

6. Switch of fractal properties of DNA in chicken erythrocytes nuclei by mechanical stress / S. V. Grigoriev, E. G. Iashina, V. Y. Bairamukov [et al.] // Physical Review E. – 2020. – Vol. 102. – Art. 032415.
7. Bifractal structure of chromatin in rat lymphocyte nuclei / E. G. Iashina, E. Y. Varfolomeeva, R. A. Pantina [et al.] // Physical Review E. – 2021. – Vol. 104. – Art. 064409.
8. Observation of nucleic acid and protein correlation in chromatin of HeLa nuclei using small-angle neutron scattering with D-{2}O-H-{2}O contrast variation / S. V. Grigoriev, E. G. Iashina, B. Wu [et al.] // Physical Review E. – 2021. – Vol. 104. – Art. 044404.
9. Spatial model of the organization of chromatin in the nucleus of a biological cell according to small-angle scattering data / E. G. Iashina, E. Y. Varfolomeeva, R. A. Pantina [et al.] // JETP Letters. – 2023. – Vol. 118. – P. 779–784.
10. Indentation of living cells by AFM tips may not be what we thought! / O. Thomas-Chemin, C. Séverac, E. Trévisiol, E. Dague // Micron. – 2023. – Vol. 174. – Art. 103523.

УДК 615.2:[620.3:576.3]:618.19-006.6

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА НАНОМЕХАНИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**М. Н. Стародубцева^{1,2}, А. Н. Шклярова², И. А. Челнокова²,
М. И. Виллалба³, А. Ю. Крылов⁴, Э. А. Надыров¹, С. Касас³**

¹Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

²Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

³Лозаннский университет, Лозанна, Швейцария

⁴Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Беларусь

В работе на основе данных атомно-силовой микроскопии в режимах PeakForce QNM и Force Volume, а также оптического метода анализа наноподвижности ONMD представлен анализ особенностей пространственного распределения наномеханических свойств поверхности клеток тройного негативного рака молочной железы (линия BT-20), связанного со структурой кортикального актинового цитоскелета, и продемонстрированы изменения параметров биомеханических свойств клеток в ответ на вещества, реорганизующие актиновый цитоскелет и вызывающие апоптоз раковых клеток. Выявлено цитохалазин-зависимое повышение параметра наноподвижности клеток BT-20 в адгезированном состоянии и уменьшение упругих и вязкостных свойств кортикального слоя клетки BT-20, вызванное действием химиотерапевтического лекарственного средства, капецитабина.

Ключевые слова: наномеханические свойства, наноподвижность, рак молочной железы, актиновый цитоскелет, модуль упругости.

Введение. Опухолевая трансформация клеток затрагивает практически все клеточные системы, включая цитоскелет. Актиновый цитоскелет радикально перестраивается при этом, обеспечивая раковым клеткам повышенную пролиферацию и миграцию. Актиновый цитоскелет также играет важную роль в апоптозе клеток, что важно при удалении раковых клеток и регрессии опухоли. Изменения в динамике актинового цитоскелета могут как запускать, так и определять пути развития апоптоза. В исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* продемонстрирован противоопухолевый эффект препаратов, нацеленных на реорганизацию актинового цитоскелета. Было показано, что цитохалазины ингибируют подвижность клеток, стимулируемую цитокинами, и оказывают на них антитромиферативное действие. Структура актинового кортикального цитоскелета определяет механическое поведение поверхности клеток, которое можно изучать с помощью атомно-силовой микроскопии и методов изучения наноподвижности клеток [1]. Особенности структуры актинового цитоскелета раковых клеток, устойчивых к классическим лекарственным препаратам, способствуют выживанию клеток, что приводит к ухудшению прогноза для онкологических больных. Характерные для раковых клеток особенности структуры актинового цитоскелета могут представлять собой потенциальные мишени действия новых противоопухолевых средств [2]. Оценка параметров наномеханического поведения поверхности раковых клеток в ответ на действие веществ, потенциально вызывающих апоптоз в этих клетках, является перспективной для поиска новых стратегий лечения трудно поддающихся классической терапии видов рака.

Целью работы явилось определение с помощью методов атомно-силовой микроскопии и оптического метода определения наноподвижности (ONMD) изменения параметров упругих свойств и наноподвижности клеток тройного негативного рака молочной железы (линия BT-20) при использовании веществ, вызывающих апоптоз.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены ACM-изображения клеток, а в таблице – параметры механических свойств поверхности клеток BT-20, полученные при сканировании живых клеток с помощью ACM Bruker Bioscope Resolve в режимах PeakForce QNM и ForceVolume. Особенностью клеток BT-20 являются хорошо развитые контакты между соседними клетками (рис. 1).

Анализ параметров наномеханических свойств клеток BT-20 показал гетерогенность распределения этих свойств как по поверхности клеток (ядерной и перинуклеарной областей) (см. таблицу), так и по объему клеток в направлении от поверхности к ядру.

Для живых клеток на глубине индентирования 20 нм модуль упругости равен 32,56(26,40;42,28) МПа (глубина индентирования равна 17,3(15,4;18,18) нм), а на глубине индентирования 120 нм модуль упругости равен 888,3(603,5;1153,2) кПа (глубина – 114,8(104,8;130,0) нм). Полученные данные показывают наличие жесткого коркового слоя с относительно мягкой центральной частью в клетках BT-20. Эти данные подтверждаются данными о распределении структур

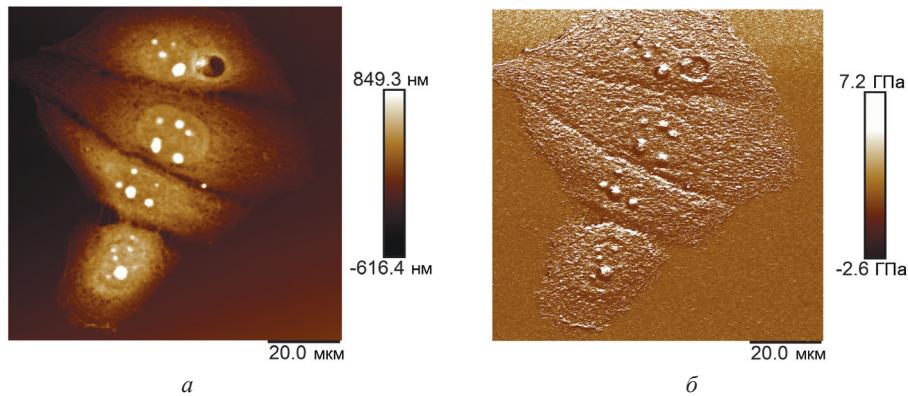


Рис. 1. ACM-изображения клеток BT-20 в химически фиксированном состоянии на воздухе, записанные в режиме PeakForce QNM: *а* – топографическая карта; *б* – карта модуля упругости

Механические параметры поверхности клеток BT-20

Область клетки	Фиксированные и высушенные		Живые	
	F_a , нН	E , МПа	F_a , нН	E , кПа
Ядерная	13,50 (9,82;18,10)	61,90 (54,50;71,50)	4,20 (3,77;4,57)	934,19 (284,95;1364,12)
Перинуклеарная	13,30 (9,27;18,20)	57,70* (49,80;67,40)	4,74 (4,34;5,09)**	2112,02 (1075,33;2861,66)

Примечание. Данные представлены как медиана и границы интерквартильного интервала ($Me(LQ;UQ)$). * $p < 0,002$ и ** $p < 10^{-6}$ в сравнении с соответствующим параметром для ядерной области (U-критерий Манна – Уитни).

цитоскелета: имеется тонкий кортикальный слой повышенной плотности актинового цитоскелета и относительно слабо развитый цитокератиновый цитоскелет по объему клетки, что и является отличительной особенностью клеток при этом типе рака [1].

Механическое поведение клеток BT-20 после введения в клеточную систему цитохалазина D, лекарственного препарата, вызывающего нарушение структуры актинового цитоскелета и апоптоз, было исследовано с помощью ONMD-метода. На рис. 2 показаны значения сигнала наноподвижности (ONM-сигнала) (относительная скорость нанодвижения по отношению к значению контрольного образца в отн. ед.) для раковых клеток до и после введения цитохалазина D в клеточные культуры. Цитохалазин D существенно увеличивает наноподвижность клеток, прикрепленных к подложке. Учитывая факт наличия у клеток тонкого слоя хорошо развитого актинового цитоскелета, участвующего в процессах адгезии клеток к подложке, то повышение наноподвижности клеток при разрушении этих структур для адгезированного состояния клеток хорошо объяснимо.

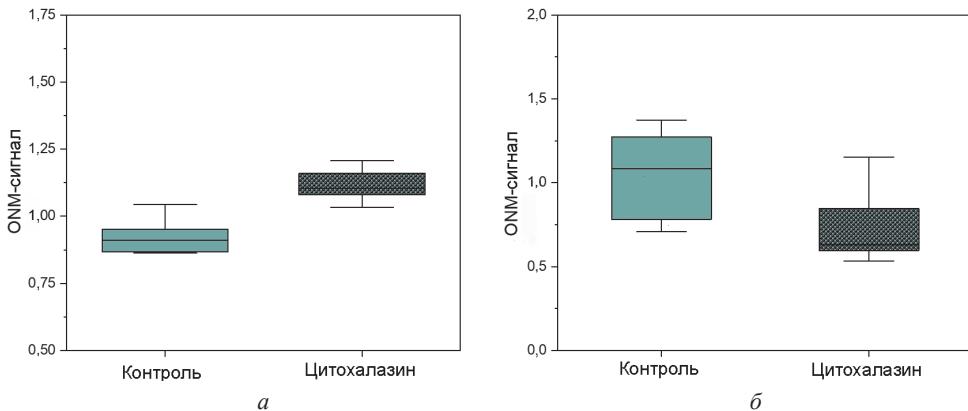


Рис. 2. Параметры ONM-сигнала для клеток BT-20 после 30-минутного инкубирования без цитохалазина D и с цитохалазином D в свободном состоянии (неприкрепленных к подложке) (а) и адгезированном состоянии (прикрепленных к подложке) (б).

U-критерий Манна – Уитни: $p < 0,01$

Капецитабин является противоопухолевым препаратом группы антиметаболитов, подгруппы антагонистов пиrimидинов и используется для химиотерапии различных видов рака, включая рак молочной железы. В последние годы выявлено, что капецитабин может вызывать апоптоз раковых клеток 4T1 в зависимости от времени и концентрации [3], а также апоптоз Т-клеток [4]. С помощью ACM-сканирования поверхности клеток над ядром в режиме ForceVolume и анализа с использованием реологической модели sPLR было выявлено, что при 37 °C после добавления капецитабина в культуру клеток трижды негативного рака молочной железы наблюдалось резкое снижение модуля упругости по всей глубине клетки, но особенно резко – у плазмалеммы. Так, модуль упругости на глубине 350 нм изменился с $E_0 = 7,20(4,10;10,90)$ кПа до $3,92(3,05;4,95)$ кПа, а на глубине индентирования 950 нм – с $1,56(1,19;1,94)$ кПа до $0,99(0,81;1,19)$ кПа (критерий Манна – Уитни: $p < 0,05$). Без учета глубины индентирования комплексный модуль после введения капецитабина снизился с $3,27(2,02;6,58)$ кПа до $3,05(2,45;4,20)$ кПа (критерий Манна – Уитни: $p < 0,05$), при этом вязкостный коэффициент уменьшился в значительно большей степени: с $9,78(3,41;32,20)$ кПа до $5,63(2,91;10,86)$ кПа (критерий Манна – Уитни: $p < 0,0005$). Тангенс потерь, представляющий собой отношение вязкого и упругого компонентов комплексного модуля, составил $0,31(0,275;0,328)$ в контроле и $0,22(0,21;0,24)$ после добавления капецитабина (критерий Манна – Уитни: $p < 0,05$). Снижение модуля упругости характерно для клеток, погибающих по различным программам гибели, включая апоптоз [5]. Как недавно было предположено, вязкостные свойства цитоплазмы могут определять метастатический потенциал клеток рака молочной железы [6]. Кроме того, уменьшение вязкости цитоплазмы способствует апоптозу клеток, так как помогает скоплению рецепторов смерти и усилинию внутриклеточного транспорта на ранних этапах апоптоза. Полученные данные о действии капецитабина на

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 moectinostat (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-