

ISSN 1561-8358 (Print)

ISSN 2524-244X (Online)

<https://doi.org/10.29235/1561-8358-2025-70-3-198-208>

УДК 537.534.35:[611.018.21:576.32]:614.876.06



Оригинальная статья

А. Н. Шклярова<sup>1</sup>, М. Н. Стародубцева<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси,*

*ул. Фёдоровского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Гомельский государственный медицинский университет,*

*ул. Ланге, 5, 246000, Гомель, Республика Беларусь*

### АСМ-АНАЛИЗ НЕОДНОРОДНОСТИ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ ПОСЛЕ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

**Аннотация.** Механические свойства клеток, определяемые в основном свойствами и структурой цитоскелета, неоднородны на микро- и наномасштабах. Пространственное распределение таких механических параметров, как модуль упругости и сила адгезии, по поверхности фибробластов характеризует их механический фенотип. С помощью картирования механических свойств с использованием режима Force Volume атомно-силовой микроскопии и применения статистических методов анализа (моделирование распределений параметров двухкомпонентной Гауссовой смесью и кластеризация данных) установлены закономерности изменения пространственного распределения механических свойств поверхности фибробластов первичных культур, выделенных из легкого необлученных и облученных 14-месячных крыс Wistar и 3-недельного постлучевого периода. После облучения изменяется доля участков поверхности с повышенными упругими свойствами и сниженными адгезионными свойствами, соответствующих участкам плазмалеммы над структурами стрессовых волокон. Полученные данные свидетельствуют о том, что облучение как в низких (0,1 Гр), так и в высоких (1 и 15 Гр) дозах вызывает изменения механического фенотипа фибробластов в течение раннего отдаленного постлучевого периода. Эти характерные изменения в механике фибробластов могут представлять собой ранние биомаркеры радиационно-индуцированных осложнений, таких как радиационный фиброз.

**Ключевые слова:** АСМ, фибробласты, рентгеновское излучение, модуль упругости, адгезия, стрессовые волокна

**Благодарности:** работа выполнена в рамках задания «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*» «Природные ресурсы и окружающая среда 3.01» Государственной программы научных исследований «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 годы, подпрограмма 3 «Радиация и биологические системы» (№ ГР 20210231 от 15.03.2021).

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Информация об авторах:** Шклярова Анастасия Николаевна – научный сотрудник Института радиобиологии Национальной академии наук Беларуси. <https://orcid.org/0000-0002-6365-3856>. E-mail: anshkklarava@gmail.com; Стародубцева Мария Николаевна – доктор биологических наук, доцент, профессор Гомельского государственного медицинского университета. <https://orcid.org/0000-0002-6956-9014>. E-mail: maria.n.starodubtseva@gmail.com

**Вклад авторов:** Шклярова Анастасия Николаевна – пробоподготовка образцов (культивирование клеток, облучение, подготовка образцов для исследования), проведение АСМ-исследований, анализ и систематизация экспериментальных данных; Стародубцева Мария Николаевна – обоснование концепции исследования, создание модели исследования, применение статистических методов для анализа данных, проведение сравнительного анализа, обобщение результатов исследования, формулировка выводов, написание и редактирование текста рукописи, работа с графическим материалом.

**Для цитирования:** Шклярова, А. Н. АСМ-анализ неоднородности механических свойств поверхности фибробластов после радиационного воздействия / А. Н. Шклярова, М. Н. Стародубцева // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя фізіка-тэхнічных навук. – 2025. – Т. 70, № 3. – С. 198–208. <https://doi.org/10.29235/1561-8358-2025-70-3-198-208>

*Поступила в редакцию: 18.07.2025*

*Утверждена к публикации: 09.09.2025*

*Подписана в печать: 18.09.2025*

*Original article*

Nastassia M. Shkliarava<sup>1</sup>, Maria N. Starodubtseva<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
4, Fedyuninski St., 246007, Gomel, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Gomel State Medical University,  
5, Lange St., 246000, Gomel, Republic of Belarus*

**AFM ANALYSIS OF SPATIAL ELASTIC MODULUS DISTRIBUTION  
OF FIBROBLAST SURFACE AFTER RADIATION EXPOSURE**

**Abstract.** The mechanical properties of cells, determined mainly by the properties and structure of the cytoskeleton, are heterogeneous at the micro- and nanoscale. The spatial distribution of mechanical parameters such as elastic modulus and adhesion force over the surface of fibroblasts characterizes their mechanical phenotype. By mapping mechanical properties using the Force Volume mode of atomic force microscopy and using statistical analysis methods (modeling parameter distributions with a two-component Gaussian mixture and clustering data), patterns of changes in the spatial distribution of the mechanical properties of the fibroblast surface of primary cultures isolated from the lungs of non-irradiated and irradiated 14-month-old Wistar rats and a 3-week post-radiation period were established. After irradiation, the proportion of surface areas with increased elastic properties and reduced adhesive properties corresponding to the plasmalemma areas above the structures of stress fibers changes. The findings indicate that irradiation at both low (0.1 Gy) and high (1 and 15 Gy) doses induces alterations in the mechanical phenotype of fibroblasts during the early late post-radiation period. These characteristic modifications in fibroblast mechanics may represent early biomarkers of radiation-induced complications, such as radiation fibrosis.

**Keywords:** AFM, fibroblasts, X-rays, elastic modulus, adhesion, stress fibers

**Acknowledgements:** the work was performed within the framework of the assignment “To develop criteria for assessing radiation-induced changes in the tissue of the internal environment based on the analysis of the structure and mechanical properties of the cellular component in *in vitro* and *in vivo* models” “Natural Resources and the environment 3.01” of the State Scientific Research Program “Natural Resources and the Environment” on 2021–2025, subprogram 3 “Radiation and biological systems” (no. GR 20210231 dated 03.15.2021).

**Conflict of interest:** the authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

**Information about the authors:** *Nastassia M. Shkliarava* – Researcher at Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus. <https://orcid.org/0000-0002-6365-3856>. E-mail: [anshklarava@gmail.com](mailto:anshklarava@gmail.com); *Maria N. Starodubtseva* – Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Professor at Gomel State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-6956-9014>. E-mail: [maria.n.starodubtseva@gmail.com](mailto:maria.n.starodubtseva@gmail.com)

**Contribution of the authors:** *Nastassia M. Shkliarava* – sample preparation (cell cultivation, irradiation, preparation of samples for research), conducting AFM studies, analysis and systematization of experimental data; *Maria N. Starodubtseva* – substantiation of the research concept, creation of a research model, application of statistical methods for data analysis, comparative analysis, generalization of research results, formulation of conclusions, writing and editing of the manuscript text, work with graphic material.

**For citation:** Shkliarava N. M., Starodubtseva M. N. AFM analysis of spatial elastic modulus distribution of fibroblast surface after radiation exposure. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya fizika-tekhnichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Physical-technical series*, 2025, vol. 70, no. 3, pp. 198–208 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8358-2025-70-3-198-208>

*Received: 08.07.2025*

*Approved for publication: 09.09.2025*

*Signed to the press: 18.09.2025*

**Введение.** Широко применяемое в медицине для диагностики и терапии рентгеновское излучение оказывает влияние на свойства и функции фибробластов – основных клеток соединительной ткани [1, 2]. Механические свойства фибробластов важны для осуществления различных клеточных процессов, включая пролиферацию клеток, их взаимодействие с окружением, миграцию, секрецию различных веществ и др. [3].

Одним из серьезных проявлений действия ионизирующего излучения на организм является радиационный фиброз – патологическое состояние, вызываемое воспалительным процессом, при котором с участием радиационно-измененных фибробластов происходит чрезмерное разрастание соединительной ткани в органах [2]. Для понимания клеточных процессов развития радиационного фиброза необходимо установление общих механизмов изменения механического фенотипа фибробластов при облучении.

Хорошо зарекомендовавшим себя методом изучения механических свойств клеток является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Существуют несколько режимов сканирования, которые

позволяют проводить механическое тестирование поверхности клеток (запись силовых кривых и их анализ «на лету») с созданием карт механических параметров. К таким режимам, в частности, относятся PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping (PF QNM) и Force Volume (FV). Первый режим позволяет картировать свойства поверхности с высоким разрешением, но из-за высоких скоростей сканирования и малой глубины индентирования значения механических параметров находятся в диапазоне значений, отличном от общепринятых, полученных с помощью классической силовой спектроскопии. Второй режим АСМ-сканирования по условиям тестирования механических свойств больше соответствует классической силовой спектроскопии, однако карты, получаемые с его помощью, как правило, имеют более низкое разрешение.

Механические свойства поверхности клеток, тестируемые с помощью этих режимов, в основном определяются структурой и свойствами цитоскелета вблизи поверхности клетки с цитозольной стороны. Это кортикальный актиновый цитоскелет, представляющий собой дендрито-подобную структуру из актиновых микрофиламентов, и стрессовые волокна – длинные нити из микрофиламентов актина типов  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\alpha$ -SMA в зависимости от типа фибробласта [4–6]. Стрессовые волокна имеют вид пучков из 10–30 тонких нитей, состоящих из актина, сшитого актинсвязывающими белками, такими как  $\alpha$ -актинин, фасцин и филламин. Эти пучки тонких волокон часто чередуются с толстыми волокнами, состоящими в основном из немышечного миозина II [4]. Структуры цитоскелета располагаются неравномерно по объему клетки, создавая неоднородность в распределении механических свойств поверхности клеток на микро- и наноуровнях. Изменение пространственного распределения механических свойств поверхности клетки при патологических процессах, включая радиационно-индуцированные, определяет пути развития осложнений лучевой терапии и диагностики.

*Целью исследования* явилось установление с помощью методов АСМ и статистического анализа закономерностей изменения пространственного распределения механических свойств поверхности фибробластов после радиационного воздействия в ранний отдаленный период.

**Материалы и методы исследования.** 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<sup>1</sup>. До начала эксперимента было получено одобрение комитета по этике УО «Гомельский государственный медицинский университет» на проведение исследования (протокол № 2 от 24.03.2021).

Самцы крыс Wistar содержались в стационарных условиях вивария Института радиобиологии НАН Беларуси на полноценном стандартном пищевом рационе и со свободным доступом к воде, 12/12-часовом режиме освещения и темноты, согласно установленным нормам. В работе использовали биологическую модель радиационного воздействия с облучением области грудной клетки животных, выделение первичных культур фибробластов после 3-недельного постлучевого периода и анализ механических свойств живых фибробластов, прикрепленных к поверхности чашки Петри. В модели были задействованы первичные культуры фибробластов, выделенные из легких крыс согласно модифицированной версии протокола Zhao S. M. (2018) [7].

Однократное облучение крыс зрелого возраста (14 месяцев) рентгеновским излучением проводили в дозах: 0,1 Гр (3 крысы), 1 Гр (4 крысы) и 15 Гр (4 крысы), с использованием рентгеновского аппарата биологического назначения X-RAD 320 Precision X-ray Inc. (США) ( $U = 50$  кВ,  $I = 12,5$  мА,  $P = 2,57$  сГр/мин, фильтр № 1 (2 мм Al), расстояние до объекта – 50 см). Нижнюю половину туловища и голову экранировали свинцовыми защитными пластинками. Выведение животных из эксперимента проводили на 21-е сут. после облучения. Контрольная группа крыс (необлученные животные) состояла из 3 особей. После выделения культур фибробластов пересадка культур проводилась дважды в неделю при 80 % конfluence. В работе были использованы культуры фибробластов на этапе 2 пассажа.

За день до АСМ-сканирования клетки в количестве 20 тыс. высаживали в чашки Петри с адгезионной поверхностью (Sarstedt, Германия). Перед сканированием клетки промывали фосфат-

<sup>1</sup> Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2012. 48 с. URL: [https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive\\_201063\\_rus.pdf](https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf) (дата обращения: 01.07.2025).

но-солевым буферным раствором. Клеточные образцы сканировали в жидкой среде (раствор Хэнкса) с помощью АСМ BioScope Resolve (Bruker, США) в режимах MIROview Peak Force QNM in Fluid или Force Volume иглой-зондом NSG-03 (TipsNano, NT-MDT, Эстония, резонансная частота 90 кГц, жесткость консоли 1,74 Н/м). Малые участки поверхности клеток над ядром размером  $15 \times 15$  мкм<sup>2</sup> записывали с разрешением  $20 \times 20$  пикселей. Модуль упругости оценивали с помощью модели Снеддона. Калибровку зонда проводили контактным методом согласно протоколу выполнения исследований на АСМ BioScope Resolve (Bruker, США). Структурные и механические свойства клеток оценивали по полученным АСМ-изображениям, используя программу Nanoscope Analysis 1.8.

Статистическую обработку данных и построение графиков осуществляли с помощью программы OriginPro, version 2019b, и пакета статистических программ Statistica (StatSoft Inc., version 12). Кривые распределения параметров были аппроксимированы с помощью двухкомпонентной модели Гауссовой смеси (GMM) с использованием программы OriginPro. При статистическом анализе данных были использованы t-критерий Уэлча – для сравнения средних значений выборок, а также z-критерий – тест для сравнения пропорций. Кластеризация данных для силы адгезии и модуля упругости для каждого пикселя АСМ-изображения выполнена методом k-средних с помощью пакета статистических программ Statistica.

**Результаты и их обсуждение.** Сканы поверхности живых фибробластов были получены с использованием двух режимов АСМ-сканирования – PF QNM и FV. В первом случае проводилось тестирование поверхности целых клеток и анализ силовых кривых «на лету» с нанометровым пространственным разрешением.

На рис. 1, *a* и *c* представлены АСМ-изображения – топографические карты поверхности живых фибробластов в трехмерном виде. На изображении 1, *a* клетки контрольного образца хорошо видны выступающие длинные нити, многие из которых направлены параллельно длинной оси прикрепленной к подложке клетки. Это характерные для фибробластов элементы актинового цитоскелета – стрессовые волокна, содержащие преимущественно  $\beta$ - и  $\gamma$ -актин. Согласно литературным данным [4], поперечные размеры объединенных в волокна стрессовых фибрилл примерно 1 мкм. При радиационно-индуцированной активации фибробласта возможна его трансформация в миофибробласт, характерной морфологической чертой которого являются стрессовые волокна, содержащие  $\alpha$ -актин гладких мышц ( $\alpha$ -SMA) [5, 8]. На рис. 1, *c* представлено 3D-изображение фибробластов, выделенных из легкого крысы, облученной рентгеновским излучением в высокой дозе (15 Гр). В режиме FV проводилось тестирование механических свойств и запись силовых кривых с меньшим разрешением в сравнении с разрешением изображений, полученных в режиме PF QNM. В нашем исследовании мы использовали 20 точек на линию. На рис. 1, *b* и *d* показаны те же, что и на рис. 1, *a* и *c*, участки образцов с фибробластами, но записанные в режиме FV.

При записи целой клетки разрешение получаемого изображения не позволяет анализировать такие элементы структуры клетки, как стрессовые волокна. В настоящем исследовании анализировали сканы малых участков поверхности клетки в надъядерной области размером  $15 \times 15$  мкм<sup>2</sup> с разрешением 20 точек на линию, что определяет размер пикселя изображения  $750 \times 750$  нм<sup>2</sup>. Выбор зоны сканирования клетки был обусловлен тем, что на результаты тестирования механических свойств клетки в этой области в меньшей степени влияют резкие изменения профиля поверхности (что имеет место в перинуклеарной области, богатой разными клеточными органеллами) и жесткая подложка (что происходит в периферической области, где высота клеточного края примерно 200–300 нм).

На рис. 2 представлены типичные АСМ-изображения – топографические карты (*a–d*), карты сил адгезии (*e–h*) и карты модуля упругости (*i–l*) для надъядерных областей фибробластов из легкого контрольных (необлученных) животных и животных после облучения в разных дозах и постлучевого периода. В этих случаях пространственные элементы, такие как волокна цитоскелета, становятся различимы как на топографических изображениях, так и на картах механических свойств. Однако необходимо понимать природу размытости изображений, так как значение в одном пикселе изображения измеряется в какой-то точке области и принимается единым для всей области, покрываемой пикселем.

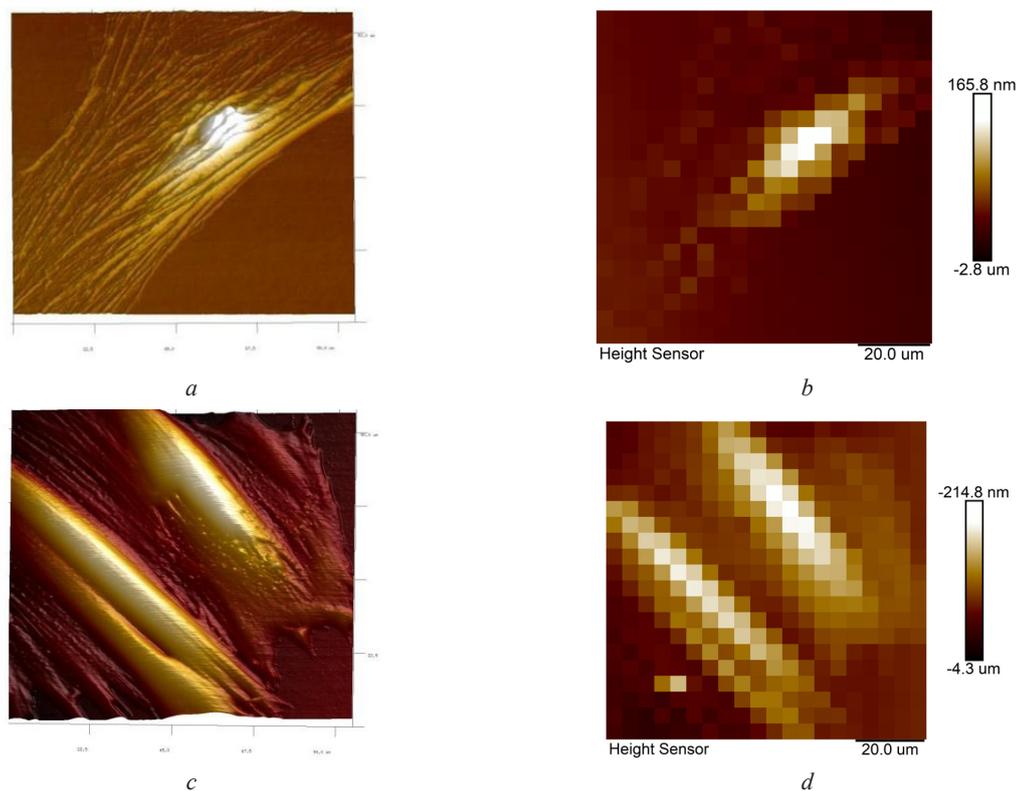


Рис. 1. АСМ-изображения живых фибробластов контрольных (необлученных) крыс:  
*a, b* – крысы после облучения в дозе 15 Гр, *c, d* – постлучевого периода.  
Изображения записаны в режимах: *a, c* – PeakForce QNM (PF QNM); *b, d* – Force Volume (FV)

Fig. 1. AFM images of living fibroblasts of control (non-irradiated) rats:  
*a, b* – rats after irradiation at a dose of 15 Gy; *c, d* – the post-radiation period.

The images are recorded in the following modes: *a, c* – PeakForce QNM (PF QNM); *b, d* – Force Volume (FV)

При исследовании механических свойств клеток наиболее востребованным параметром является модуль упругости. В режиме FV модуль упругости анализируется на основе силовых кривых, количество которых определяется разрешением изображения. Одновременно с модулем упругости из силовых кривых можно «извлекать» силу адгезии между острием зонда и поверхностью.

В наших экспериментах количество силовых кривых на изображение было 400. На один образец (необлученный или после облучения) анализировали сканы поверхности не менее 3–5 клеток от 3–4 животных, что дало большой массив данных, достаточный для построения статистических распределений значений двух механических параметров. Распределения модуля упругости и силы адгезии были проанализированы с помощью двухкомпонентной модели Гауссовой смеси (GMM) (рис. 3). Этот подход позволяет моделировать присутствие в популяции двух относительно однородных субпопуляций с разными значениями параметра.

При анализе карт механических и геометрических свойств участков поверхности контрольных фибробластов в надъядерной области (см. рис. 2) можно заметить, что участки с разными упругими и адгезивными свойствами могут соответствовать участкам плазмалеммы, к которым примыкает только слой кортикального актинового цитоскелета, и участкам плазмалеммы, контактирующей с другими более жесткими структурами цитоскелета. Такими структурами, например, могут быть стрессовые волокна. Для фибробластов первичных культур, выделенных из контрольных (необлученных) животных, характерно бимодальное распределение силы адгезии: области с низким значением силы адгезии (пик 1) и области с более высоким значением силы адгезии (пик 2) (см. рис. 3, *a* и *e*, табл. 1). Это распределение соответствует двухкомпонентному распределению модуля упругости: участки с более низким (пик 1) и более высоким (пик 2) значением параметра. Численные значения модуля упругости пика 2 соответствуют данным литературы по стрессовым волокнам (примерно 10 кПа) [4]. При этом вклады пиков 1 и 2 в общее распределение параметра для силы адгезии и модуля упругости не совпадают.

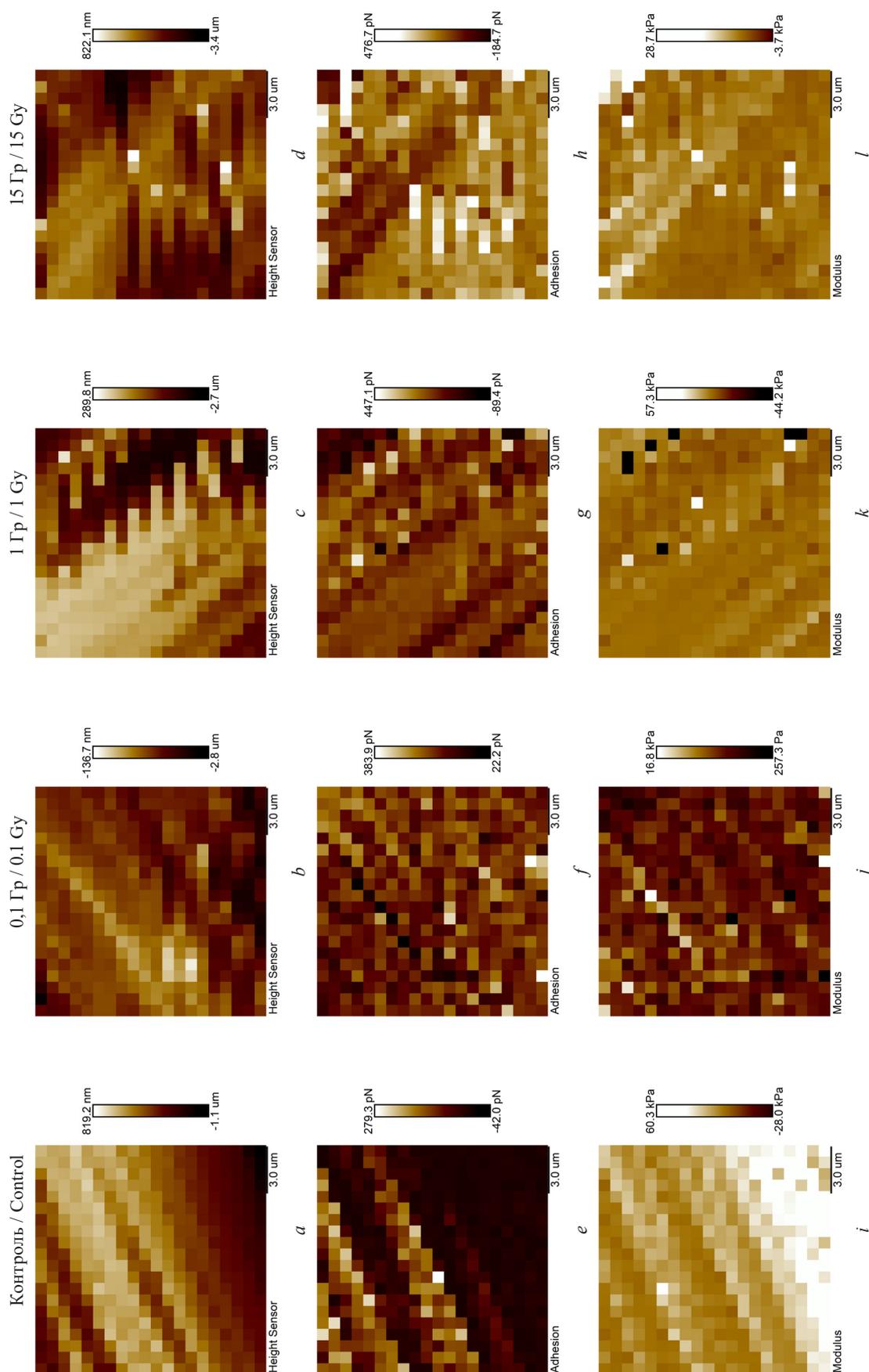


Рис. 2. Типичные FV-изображения малых участков поверхности фибробластов крысы в надъядерной области:  
*a-d* – топографические карты; *e-h* – карты сил адгезии; *i-l* – карты модуля упругости  
 Fig. 2. Typical FV images of small areas of the surface of rat fibroblasts in the nuclear region: *a-d* – topographic maps;  
*e-h* – maps of adhesion forces; *i-l* – maps of elastic modulus

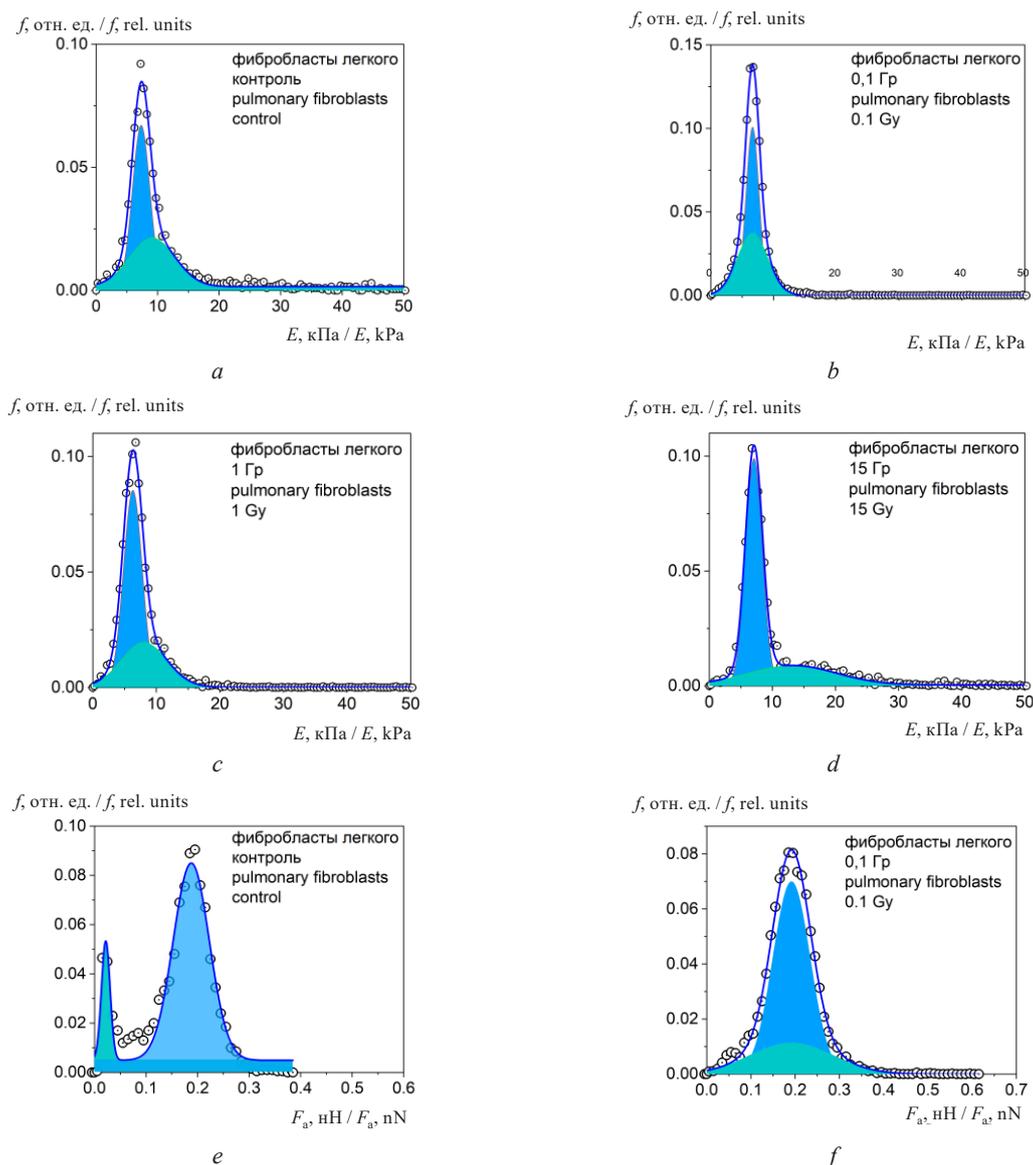


Рис. 3. Анализ распределения участков карт механических свойств с разными значениями: *a–d* – анализ распределения значения модуля упругости с помощью Гауссовой двухкомпонентной смеси; экспериментальные данные отмечены точками, кривые Гаусса, площадь по которым окрашена в голубой или зеленый цвета, соответствуют разным компонентам Гауссовой смеси, синей линией прорисованы суммарные кривые; численные значения моделирования представлены в табл. 1; *e–h* – анализ распределения значения силы адгезии с помощью Гауссовой двухкомпонентной смеси; экспериментальные данные отмечены точками; кривые Гаусса, площадь по которым окрашена в голубой или зеленый цвета, соответствуют разным компонентам Гауссовой смеси; синей линией прорисованы суммарные кривые; численные значения моделирования представлены в табл. 1. *i–l* – диаграммы рассеяния значений сил адгезии и модуля упругости для каждого пикселя АСМ-изображения и результаты кластеризации совокупностей значений на 2 или 3 кластера; пустыми серыми кругами отмечены экспериментальные данные, голубыми ромбами – центры кластеров, номера которых написаны рядом.  $F_a$  – сила адгезии,  $E$  – модуль упругости,  $f$  – относительная частота события (1-й фрагмент; окончание см. на с. 205)

Fig. 3. Analysis of the distribution of sections of maps of mechanical properties with different values: *a–d* – analysis of the distribution of elastic modulus using a Gaussian two-component mixture; experimental data are marked with dots, Gaussian curves, the area of which is colored blue or green, correspond to different components of the Gaussian mixture, and the total curves are drawn with a blue line; the numerical values of the simulation are shown in the table 1; *e–h* – analysis of the distribution of the adhesive force using a Gaussian two-component mixture; experimental data are marked with dots, Gaussian curves, the area of which is colored blue or green, correspond to different components of the Gaussian mixture, and the total curves are drawn with a blue line; the numerical values of the simulation are shown in the table 1; *i–l* – scattering diagrams of the values of adhesion forces and elastic modulus for each pixel of the AFM image and the results of clustering the sets of values into 2 or 3 clusters; the experimental data are marked with empty gray circles; blue diamonds mark the cluster centers, the numbers of which are written side by side.  $F_a$  is the adhesion force,  $E$  is the elastic modulus, and  $f$  is the relative frequency of the event (1<sup>st</sup> fragment; ending see on p. 205)

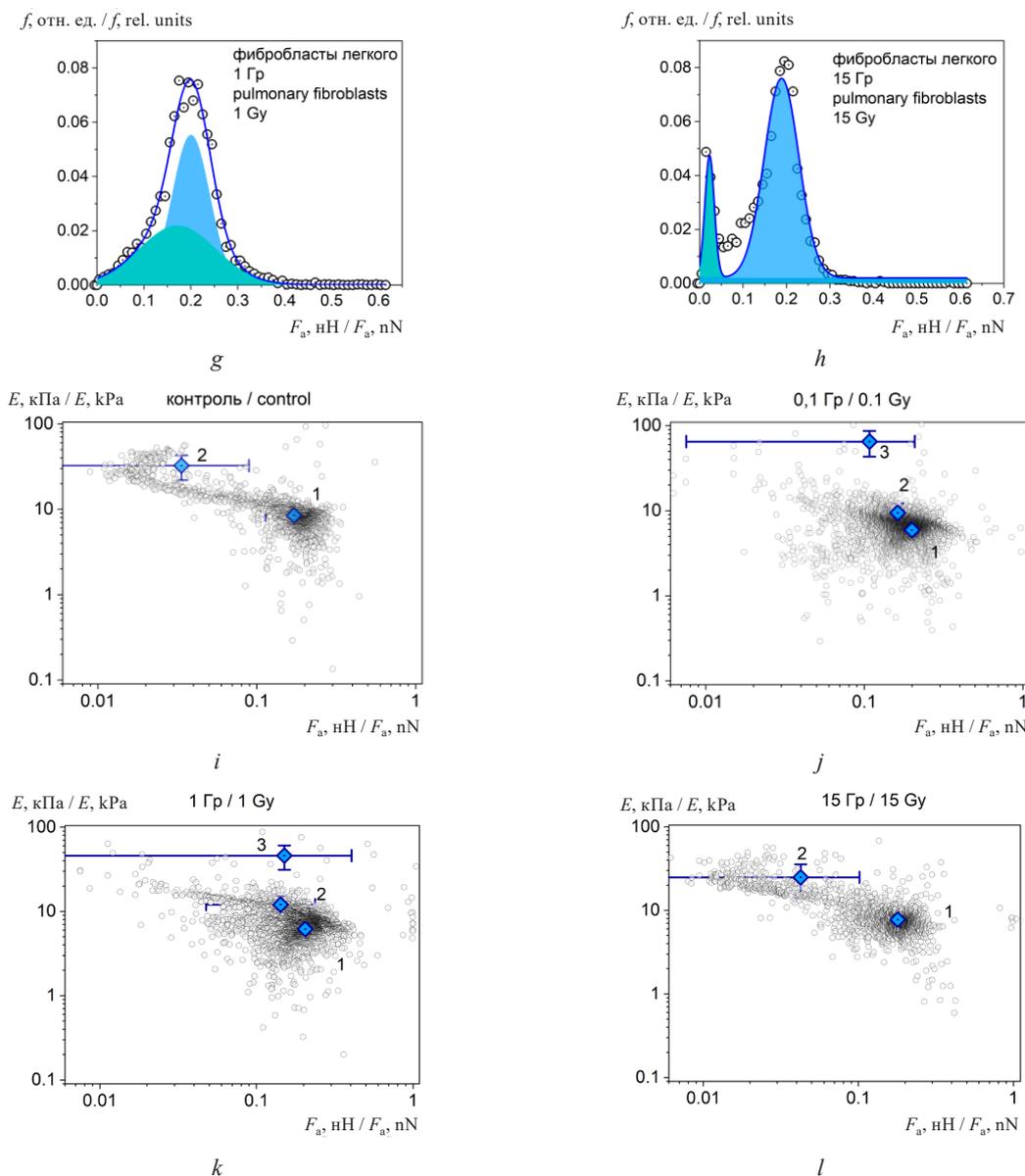


Рис. 3. Окончание (начало см. на с. 204)

Fig. 3. Ending (see the beginning on p. 204)

При рассмотрении распределения значений двух параметров для каждого пикселя изображения в пространстве  $(F_a, E)$  выявляется более четкая картина соответствия участков с разными параметрами. В результате проведения кластерного анализа выявлено, что имеются участки с низкими значениями модуля упругости и высокими значениями силы адгезии (91 %) и участки с высокими значениями модуля упругости и низкими значениями силы адгезии (9 %) (табл. 2). Последний кластер соответствует участкам поверхности, под которыми находятся стрессовые волокна фибробласта, что подтверждается при сравнении карт модуля упругости, карт адгезии и топографической карты участка. На топографической карте видны длинные нити, в области которых повышен модуль упругости и снижена сила адгезии (см. рис. 2, а, е, i).

При проведении анализа механических параметров для образцов фибробластов первичных культур, выделенных из легкого облученных животных после постлучевого периода, выявлены существенные изменения пространственного распределения механических свойств, зависящие от дозы облучения. Полученные данные показывают, что облучение животных перепрограммирует фибробласты, преобразуя существенно их механический фенотип. Облучение в малых (0,1 Гр) и средних (1 Гр) дозах после 3-недельного постлучевого периода качественно и количественно изменило распределение механических параметров в надъядерной зоне клетки.

Таблица 1. Результаты представления кривых распределения плотности вероятности механических параметров двумя функциями Гаусса

Table 1. Results of the representation of probability density distribution curves of mechanical parameters by two Gaussian functions

Модуль упругости / Modulus of elasticity					
Доза, Гр / Dose, Gy	Пик 1 / Peak 1		Пик 2 / Peak 2		R <sup>2</sup>
	E, кПа / kPa	N/N <sub>0</sub> , %	E, кПа / kPa	N/N <sub>0</sub> , %	
Контроль / Control	7,33 ± 1,43	56	9,14 ± 3,69	44	0,991
0,1	6,65 ± 1,23*,**	54	<b>6,65 ± 2,75*,**</b>	46	0,998
1	6,32 ± 1,74*,**	64	<b>8,06 ± 4,23*,**,#</b>	56	0,996
15	7,09 ± 1,34*	69	<b>13,16 ± 7,01*</b>	31	0,992
Сила адгезии / Adhesion force					
Доза, Гр / Dose, Gy	Пик 1 / Peak 1		Пик 2 / Peak 2		R <sup>2</sup>
	F <sub>a</sub> , нН / nN	N/N <sub>0</sub> , %	F <sub>a</sub> , нН / nN	N/N <sub>0</sub> , %	
Контроль / Control	0,188 ± 0,035	86	0,022 ± 0,008	14	0,954
0,1	0,192 ± 0,042*,**	73*,**	<b>0,192 ± 0,094*,**</b>	27	0,996
1	0,201 ± 0,040*,**	55*,**	<b>0,171 ± 0,082*,**,#</b>	45	0,987
15	0,189 ± 0,040	87	0,023 ± 0,011	14	0,931

Примечания. 1. Кривые распределения параметров были аппроксимированы с помощью двухкомпонентной модели Гауссовой смеси (GMM) с использованием программы OriginPro (R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации). Параметры кривых Гаусса: среднее и стандартное отклонение (M ± SD); N/N<sub>0</sub> в % – отношение площади пика к общей площади под кривой распределения параметра.

2. t-Критерий Уэлча: \*p < 0,0001 сравнение со средним контрольной (необлученной) культуры; \*\*p < 0,0001 сравнение со средним культуры, облученной в дозе 15 Гр; #p < 0,0001 сравнение со средним культуры, облученной в дозе 1 Гр.

3. z-Критерий: \*p < 0,0001 сравнение со значением для контрольной (необлученной) культуры; \*\*p < 0,0001 сравнение со значением для культуры, облученной в дозе 15 Гр.

Note s. 1. The parameter distribution curves were approximated using a two-component Gaussian mixture model (GMM) using the OriginPro program (R<sup>2</sup> is the coefficient of determination). Gaussian curve parameters: mean and standard deviation (M ± SD); N/N<sub>0</sub> in % is the ratio of the peak area to the total area under the parameter distribution curve.

2. Welch's t-test: \*p < 0.0001 comparison with the mean of the control (unirradiated) culture; \*\*p < 0.0001 comparison with the mean of the culture irradiated at a dose of 15 Gy; #p < 0.0001 comparison with the mean of the culture irradiated at a dose of 1 Gy.

3. z-Criterion: \*p < 0.0001 comparison with the value for control (unirradiated) culture; \*\*p < 0.0001 comparison with the value for the culture irradiated at a dose of 15 Gy.

Таблица 2. Результаты кластерного анализа для пар значений механических параметров каждого пикселя

Table 2. Results of cluster analysis for pairs of values of mechanical parameters of each pixel

Доза, Гр / Dose, Gy	Кластер 1 / Cluster 1	Кластер 2 / Cluster 2	Кластер 3 / Cluster 3
Контроль / Control	F <sub>a</sub> = 0,173 ± 0,058 нН / nN E = 8,39 ± 3,24 кПа / kPa 91 %	–	F <sub>a</sub> = 0,034 ± 0,056 нН / nN E = 32,29 ± 10,45 кПа / kPa 9 %
0,1	F <sub>a</sub> = 0,200 ± 0,057 нН / nN E = 5,92 ± 1,32 кПа / kPa 75 %	F <sub>a</sub> = 0,162 ± 0,056 нН / nN E = 9,45 ± 2,77 кПа / kPa 24 %	F <sub>a</sub> = 0,107 ± 0,100 нН / nN E = 65,02 ± 21,79 кПа / kPa 1 %
1	F <sub>a</sub> = 0,205 ± 0,071 нН / nN E = 6,16 ± 1,59 кПа / kPa 83 %	F <sub>a</sub> = 0,143 ± 0,095 нН / nN E = 12,02 ± 3,11 кПа / kPa 16 %	F <sub>a</sub> = 0,151 ± 0,254 нН / nN E = 45,96 ± 14,70 кПа / kPa 1 %
15	F <sub>a</sub> = 0,179 ± 0,072 нН / nN E = 7,75 ± 2,54 кПа / kPa 87 %	–	F <sub>a</sub> = 0,042 ± 0,059 нН / nN E = 24,86 ± 10,78 кПа / kPa 13 %

Примечание: кластеризация выполнена методом k-средних; значения параметров центров кластеров F<sub>a</sub> и E представлены в формате M ± SD; доля каждого кластера в общей совокупности представлена в %.

Note: clustering was performed using the k-means method; the values of the cluster center F<sub>a</sub> and E parameters are presented in the M ± SD format; the share of each cluster in the total population is presented in %.

Практически исчезли структуры с высоким модулем упругости и низкой адгезией, соответствующие стрессовым волокнам. Снизилось значение модуля упругости, соответствующее основным участкам поверхности клетки, что может свидетельствовать об уменьшении толщины слоя актинового дендритоподобного кортикального слоя, возможном при радиационно-индуцированной деполимеризации актина [8]. Пространственное распределение механических параметров становится более неоднородным и не описывается простой двухкластерной моделью (см. табл. 2).

Наблюдается тенденция дозозависимого роста вклада структур с повышенным модулем упругости (модуль упругости увеличивается с 6,65 кПа при дозе облучения 0,1 Гр до 13,16 кПа при 15 Гр) и со сниженной силой адгезии (сила адгезии уменьшается от 0,192 нН (0,1 Гр) до 0,023 нН (15 Гр)) (см. табл. 1).

Фибробласты первичных культур, выделенных из легкого животного, облученного в дозе 15 Гр, характеризуются двухкомпонентным распределением механических параметров (выделяют два кластера), схожих в общих чертах с распределением контрольного образца. При этом доля участков с низкими значениями модуля упругости и высокими значениями силы адгезии снижена до 87 %, а доля участков с высокими значениями модуля упругости и низкими значениями силы адгезии повышена до 13 % в сравнении с контролем (см. табл. 2).

Дозозависимое увеличение доли участков поверхности фибробластов с повышенными упругими и сниженными адгезионными свойствами может свидетельствовать о процессе радиационно-индуцированной трансформации фибробластов в миофибробласты. Последние характеризуются наличием сократительных стрессовых волокон, в состав которых входит белок  $\alpha$ -SMA. В миофибробластах актомиозиновые стрессовые волокна собираются в мощные поперечно-исчерченные пучки, что способствует поляризации клетки и формированию ее веретенообразной формы. Эти пучки заметны, например, на изображениях целых клеток, которые выделены из легкого животного, облученного в высокой дозе (см. рис. 1, с). Увеличение поглощенной дозы способствует формированию в фибробластах пучков стрессовых волокон с повышенной жесткостью, изменяя такие фундаментальные свойства фибробластов, как миграция и синтез белков межклеточного матрикса, что является ключевым механизмом в развитии фиброза в месте облучения [2, 5].

**Заключение.** С помощью АСМ-картирования механических свойств поверхности живых клеток установлены закономерности изменения пространственного распределения механических свойств поверхности фибробластов первичных культур, выделенных из легкого необлученных и облученных животных в зрелом возрасте и 3-недельного постлучевого периода. С изменением поглощенной дозы изменяется доля участков поверхности с повышенными упругими и сниженными адгезионными свойствами, характеризующих участки над стрессовыми волокнами, что свидетельствует о трансформации фибробластов в миофибробласты.

Полученные данные демонстрируют изменение механического фенотипа фибробластов в организме после облучения в течение раннего отдаленного периода, что может служить одним из ранних маркеров развития радиационно-индуцированного фиброза.

### Список использованных источников

1. Suzuki, M. Ionizing radiation induces premature senescence in human normal fibroblasts through a p53-dependent pathway / M. Suzuki, D. A. Boothman, J. M. Sedivy // *Experimental Cell Research*. – 2001. – Vol. 265, № 2. – P. 332–341. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5184>
2. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy / J. F. Straub, L. New, C. D. Hamilton [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 141, № 11. – P. 1985–1994. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-1974-6>
3. Atomic force microscopy probing of cell elasticity / T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov [et al.] // *Micron*. – 2007. – Vol. 38, № 8. – P. 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.06.011>
4. Deguchi, S. Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells / S. Deguchi, M. Sato // *Biorheology*. – 2009. – Vol. 46, № 2. – P. 93–105. <https://doi.org/10.3233/BIR-2009-0528>
5. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling / J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz [et al.] // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2002. – Vol. 3, № 5. – P. 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
6. Pellegrin, S. Actin stress fibres / S. Pellegrin, H. Mellor // *Journal of Cell Science*. – 2007. – Vol. 120, № 20. – P. 3491–3499. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>

7. Primary culture of lung fibroblasts from hyperoxia-exposed rats and a proliferative characteristics study / S. M. Zhao, H. M. Wu, M. L. Cao, D. Han // *Cytotechnology*. – 2018. – Vol. 70, № 2. – P. 751–760. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0179-z>
8. Hinz, B. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts / B. Hinz, G. Gabbiani // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2003. – Vol. 14, № 5. – P. 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.006>
9. Cytoskeleton Response to Ionizing Radiation: A Brief Review on Adhesion and Migration Effects / G. La Verde, V. Artiola, V. Panzetta [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9, № 9. – Art. ID 1102. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091102>

## References

1. Suzuki M., Boothman D. A., Sedivy J. M. Ionizing radiation induces premature senescence in human normal fibroblasts through a p53-dependent pathway. *Experimental Cell Research*, 2001, vol. 265, no. 2, pp. 332–341. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5184>
2. Straub J. F., New L., Hamilton C. D., Lominska C., Shnyder Y., Thomas S. M. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2015, vol. 141, no. 11, pp. 1985–1994. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-1974-6>
3. Kuznetsova T. G., Starodubtseva M. N., Yegorenkov N. I., Chizhik S. A., Zhdanov R. I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 2007, vol. 38, no. 8, pp. 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.06.011>
4. Deguchi S., Sato M. Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells. *Biorheology*, 2009, vol. 46, no. 2, pp. 93–105. <https://doi.org/10.3233/BIR-2009-0528>
5. Tomasek J. J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, vol. 3, no. 5, pp. 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
6. Pellegrin S., Mellor H. Actin stress fibres. *Journal of Cell Science*, 2007, vol. 120, no. 20, pp. 3491–3499. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>
7. Zhao S. M., Wu H. M., Cao M. L., Han D. Primary culture of lung fibroblasts from hyperoxia-exposed rats and a proliferative characteristics study. *Cytotechnology*, 2018, vol. 70, no. 2, pp. 751–760. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0179-z>
8. Hinz B., Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, vol. 14, no. 5, pp. 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.006>
9. La Verde G., Artiola V., Panzetta V., Pugliese M., Netti P. A., Fusco S. Cytoskeleton Response to Ionizing Radiation: A Brief Review on Adhesion and Migration Effects. *Biomedicines*. 2021, vol. 9, no. 9, art. ID 1102. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091102>