена культуральной среды осуществлялась на 2 день культивирования, впоследствии среда заменялась каждый 3 день.

Мониторинг клеточных культур и визуализацию роста *in vitro* осуществляли с помощью фазово-контрастной микроскопии (микроскоп BS-2036F («BestScore», КНР)). Жизнеспособность клеток оценивали по уровню свя-

звания клетками пропидий йодида и антител к аннексину V, меченных фикоэритрином (Fits, набор реактивов ANNEXIN V - FITC APOPTOSIS DETECTION KIT, «BD Pharmingen», США) с регистрацией результатов на проточном цитометре CytoFLEX («Beckman Coulter», США).

Результаты исследования. Для выделения альвеолярных эпителиальных клеток используются разнообразные подходы к дезагрегации ткани легкого: механические, химические, ферментативные, а также их сочетание. Методы отличаются по клеточному выходу, сохранности ультратонкой структуры и жизнеспособности клеток, предусматривают использование различных ферментов (трипсин, коллагеназа, эластаза, проназа, ДНКазы либо сочетание протеаз), фильтров с разным диаметром пор, а также включение дополнительной стадии центрифугирования на градиенте плотности. Кроме того, изолированные альвеолоциты получают методами магнитной сепарации или проточной цитометрии с флуоресцентным сортированием клеток [5, 6].

Выделение клеток из легких лабораторных животных осуществлялось путем механической и ферментативной дезагрегации ткани различными протеолитическими ферментами с коллагенолитической активностью: 0,25% раствор трипсина и 0,01% раствор коллагеназы IV типа. Согласно данным ряда исследований, снижение температуры до 15 °С и времени инкубации с ферментами до 15 минут влияет на выход клеток из ткани легкого, снижая данный показатель на 50%, при этом повышение инкубационного периода оказывает негативное влияние на клеточную жизнеспособность [5]. В связи с этим, оптимальными условиями для выделения достаточного количества жизнеспособных альвеолоцитов явилось время инкубации с ферментами 30 минут и осуществление всех этапов выделения при 37°С. Клетки культивировали в стандартных условиях в питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% смеси антибиотиков-антимикотика, 1% аминокислоты L-глутамина. Большая часть изолированных клеток прикреплялась к адгезивному лабораторному пластику, при этом визуализировались одиночные клетки или клеточные конгломераты, находящиеся в суспензии.

Первичные клеточные культуры обладали морфологической гетерогенностью (рисунок 1). Преобладающее число клеток характеризовалось округлой морфологией с сохраняющейся полярностью и четко очерченным центрально расположенным ядром. Данные морфологические особенности характерны для активно делящихся альвеолярных эпителиальных клеток. Единичные клетки или конгломераты клеток были представлены дифференцированными альвеолярным эпителиальным клеткам, характеризующимися в культурах крупными размерами, кубовидной или полигональной формой, с небольшим центрально расположенным ядром. Клетки крупных размеров содержали множество цитоплазматических вакуолей, что позволяет отнести их к активно секретирующим альвеолярным эпителиоцитам, продуцирующим сурфактантные белки. В значительно меньшем количестве обнаруживались фибробластоподобные медленно пролиферирующие клетки с более или менее неравномерной по плотности цитоплазмой и крупным ядром. В некоторых полученных клеточных культурах визуализировались 1-2 колонии полигональных, плотно прилегающих друг к другу эндотелиальных клеток, которые откреплялись и погибали в первые дни культивирования, так как для поддержания их пролиферативной активности *in vitro* необходимо присутствие в культуральной среде ряда факторов, в частности, сосудистого эндотелиального фактора (VEGF).

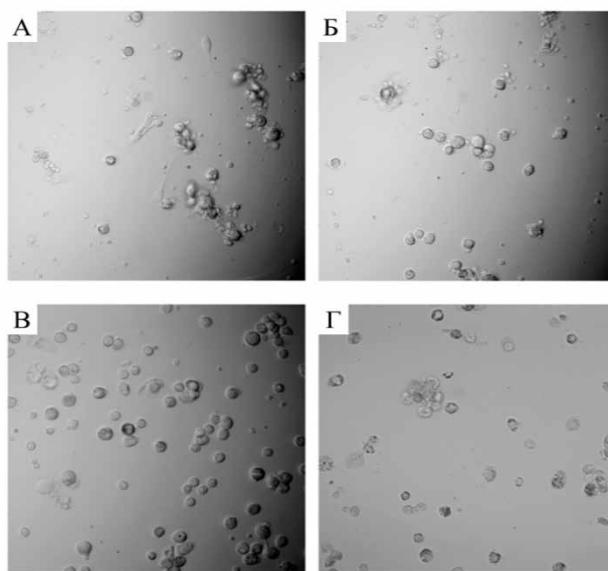


Рисунок 1 – Морфология альвеолярных эпителиальных клеток, полученных путем дезагрегации ткани легкого 0,01% раствором коллагеназы IV типа (А и Б) и 0,25% раствором трипсин-ЭДТА (В и Г), на третий день культивирования (световая микроскопия, ув.20 х)

При дезагрегации легочной ткани сериновой протеазой (трипсином) количество клеток с фибробластоподобной морфологией не превышало 1-5% от общего количества клеток в культуре, тогда как при использовании коллагеназы IV типа доля данных клеток в культурах возрастала и составляла до 10%. Кроме того, клеточный выход при использовании трипсина соответствовал $6,8(5,4\div 7,5)\times 10^6$ жизнеспособных альвеолоцитов/грамм ткани

легкого и статистически значимо превышал аналогичный показатель при коллагеназо-опосредованном выделении клеток ($3,9(2,8 \div 5,0) \times 10^6/\text{г}$), $p=0,02$, U -критерий Манна-Уитни.

Для выделения альвеолярных эпителиальных клеток легочной ткани используют ряд методических подходов, основанных на фильтровании с использованием фильтров с диаметром пор 100-150 мкм, а также фильтра с нейлоновой сеткой от 20 до 50 мкм [5]. Добавление этапа фильтрования клеточных суспензий, полученных после ферментативной обработки ткани, через поры диаметром 100 мкм и 50 мкм обеспечивало эффективное удаление эритроцитов, клеточного дебриса и поврежденных клеток. Количество жизнеспособных (негативных по аннексину V и пропидий йодиду) клеток во всех полученных культурах колебалось от 91,0% до 98,5% и составляло по медиане 94,6 ($92,1 \div 97,9$) %.

Заключение. Метод, включающий механическую дезагрегацию ткани легкого с последующей обработкой полученных эксплантов 0,25% раствором трипсина в сочетании с фильтрованием клеточной суспензии через поры диаметром 100 мкм и 50 мкм, позволяет выделить достаточное количество жизнеспособных альвеолярных эпителиальных клеток ($6,8(5,4 \div 7,5) \times 10^6$ клеток/грамм). При культивировании в стандартных условиях в культуры визуализируются активно делящиеся округлые альвеолоциты и клетки с кубоидной или полигональной морфологией, характеризующиеся высокой секреторной активностью. Примесь фибробластоподобных клеток не превышает 5%. Культуры альвеолярных эпителиальных клеток является уникальной модельной системой для изучения патогенетических процессов на молекулярно-клеточном уровне, для оценки эффективности лекарственных средств и разработки новых терапевтических подходов, а также могут использоваться в целях регенеративной медицины, в том числе для создания тканеинженерных конструкций.

Работа выполнена в рамках гранта Министерства образования Республики Беларусь на 2021 год.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carcaterra, M. Alveolar epithelial cell type II as main target of SARS-CoV-2 virus and COVID-19 development via NF-Kb pathway deregulation: A physio-pathological theory / M. Carcaterra, C. Caruso // *Med Hypotheses*. – Vol. 146. – 2021. – e.110412.
2. Miura, T.A. Respiratory epithelial cells as master communicators during viral infection / T.A. Miura // *Curr Clin Micro Rpt*. – Vol. 6. – 2019. – P. 10 – 17.
3. Chuquimia, O.D. Alveolar epithelial cells are critical in protection of the respiratory tract by secretion of factors able to modulate the activity of pulmonary macrophages and directly control bacterial growth / O.D. Chuquimia, D.H. Petursdottir, N.Periolo, C. Fernandez // *Infection and Immunity*. – Vol. 81 (1). – 2012. – P. 381 – 389.
4. Hiemstra, P.S. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions / P.S. Hiemstra, G. Grootaers [et al.] // *Toxicology In Vitro*. – Vol. 47. – 2018. – P. 137 – 146.
5. Lee, D.F. Isolation and characterization of alveolar type II pneumocytes from adult bovine lung / D.F. Lee, F.J. Salguero, D. Grainger [et al.] // *Sci Rep*. – Vol. 8. – 2018. – e.11927.
6. Gonzalez, R.F. Isolation and culture of alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs / R.F. Gonzalez, L.G. Dobbs // *Methods Mol Biol*. – 2013. – Vol. 945. – P. 145 – 159.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЭЛЕКТРОННОГО ДЕТЕКТОРА ПОРТАЛЬНЫХ ИЗОБРАЖЕНИИ

QUALITY CONTROL OF THE ELECTRONIC PORTAL IMAGE DETECTOR

A. A. Шuш¹, T. C. Чикова²

A. A. Shish¹, T. S. Chikova²

¹Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова
г. Минск, Республика Беларусь
dorohedoro1315@gmail.com

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им.А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
chts@tut.by

¹State institution «N. N. Alexandrov National Cancer Centre»

²Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Важным элементом современного высокотехнологичного радиотерапевтического комплекса на базе линейного ускорителя электронов является электронный детектор портальных изображений. Он обеспечивает точность позиционирования пациента на лечебном столе, соответствие доставляемого дозового распределения запланированному, позволяет выполнить быструю и точную верификацию лечебных планов с объемной