

клетки BT-20 подтверждают наличие дополнительного к общепринятым механизму действия этого химиотерапевтического препарата – индуцирования апоптоза и реорганизации актинового цитоскелета на начальной стадии, что отражается в ослаблении как упругих, так и вязкостных свойств поверхностного слоя клеток.

Заключение. Анализ параметров биомеханического поведения раковых клеток с помощью методов атомно-силовой микроскопии и ONMD-метода позволил не только установить особенности механического фенотипа клеток тройного негативного рака молочной железы (линии BT-20), но и выявить специфичность данного типа рака к действию веществ, разрушающих плотный кортикальный слой актинового цитоскелета в этих клетках, что дает основание для поиска новых химиотерапевтических средств, механизм действия которых основан на разрушении структуры актинового цитоскелета.

Литература

1. Mechanical Properties and Nanomotion of BT-20 and ZR-75 Breast Cancer Cells Studied by Atomic Force Microscopy and Optical Nanomotion Detection Method. / M. N. Starodubtseva, N. M. Shkliarava, I. A. Chelnokova [et al.] // Cells. – 2023. – Vol. 12 (19). – Art. 2362.
2. Desouza, M. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. / M. Desouza, P. W. Gunning, J. R. Stehn // Bioarchitecture. – 2012. – Vol. 2 (3). – P. 75–87.
3. Kaya Çakir, H. *In vitro* anti-proliferative effect of capecitabine (Xeloda) combined with moctinostat (MGCD0103) in 4T1 breast cancer cell line by immunoblotting. / H. Kaya Çakir, O. Eroglu // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. – 2021. – Vol. 24 (11). – P. 1515–1522.
4. Capecitabine Can Induce T Cell Apoptosis: A Potential Immunosuppressive Agent With Anti-Cancer Effect. / S. Zhang, Z. Wang, S. Fane [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2021. – Vol. 12. – Art. 737849.
5. Mechanical dynamics of single cells during early apoptosis. / A. E. Pelling, F. S. Veraitch, C. P. Chu [et al.] // Cell Motility and the Cytoskeleton. – 2009. – Vol. 66 (7). – P. 409–422.
6. Dessard, M. Cytoplasmic viscosity is a potential biomarker for metastatic breast cancer cells / M. Dessard, J.-B. Manneville, J.-F. Berret // Nanoscale Advances. – 2024. – Vol. 6. – P. 1727–1738.

УДК 537.534.35:[616.5:576.3]:537.312.54

ОЦЕНКА С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ВЛИЯНИЯ НА УПРУГИЕ СВОЙСТВА ФИБРОБЛАСТОВ ОБЛУЧЕНИЯ РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ *IN VITRO И IN VIVO*

А. Н. Шклярова¹, И. А. Челнокова¹, М. Н. Стародубцева²

¹Институт радиобиологии НАН Беларусь, Гомель, Беларусь

²Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

В работе с помощью атомно-силовой микроскопии изучены особенности распределения упругих свойств поверхности фибробластов крысы в области над ядром для первичных культур фибробластов из кожи и лег-

кого в контроле и после облучения *in vitro* и *in vivo* рентгеновским излучением в дозах 1 и 10 (15) Гр. Выявлено вызванное облучением перераспределение субмикронных участков с разной жесткостью, свидетельствующее о формировании стрессовых волокон в ядерной области, что усиливает механические свойства этой области и может способствовать повышению продукции фибробластами белков внеклеточного матрикса, ведущего к радиационно-индуцированному фиброзу.

Ключевые слова: фибробlastы, крыса, модуль упругости, рентгеновское излучение.

Введение. Рентгеновское излучение, широко применяемое в медицине для диагностики и терапии, оказывает влияние на свойства и функции фибробластов, основных клеток соединительной ткани. Механические свойства фибробластов важны для осуществления различных клеточных процессов, включая пролиферацию клеток, их взаимодействие с окружением, миграцию, секрецию различных веществ и другое. Одним из серьезных проявлений действия ионизирующего излучения на организм является радиационный фиброз – патологическое состояние, вызываемое воспалительным процессом, при котором происходит с участием радиационно-измененных фибробластов чрезмерное разрастание соединительной ткани в органах с повышением жесткости [1]. Для понимания клеточных процессов развития радиационного фиброза необходимо установление общих механизмов изменения механического фенотипа фибробластов при облучении клеток как в клеточной культуре (*in vitro*), так и в организме (*in vivo*).

Целью исследования являлась оценка модуля упругости поверхности фибробластов крысы в биологических моделях с облучением *in vitro* и *in vivo* с помощью атомно-силовой микроскопии (Bruker Bioscope Resolve) в режиме сканирования Force Volume в жидкости и модели Сnedдона.

Результаты и обсуждение. В работе использованы первичные культуры фибробластов 13–14-месячных самцов крыс линии Wistar из двух органов: кожи и легкого. На рис. 1 представлены ACM-изображения фибробластов легкого контрольной культуры и облученных культур.

В работе записывали и анализировали участки поверхности клеток в ядерной области (размер участков – 25 × 25 мкм, количество силовых кривых – 256, скорость – 2 Гц, игла-зонд NSG-03 (TipsNano) с радиусом закругления 6 нм и жесткостью $(1,44 \pm 0,14)$ Н/м). Не было обнаружено различия параметров морфологии и упругих свойств для фибробластов из разных органов. При облучении культуры фибробластов *in vitro* наблюдали повышение жесткости поверхности клеток с увеличением дозы облучения от 1 до 10 Гр (табл. 1).

Данные, представленные в табл. 1, являются усредненными по отдельным клеткам. Однако для каждой клетки был получен массив данных, представляющий большое количество (700–1000) результатов тестирования механических свойств (силовых кривых) для многих субмикронных областей поверх-

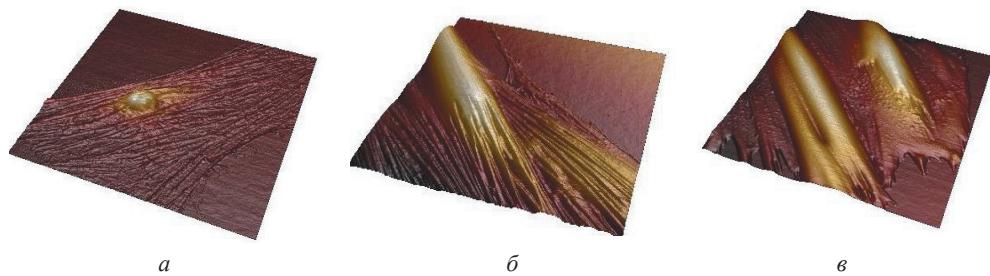


Рис. 1. Трехмерные ACM-изображения фибробластов легкого 14-месячных крыс: необлученных (а) и облученных в дозе 1 Гр (б) и 15 Гр (с)

П р и м е ч а н и е: изображения получены с помощью ACM Bruker Bioscope Resolve в режиме PeakForce QNM. Размер области сканирования – $94,7 \times 94,7 \text{ мкм}^2$, разрешение – 512×512 пикселей.

ности клетки. Для выявления особенностей пространственного распределения параметров механических свойств были проанализированы объединенные массивы данных, представляющие собой результаты тестирования каждой исследуемой в образце клетки. Распределение изучаемых параметров было неоднородным, и кривые распределения плотности параметров были аппроксимированы кривыми, представляющими собой сумму двух кривых Гаусса (табл. 2). Этот подход позволяет рассматривать существование неоднородности распределения благодаря присутствию в популяции относительно однородных субпопуляций с разными параметрами распределения.

Таблица 1. Упругие свойства фибробластов крысы в зависимости от типа и дозы облучения

| Модель | Критерий Краскела – Уоллиса | E, кПа | | |
|---|-----------------------------------|---|--|--|
| | | Контроль | Облучение | |
| Фибробlastы кожи, облучение <i>in vitro</i> | $\chi^2 = 18,11$ $p < 0,001$ | 7,76 (7,66;7,85) | 1 Гр 10,36 (8,65;12,14) $p = 0,016$ (критерий Данна с поправкой Бонферрони в сравнении с контролем) | 10 Гр 15,62 (11,66;26,33) $p < 0,001$ (критерий Данна с поправкой Бонферрони в сравнении с контролем) |
| Фибробlastы легкого, облуче- ние <i>in vivo</i> | $\chi^2 = 7,41$ $p = 0,025$ | 7,53 (6,85;9,53) $p = 0,013$ (критерий Манна – Уитни, сравнение с 1 Гр) | 1 Гр 6,67 (6,23;6,97) | 15 Гр 7,61 (6,75;9,02) $p = 0,049$ (критерий Манна – Уитни, сравнение с 1 Гр) |

П р и м е ч а н и е. В таблице результаты в виде медианы и границ интерквартильного размаха (Me(LQ;UQ)).

Таблица 2. Результаты представления кривых распределения плотности вероятности для модуля упругости двумя функциями Гаусса

| Доза, Гр | Пик 1 | | Пик 2 | | R^2 |
|----------|---------------------|-------------|----------------------|-------------|-------|
| | E , кПа | N/N_0 , % | E , кПа | N/N_0 , % | |
| Контроль | 6,30(3,39;11,69) | 81,5 | 35,89(20,39;63,17) | 18,5 | 0,991 |
| 1 | 9,35(5,14;17,02)* | 84,4 | 48,19(28,94;80,26)* | 15,6 | 0,990 |
| 10 | 13,09(6,26;27,38)** | 79,9 | 52,48(33,96;81,10)** | 20,1 | 0,996 |

Причина. Данные модуля упругости для всех областей и клеток были переведены в логарифмические значения, и их распределение аппроксимировано кривой, представляющей сумму двух кривых Гаусса с помощью программы Origin (R^2 – коэффициент детерминации). Параметры кривых Гаусса включали среднее значение и стандартное отклонение. В таблице результаты в виде «среднее значение ± стандартное отклонение» представлены в линейной шкале. $p < 0,0001$, t-критерий Уэлча.

*Сравнение со средним контролльной (необлученной) культуры.

**Сравнение со средним культуры, облученной в дозе 1 Гр.

Упругие свойства поверхности клеток определяются, как показано в многочисленных работах по АСМ клеток, структурой и свойствами кортикального цитоскелета. Участки поверхности фибробластов в ядерной области с разными упругими свойствами соответствуют участкам без включения и с включением в кортикальный цитозольный слой стрессовых актин-миозиновых фибрилл, характеризующихся наибольшей жесткостью среди актиновых элементов цитоскелета. Облучение культуры фибробластов *in vitro* вызывает увеличение доли этих элементов цитоскелета в ядерной области, особенно для 10 Гр. Более того, значения модуля упругости и первого пика после облучения увеличиваются, что может свидетельствовать и об изменении самой дендритоподобной структуры кортикального актинового цитоскелета.

Второй биологической моделью облучения фибробластов в наших опытах была модель облучения *in vivo*. Для этого верхняя часть туловища крыс подвергалась облучению с использованием рентгеновского аппарата X-RAD 320 Precision X-ray Inc (США), после чего крысы выводились из эксперимента через 21 день. Первичные культуры фибробластов получали из ткани легкого. Значения модуля упругости поверхности фибробластов в этом эксперименте представлены в табл. 1. Хотя дисперсионный анализ показывает значительные различия между сравниваемыми средними группами, результаты *post hoc* анализа не дают различия при множественном сравнении. Поэтому в таблице были проанализированы различия между группами с использованием критерия Манна – Уитни. После облучения фибробластов в организме и 21-дневного постлучевого периода установлено снижение жесткости фибробластов для дозы 1 Гр и дальнейшее повышение жесткости при увеличении дозы до 15 Гр. На рис. 2 представлены данные распределения значений модуля упругости в пределах ядерной зоны в зависимости от высоты этой зоны в клетке для контрольных образцов и образцов фибробластов из крыс, облученных в дозе 15 Гр. Несмотря на близость усредненных для отдельных клеток значений модуля упругости поверхности фибробластов контрольных и облученных 15 Гр об-

разцов, на рисунке ясно видно, что после облучения плотность участков с большим модулем упругости в районе центральной самой высокой точки ядра увеличена для образцов после облучения. Полученные данные свидетельствуют о повышении плотности стрессовых фибрилл в районе ядра фибробластов после облучения в высокой дозе и 21-дневного постлучевого периода.

Увеличение жесткости клетки в области ядра оказывает значительное влияние на синтетическую функцию фибробластов. Возможно, именно радиационно-индуцированное увеличение жесткости ядерной области способствует интенсификации секреции проколлагена радиационно-измененными фибробластами [2], что создает условия для развития фиброза в соответствующих тканях (в наших экспериментах – кожи и легкого).

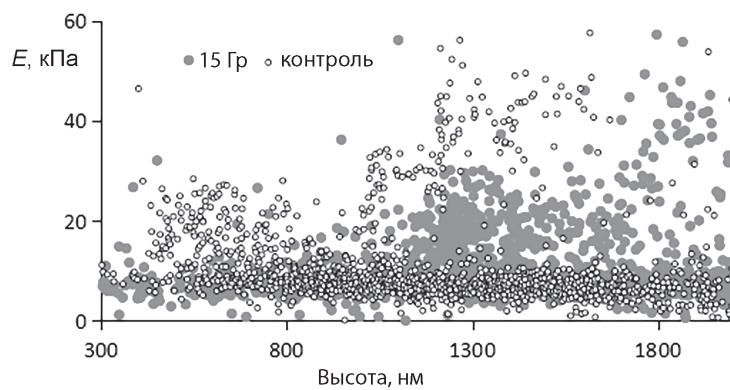


Рис. 2. Пространственное распределение значений модуля упругости на участках поверхности фибробластов над ядром в зависимости от высоты расположения точки индентирования

П р и м е ч а н и е. Максимальная высота ядерной области (по оси z) принята за 2000 нм, все остальные значения соответствуют областям ядерной зоны, расположенным ниже.

Заключение. С помощью ACM в режиме сканирования Force Volume установлены характерные особенности распределения упругих свойств по поверхности фибробластов в области ядра и их изменения, вызванные действием рентгеновского излучения в разных дозах *in vitro* и *in vivo*. Продемонстрировано увеличение жесткости ядерной области фибробластов после облучения с использованием разных биологических моделей, что может являться общим из ведущих механизмов усиления производства клетками белков внеклеточного матрикса и развития радиационно-индуцированного фиброза.

Литература

1. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy / J. M. Straub, J. New, C. D. Hamilton [et al.] // Journal of cancer research and clinical oncology. – 2015. – Vol. 141. – P. 1985–1994.
2. A model for collagen secretion by intercompartmental continuities / L. Bunel, L. Pincet, V. Malhotra [et al.] // PNAS. – 2024. – Vol. 121, No. 1. – Art. e2310404120.