

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dose-dependent decrease in antioxidant capacity of whole blood after irradiation: A novel potential marker for biodosimetry / L. Sun [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – 7425.1 – 7425.8
2. Miura, Y. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging / Y. Miura // J. Radiat. Res. – 2004. – Vol. 45. – P. 357–372.
3. Изменения в кинетике хемиллюминесценции плазмы как мера системного окислительного стресса в организме человека / М. М. Созарукова [и др.] // Биофизика. – 2016 – Т. 61, № 2 – С. 337–344.

УДК 618.19-006.6:576.3

*А. Н. Шклярова<sup>1</sup>, И. А. Челнокова<sup>1</sup>, А. Ю. Крылов<sup>2</sup>,  
Э. А. Надьров<sup>3</sup>, М. Н. Стародубцева<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии НАН Беларуси»

г. Гомель, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Государственное учреждение образования

«Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»

г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup> Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

**CD109-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АДГЕЗИОННЫХ И УПРУГИХ СВОЙСТВ  
ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ BT-20**

**Введение**

Множественная лекарственная устойчивость является серьёзной проблемой в терапии рака. TGF- $\beta$ -зависимый путь передачи клеточных сигналов может быть ключевым фактором устойчивости рака к химиотерапии, таргетной терапии и иммунотерапии. Сигнальный путь с участием трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) может ингибировать клеточную пролиферацию на ранних стадиях онкогенеза и способствовать эпителиально-мезенхимальному переходу и инвазии в кровеносные и лимфатические сосуды на более поздних стадиях онкогенеза [1]. Антиген CD109 является ингибитором TGF- $\beta$  путей внутриклеточной сигнализации. Исследования последних лет показывают, что высокие уровни экспрессии антигена CD109 имеют место в клетках многих злокачественных опухолей, включая тройной негативный рак молочной железы, что позволяет рассматривать и антиген CD109 как бимаркер прогрессирования онкологического заболевания. CD109, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный белок, является корцептором TGF- $\beta$  и эффективным ингибитором передачи сигналов с участием TGF- $\beta$ . На всех этапах онкогенеза механические свойства клеток играют ключевую роль, ингибируя или стимулируя биологическую агрессивность опухолевых клеток в зависимости от клинического течения злокачественного новообразования. Влияние антигена CD109 на механические свойства клеток тройного негативного рака молочной железы не изучалось.

**Цель**

Установление с помощью атомно-силовой микроскопии в режиме PeakForce QNM CD109-зависимых изменений параметров механических свойств клеток рака молочной железы линии BT-20.

### *Материалы и методы исследования*

Культивирование клеток рака молочной железы линии BT-20 проводилось согласно протоколу: среда 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 % CO<sub>2</sub>. При достижении клетками 80-90% конfluence использовали раствор трипсин-ЭДТА (0,05 %; Life Technologies, USA), центрифугировали (200 g, 5 мин). Контрольными образцами являлись образцы клеток, выращенных при стандартных условиях, без какой-либо дополнительной обработки. Опытными образцами являлись образцы клеток после инкубации с антителами против антигена CD109 (Human/mouse CD109 PE-conjugated antibody/monoclonar mouse IgG2A, clone #496929, R&D System) в течение 30 минут. Монослой клеток фиксировали 2 % глутаровым альдегидом, дважды отмывали фосфатным буфером и дистиллированной водой, и высушивали при комнатной температуре в условиях ламинарного бокса.

Для изучения механических свойств использовался атомно-силовой микроскоп (АСМ) BrukerBioScope Resolve. Сканирование проводилось на воздухе с помощью зонда SCANASYST-AIR (Bruker, R = 2 нм, k = 0,4 Н/м) в режиме MIROview. Проводилось сканирование трех различных областей: ядерной, перинуклеарной и периферической зонах (размер сканирования составлял 1 мкм × 1 мкм, частота 0,3 Гц, разрешение 256 × 256 пикселей, рисунок 1). Калибровку зонда проводили перед сканированием образцов клеток контактным методом в соответствии с протоколом производителя микроскопа в несколько этапов. Постоянная жесткости кантилевера определялась путём термической настройки, а чувствительность кантилевера к отклонению определялась при индентировании жесткой поверхности чашки Петри.

Статистический анализ данных выполнен с помощью программы RStudio. Сравнительный анализ параметров выборки проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

### *Результаты исследования и их обсуждение*

Для удаления антигена CD109 из путей клеточной сигнализации в культурах клеток тройного негативного рака молочной железы линии BT-20 в работе использовался метод его иммобилизации с помощью связывания с антителами против антигена CD109 (анти-CD109 АТ). Иммобилизация CD109 таким образом приводила к изменению морфологических параметров клеток. На рисунке 1 представлены АСМ-изображения целых клеток контрольных образцов и образцов после инкубации с анти-CD109 АТ.

В клетках после инкубации с CD109 АТ ядра имели менее выраженные контуры, а в перинуклеарных зонах клеток имелось большое число гранул, которые располагались группами. Кроме того, опухолевые клетки после инкубации с анти-CD109 АТ имели более выраженные филоподии (рисунок 1, Б и Г). В местах локализации гранул поверхность клеток характеризовалась низкими силами адгезии и модуля упругости, а также повышенной деформируемостью.

В работе проведён анализ параметров механических свойств (силы адгезии и модуля упругости) для участков поверхности клеток микронного размера в трёх основных клеточных зонах: над ядром, перинуклеарной зоне и периферической зоне. При сравнительном анализе параметров свойств поверхности клеток не были использованы локальные места скопления обсуждённых выше гранул. Выявлено, что значения обоих параметров (силы адгезии и модуля упругости) были значительно повышены после реакции клеток тройного негативного рака молочной железы BT-20 с анти-CD109 АТ во всех трёх клеточных зонах (рисунок 2, А и Б).

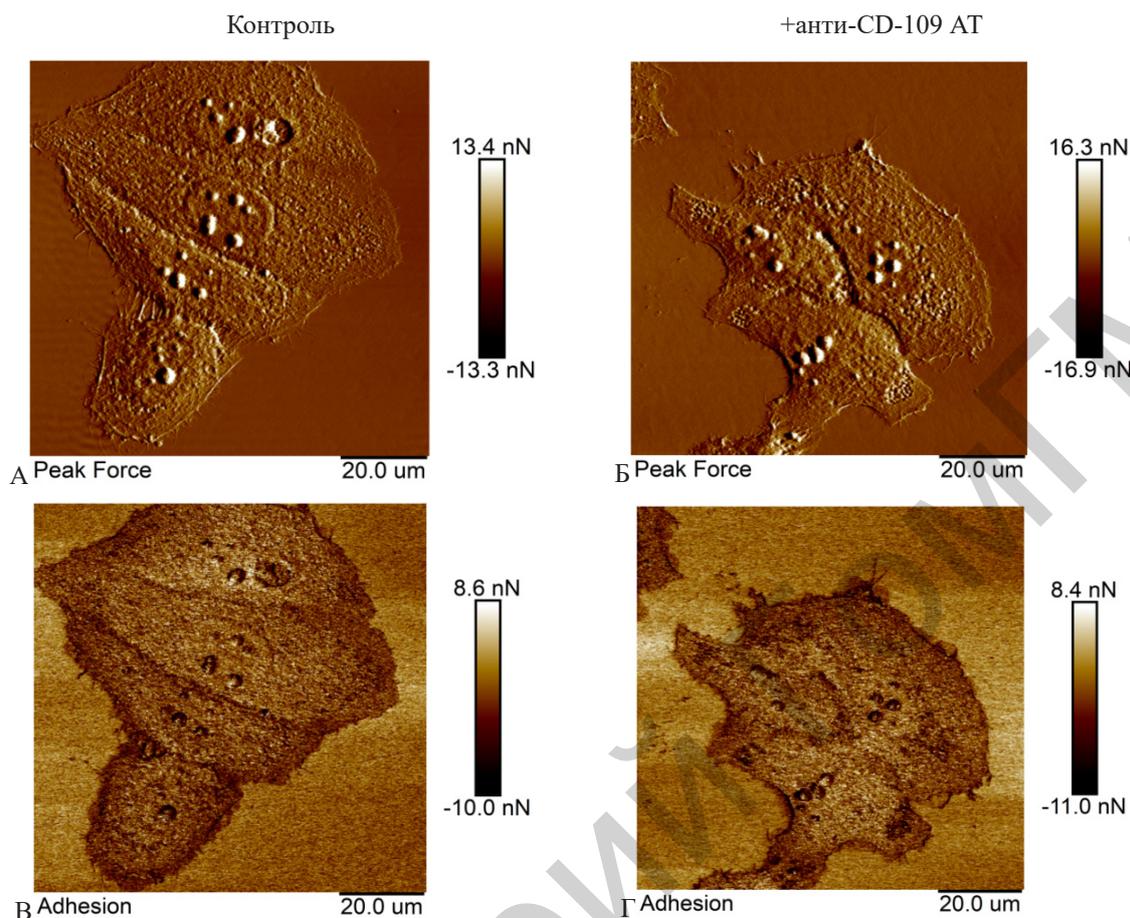


Рисунок 1 — АСМ-изображения целых клеток линии BT-20

А, В — контрольные клетки; Б, Г — клетки после инкубации с анти-CD 109 АТ

Примечание: изображения карт пиковой силы представлены на рисунках А и Б, изображения карт сил адгезии — на рисунках В и Г. Размер области сканирования —  $100 \times 100$  мкм, разрешение —  $512 \times 512$  пикселей

Полученные данные свидетельствует о том, что снижение уровня CD109 в клетках тройного негативного рака молочной железы может вызывать активацию передачи сигналов TGF- $\beta$ , приводящую к перестройке цитоскелета и усилению адгезионных и упругих свойств поверхности клеток. В литературе показано, что CD109 высвобождается с клеточной поверхности и его экспрессия нарушена при многих видах рака [2], предполагая, что CD109 может играть важную роль в прогрессировании рака.

### Выводы

Впервые изучено влияние антигена CD109 на механические свойства клеток тройного негативного рака молочной железы BT-20. Выявлено, что иммобилизация этого антигена с помощью реакции клеток с анти-CD109 антителами приводит к усилению адгезионных и упругих свойств поверхности клеток, что свидетельствует о перестройке структур их кортикального цитоскелета. Можно предположить, что усиление адгезионных и упругих свойств поверхности этих клеток приведёт к снижению степени агрессивности опухолевых клеток путём подавления их способности к пролиферации и инвазии в кровеносные и лимфатические сосуды.

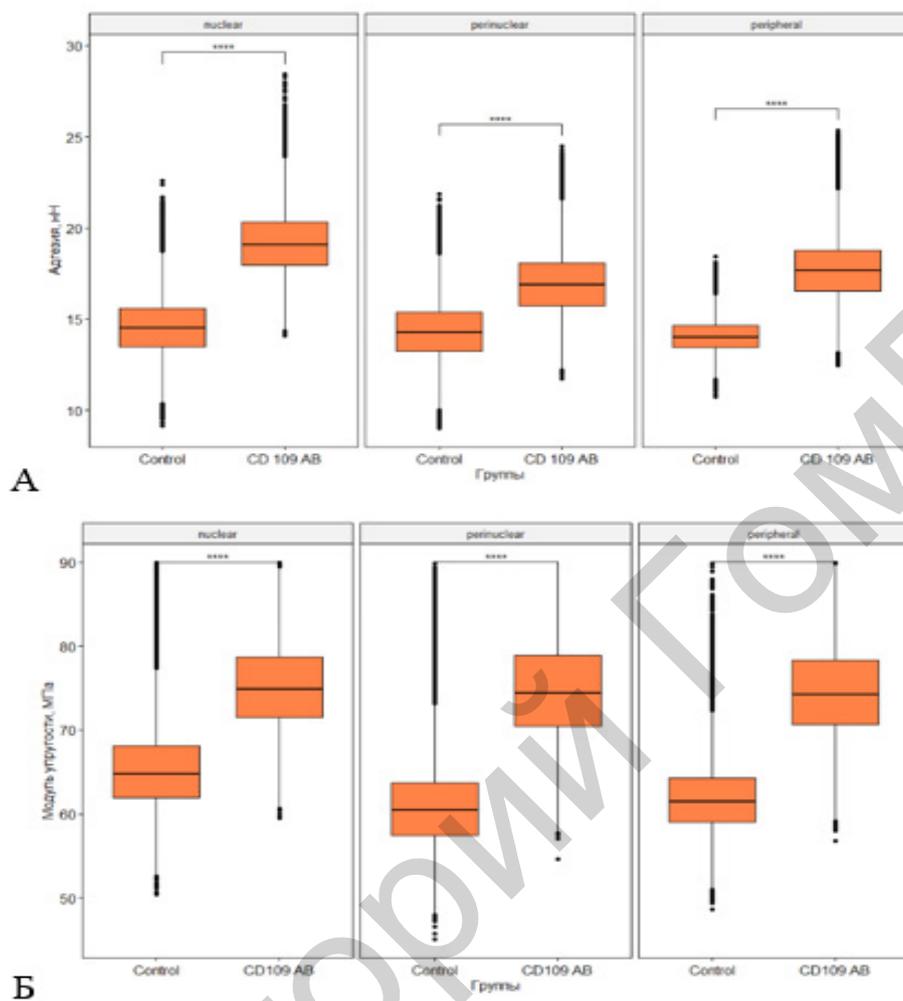


Рисунок 2 — Изменение параметров адгезионных (А) и упругих (Б) свойств микромасштабных участков поверхности клеток BT-20 после их реакции с анти-CD109АТ в разных клеточных зонах

Примечание: Изучены три клеточные зоны: ядерная (nuclear), перинуклеарная (perinuclear) и периферическая (peripheral). \*\*\*\*  $p < 0,001$ , U-критерий Манна — Уитни

Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ М22-048 (2022-2024 г.).

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cheng, K. Y. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Regulates Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Decreased Pyruvate Kinase M2 (PKM2) Expression in Cervical Cancer Cells / K. Y., Hao, M. Cheng // Med. Sci. Monit. – 2017. – 27(23) – P.2017–2028.
2. The TGF- $\beta$  co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF- $\beta$  receptors / A. A. Bizet [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2011. – Vol.1813 (5). –P.742–53.