

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ, МЕХАНИКИ И ОПТИКИ

на правах рукописи



Халисов Максим Миндигалеевич

**Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования отклика нативных клеток
на внешние воздействия**

специальность

01.04.01 Приборы и методы экспериментальной физики

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель

д.ф.-м.н. Анкудинов Александр Витальевич

Санкт-Петербург – 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1 МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ	9
1.2 МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК.....	10
1.3 АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ И МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК	16
1.3.1 АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ – ВИД СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ	16
1.3.2 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК	18
1.3.3 КВАЗИСТАТИЧЕСКИЕ РЕЖИМЫ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	19
1.3.4 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК	22
1.3.5 ДОСТОИНСТВА И НЕДОСТАТКИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ НАТИВНЫХ КЛЕТОК	25
1.3.6 МЕХАНИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ РАСЧЕТА МОДУЛЯ ЮНГА В АТОМНО- СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	26
2. ИЗУЧЕНИЕ НАТИВНЫХ КЛЕТОК В РЕЖИМЕ РЕАКFORCE QNM АТОМНО- СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	30
2.1 ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ И ПРИНЦИП РАБОТЫ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА	30
2.2 АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОП ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ BIOSCOPE CATALYST	33
2.3 РЕЖИМ ПОТОЧЕЧНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ РЕАКFORCE QNM И ЕГО ОСОБЕННОСТИ	34
2.4 ВЫБОР ЗОНДОВОГО ДАТЧИКА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОГО МОДУЛЯ ЮНГА НАТИВНЫХ КЛЕТОК В РЕЖИМЕ РЕАКFORCE QNM.....	39
2.5 ПРОБОПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ НАТИВНЫХ КЛЕТОК. ВЫБОР ПОДЛОЖКИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ НАТИВНЫХ КЛЕТОК	41
2.6 ИЗМЕРЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОГО МОДУЛЯ ЮНГА НАТИВНЫХ КЛЕТОК В РЕАКFORCE QNM.....	42
2.7 ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ИЗУЧЕНИЮ КЛЕТОК И ВЫБОР ПАРАМЕТРОВ СКАНИРОВАНИЯ РЕЖИМА РЕАКFORCE QNM.....	46
2.8 ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОБРАБОТКЕ ДАННЫХ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	48
2.9 АРТЕФАКТЫ ИЗОБРАЖЕНИЙ НАТИВНЫХ КЛЕТОК В РЕЖИМЕ РЕАКFORCE QNM АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	48

3. ПРИМЕНЕНИЕ КАНТИЛЕВЕРОВ С РАЗЛИЧНОЙ ФОРМОЙ КОНЧИКА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ УСТРОЙСТВА ПРИПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ НАТИВНЫХ КЛЕТОК	54
3.1 ИССЛЕДОВАНИЕ НАТИВНЫХ КЛЕТОК ЗОНДАМИ С РАЗНОЙ ГЕОМЕТРИЕЙ КОНЧИКА.....	54
3.2 ПРОБОПОДГОТОВКА НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ИХ ЗОНДИРОВАНИЮ	56
3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ЗОНДИРОВАНИЯ НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КАНТИЛЕВЕРАМИ С РАЗНОЙ ГЕОМЕТРИЕЙ КОНЧИКА.....	58
3.4 ВЫВОДЫ ОБ УСТРОЙСТВЕ НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ДАННЫХ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	63
4. ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	69
4.1 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ И ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ.....	69
4.2 ПОДГОТОВКА НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ К ИССЛЕДОВАНИЮ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	77
4.3 ИЗУЧЕНИЕ НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ, ПРИКРЕПЛЕННЫХ К ПОЛИЛИЗИНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ, С ПОМОЩЬЮ РЕЖИМА REAKFORCE QNM АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	77
4.4 ВЫВОДЫ О ДИНАМИКЕ ПОВЕДЕНИЯ НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ НА ПОЛИЛИЗИНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ	82
5. ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	87
5.1 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ.....	87
5.2 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ НАТИВНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ИХ ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ РЕЖИМА REAKFORCE QNM АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	92
5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ НАТИВНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА.....	94
5.4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОГО МОДУЛЯ ЮНГА НАТИВНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК.....	99
6. АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ НА НАТИВНЫЕ СЕНСОРНЫЕ НЕЙРОНЫ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИМ ЭФФЕКТОМ	105
6.1 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОБЪЕКТОВ КЛЕТОЧНОЙ НЕЙРОБИОЛОГИИ.....	105

6.2 МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ЗОНДИРОВАНИЮ НАТИВНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ	108
6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ НАТИВНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА	110
6.4 АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ О ДЕТЕКТИРОВАНИИ ВЛИЯНИЯ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ, НА НАТИВНЫЕ СЕНСОРНЫЕ НЕЙРОНЫ	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
БЛАГОДАРНОСТИ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125

ВВЕДЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) все больше используется для изучения различных биологических объектов, в особенности животных клеток. Дальнейшему развитию этого направления исследований могут способствовать появившиеся недавно коммерческие АСМ системы, специально адаптированные для работы с нативными клетками в физиологически адекватных условиях (в жидкой среде при оптимальной температуре). Адаптация достигается в том числе за счет полноценной реализации квазистатических режимов (PeakForce QNM, Bruker; Hybrid Mode, НТ-МДТ СИ и т.д.), позволяющих поточно детектировать нагрузочно-разгрузочные индентационные зависимости (силовые кривые АСМ). В этих режимах благодаря автоматической обработке массивов данных с силовыми кривыми существенно повышена информативность АСМ измерений. Исследователь получает доступ не только к рельефу, но и к разнообразным формально определенным локальным механическим характеристикам клетки, таким как контактная жесткость, деформация, сила адгезии зонда к образцу, диссипация энергии в нагрузочно-разгрузочном цикле, эффективный модуль Юнга. Это создает благоприятные условия для расширения АСМ исследований морфологии и механических свойств нативных клеток, нацеленных на биомедицинские применения, такие как определение физиологического и патологических состояний клетки, изучение действия токсинов и лекарств на клеточном уровне.

В биомедицине востребованы рутинные методики изучения индивидуальных клеток с помощью АСМ. Становление таких методик тормозит недостаточное понимание взаимосвязей между свойствами (геометрическими и механическими) и функциональным состоянием клеток, а также неполнота информации о меж- и внутритиповой индивидуальности клеток.

Кроме этих фундаментальных знаний рутинные методики исследования клеток должны опираться на данные надежных методических АСМ экспериментов, проясняющих вклады в результаты измерений различных возмущающих факторов: влияния параметров пробоподготовки на свойства объекта (состава окружающей среды, способа адгезивной обработки подложки, температуры); характеристик зондового датчика, суммарной энергии, поглощенной клеткой при АСМ измерениях; реологических свойств клеток (зависимости от скорости индентирования). Кроме того, необходимо учитывать ограниченность контактных моделей теории упругости, традиционно применяемых для анализа механического отклика клетки на АСМ воздействие.

Представленные в работе результаты объединены под названием «Применение АСМ для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия» и получены как раз в такого рода методических экспериментах. В качестве образцов для этих экспериментов были выбраны нативные фибробласты, эритроциты, микрососудистые эндотелиальные клетки, сенсорные нейроны, – достаточно традиционные тестовые объекты для биомедицинских исследований другими методами, альтернативными АСМ.

Все вышесказанное обосновывает актуальность диссертации.

Цель работы: разработка и адаптация методик АСМ для достоверного и надежного детектирования механических и геометрических характеристик нативных объектов (клеток животных), обеспечивающего возможность использования этих характеристик, как индикаторов внешних воздействий на такие объекты.

Задачи:

- Разработать АСМ методику определения неоднородностей механических свойств наружных слоев нативного объекта. Исследовать с ее помощью фибробласты сердечной ткани.
- Развить способы измерения геометрических и механических характеристик нативных эритроцитов, продолжительное время контактирующих с полилизиновой подложкой.
- Применяя АСМ, определить значения эффективного модуля Юнга нативного микрососудистого эндотелия в областях с толщиной слоев на твердой подложке, сравнимой с глубиной индентирования. Исследовать отклик этого параметра на специфические ингибиторы полимеризации цитоскелета.
- Адаптировать АСМ методику измерений эффективного модуля Юнга для исследования нативных сенсорных нейронов и детектирования их отклика на вещества с анальгетическим эффектом.

Научная новизна работы:

1. Обнаружено, что жесткость биомеханической системы: «зонд атомно-силового микроскопа – нативный объект (фибробласт куриного эмбриона в жидкой питательной среде) – коллагеновая подложка» не зависит от размеров вершины зонда, если радиус ее кривизны порядка или менее 100 нм, а время индентирования составляет $\sim 10^{-3}$ с. Это также показывает, что, варьируя радиус кривизны вершины АСМ зонда в диапазоне от единиц до сотен нанометров, можно проявить в устройстве нативных фибробластов ткани сердца куриных эмбрионов более жесткую, по сравнению с внутренностью, внешнюю оболочку. Результат представляет собой новую и достаточно универсальную возможность для изучения устройства внешних слоев нативных клеток методом АСМ.
2. При исследовании с помощью АСМ в режиме количественной наномеханики эффективного модуля Юнга нативных клеток необходимо учитывать дополнительное натяжение плазматической мембраны, вызванное контактом с подложкой. Обнаружено, что у нативных крысиных эритроцитов на полилизиновой подложке эффект, не нарушая целостности объектов, приводит, как минимум, к 3-х кратному увеличению их эффективного модуля Юнга.
3. Доказано, что близость твердой подложки не влияет на детектирование методом АСМ изменений эффективного модуля Юнга цитоскелета, возникающих под действием

специфических ингибиторов. При индентировании в квазистатическом режиме АСМ дистальных областей микрососудистого эндотелия мышинных легких толщиной ~100 нм наблюдается уменьшение эффективного модуля Юнга, вызванное ингибиторами компонентов цитоскелета (актина, тубулина, миозина), даже при величине деформации, сравнимой с толщиной образца.

4. Продемонстрировано, что метод АСМ позволяет при миллисекундных временах индентирования измерять изменения эффективного модуля Юнга клеток при контакте с полилизинном или фибронектином, вызванные фармакологическим веществом. Действие убаина на нативные сенсорные нейроны куриных эмбрионов приводит к увеличению твердости сомы этих клеток в 1,5 раза. Показано также, что коленовая кислота, как и убаин, не модифицирует морфологию клеток, и, в отличие от последнего, не меняет их твердости.

Практическая значимость работы:

1. Механические свойства нативных фибробластов сердечной ткани куриных эмбрионов более точно и достоверно характеризует контактная жесткость, чем эффективный модуль Юнга, вычисленный по моделям Снеддона и ДМТ для стандартных острых и субмикронных сферических зондов соответственно.
2. Исследования механических свойств нефиксированных эритроцитов крыс показали, что необходимая для АСМ измерений иммобилизация этих клеток на полилизине может приводить к существенной зависимости измеряемых значений эффективного модуля Юнга от времени. Эффект важно учитывать в разработках по диагностике клеток крови в АСМ.
3. Проявление действия веществ-ингибиторов цитоскелета в виде снижения эффективного модуля Юнга тонких областей микрососудистого эндотелия мышинных легких необходимо принимать во внимание при исследовании методом АСМ роли различных белков в регуляции механических свойств эндотелиальных клеток.
4. При измерении в квазистатическом режиме АСМ эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов куриных эмбрионов стандартными острыми зондами с различными характеристиками, обнаружено существенное расхождение средних значений данного параметра. Это проявляет важность сохранения неизменной геометрии зондового датчика при накоплении статистических данных измерений эффективного модуля Юнга клеток выбранного типа. Предпочтение следует отдать кантилеверам с длинным острием и умеренно острым кончиком, с радиусом кривизны несколько десятков нанометров.
5. Результаты работы получены и апробированы на микроскопе с режимом PeakForce QNM компании Bruker, однако, их можно использовать и на приборах с аналогичными режимами

других производителей (HybriD mode, НТ-МДТ СИ; Quantitative Imaging (QI), JPK Instruments; Digital Pulsed Force Mode, WITec).

Положения, выносимые на защиту:

1. Жесткость биомеханической системы: «зонд атомно-силового микроскопа – нативный объект (фибробласт куриного эмбриона в жидкой питательной среде) – коллагеновая подложка» не зависит от размеров вершины зонда, если радиус ее кривизны порядка или менее 100 нм, а время индентирования составляет $\sim 10^{-3}$ с.
2. В измерениях с помощью атомно-силового микроскопа эффективного модуля Юнга нативных клеток необходимо учитывать дополнительное натяжение плазматической мембраны, вызванное контактом с подложкой. У нативных крысиных эритроцитов на полилизиновой подложке эффект приводит, как минимум, к 3-х кратному увеличению их эффективного модуля Юнга.
3. При детектировании методом АСМ эффективного модуля Юнга цитоскелета близость твердой подложки не меняет знак изменений параметра, вызванных специфическими ингибиторами. Индентирование дистальных областей эндотелиальных клеток (из мышечных легких) толщиной ~ 100 нм показывает, что селективное разрушение цитоскелетных структур приводит к уменьшению измеренного эффективного модуля Юнга даже при величине деформации, близкой к толщине образца.
4. Метод АСМ позволяет при миллисекундных временах индентирования отслеживать вариации эффективного модуля Юнга клеток, контактирующих как с полилизин, так и с фибронектином, вызванные фармакологическим веществом. Действие убаина приводит к 1,5-кратному упрочнению сомы нативных сенсорных нейронов куриных эмбрионов.

Достоверность и надежность результатов.

Достоверность результатов обусловлена достаточным объемом выборок при сравнительном анализе групп нативных клеток по геометрическим и механическим характеристикам, измеренным посредством атомно-силового микроскопа; согласием полученных экспериментальных результатов с современными знаниями об устройстве нативных эукариотических клеток и теоретическими представлениями о взаимодействии зонда сканирующего зондового микроскопа с помещенными в жидкую среду мягкими и вязкими объектами; совместным использованием взаимодополняющих методов сканирующей зондовой и оптической микроскопии.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

В соответствии с клеточной теорией клетка – это элементарная единица живого [1]. Любой процесс в живом организме, по сути, определяется процессами, происходящими в отдельных клетках. Наиболее высокоразвитыми и структурно сложными системами являются эукариотические (их ядро окружено собственной мембраной) клетки, из которых состоят все самые совершенные многоклеточные организмы – растения, животные, человек. Особый интерес представляют животные эукариотические клетки. Изучение физиологии и патологий животных клеток позволяет решать проблемы современной медицины: выявлять на клеточном уровне механизмы зарождения и течения болезней, находить новые способы лечения патологических состояний, синтезировать новые лекарственные вещества. В связи с этим, различные виды эукариотических животных клеток являются наиважнейшими объектами биомедицинских исследований. В последнее время достигнуты значительные успехи в изучении клеток, однако нерешенных вопросов и актуальных задач все еще остается с избытком. В рамках данной работы не рассматриваются прокариотические (без ядерной мембраны) или растительные эукариотические клетки, поэтому далее в тексте под термином клетка будут подразумеваться только эукариотические животные клетки.

Клетки организма постоянно испытывают внешние нагрузки, взаимодействуют между собой и другими окружающими объектами, могут перемещаться в пространстве, менять свои размеры и форму. Клетки крови вынуждены претерпевать сильные деформации, проходя через микроразмерные капилляры; клетки легких растягиваются при вдохе; миофибриллы сокращаются при напряжении поперечнополосатых мышц; эпителий деформируется при надавливании на кожу; сосудистый эндотелий сокращается или релаксирует в ответ на изменение кровяного давления; фибробласты перемещаются в места повреждения для заживления ран. Механические свойства разнотипных клеток существенно различаются и определяются специализацией и функциями клетки, обусловленными экспрессией генов, кодирующих характерный для данного клеточного типа набор белков. Клетки находятся в разных условиях и вынуждены приспосабливаться к ним, чтобы эффективно выполнять свои функции. Изменение нормальных механических свойств клеток может привести к тяжелым негативным последствиям для всего организма, развитию патологий.

Результаты исследований механических свойств нативных эукариотических клеток могут помочь в понимании физиологических и патологических внутриклеточных молекулярных процессов, способствовать созданию и тестированию лекарственных препаратов, определять действенность применяемой терапии, пролить свет на влияние на клетки физических

воздействий и химических веществ, в том числе неблагоприятных факторов окружающей среды, токсинов. Среди методов изучения механических характеристик клеток [2] выделяется атомно-силовая микроскопия (АСМ) – она позволяет исследовать различные характеристики клетки с субмикронным разрешением в условиях, максимально приближенных к физиологическим.

1.2 МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК

Разработано большое количество методов оценки механических свойств клеток, активных и пассивных [3]. Первые подразумевают измерение отклика клетки на воздействие деформирующих внешних сил (АСМ, микропипеточная аспирация, техники оптического или магнитного пинцета, растягивающие устройства, вискозиметрия и др.). Пассивные методы позволяют измерять силы, генерируемые самой клеткой. Они, в основном, базируются на использовании специальных нетоксичных подложек (прозрачных или отражающих), способных изменять свои свойства (например, оптические) в области действия сил со стороны клетки.

Активные методы обычно дают информацию о жесткости клеток, их упругих или вязкоупругих (реологических) свойствах, в то время как пассивные методы позволяют измерять силы и соответствующие растягивающие напряжения, приводящие клетки в движение (cell traction forces, tensile stresses [3]).

Не претендуя на исчерпывающее описание всего многообразия методов изучения механических характеристик клеток, ниже мы рассмотрим подробнее наиболее важные, на наш взгляд.

Микропипеточная аспирация

Среди вариантов измерения механических характеристик индивидуальных клеток широкое распространение получил метод микропипеточной аспирации. Рабочим инструментом в микропипеточной аспирации является пипетка, представляющая собой стеклянный капилляр, внутренний диаметр которого меньше размера измеряемого объекта, т.е. клетки. Обычно диаметр внутреннего канала микропипетки не превышает 10 мкм [4].

Для измерения механических параметров клеток кончик пипетки с помощью микроманипулятора приводится в контакт с объектом исследования. В пипетке создается отрицательное давление, под действием которого часть клетки засасывается внутрь микроканала (рисунок 1.1). В результате клетка испытывает деформацию, изучая которую, можно провести оценку нескольких механических величин, характеризующих объект.

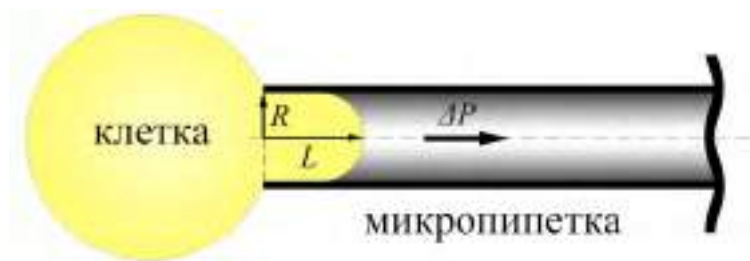


Рисунок 1.1 - Схематичное представление деформации клетки при микропипеточной аспирации.

Например, микропипеточная аспирация дает возможность определить модуль упругого сдвига клетки μ [5]. Для вычисления данного параметра можно воспользоваться следующим выражением [6]:

$$\Delta P = \frac{\mu}{R} \left[\left(\frac{2L}{R} - 1 \right) + \ln \frac{2L}{R} \right] \quad (1.1)$$

где ΔP – отрицательное (всасывающее) давление, L – длина втянутой в микропипетку части клетки, R – радиус канала микропипетки (рисунок 1.1). Приведенная формула применима при $L > R$. Кроме того, по длине втянутого в пипетку фрагмента клетки при известном давлении всасывания можно рассчитать такие механические параметры клетки, как натяжение мембраны, модуль Юнга, вязкость. Определение одних механических характеристик требует приложения известного давления и измерения втянутой в пипетку части клетки (после установления равновесия между давлением в пипетке и механическими нагрузками в клетке). Измерение других параметров требует отслеживания деформации во времени при постепенном увеличении силы всасывания. Микропипеточная аспирация позволяет воздействовать на клетку с силой, которая может варьироваться от 10 пН до 100 мкН [4].

Принципиальным параметром, проявляющим механические свойства объекта исследования, является длина деформированного в пипетке фрагмента клетки. Для ее измерений используют оптический микроскоп, который позволяет не только контролировать процесс подвода и приведения в контакт кончика пипетки с клеткой, но и с точностью порядка длины волны измерять деформацию образца, вызванную всасыванием в микроканал.

Метод микропипеточной аспирации применялся для изучения механических свойств таких клеток, как нейтрофилы [7], эритроциты [8], хондроциты [9], фибробласты [10], эндотелиальные [11], мезенхимные стволовые [12], раковые клетки [13], дизентерийные амебы [14].

Было обнаружено, что некоторые типы клеток ведут себя подобно капле жидкости, заключенной в оболочку, а другие – как упругое твердое тело [15]. Первые при достижении определенного критического значения давления в пипетке стремительно засасываются в нее

полностью, вторые же отвечают на рост всасывающего давления лишь большей деформацией. К первому типу клеток относятся клетки крови (эритроциты, нейтрофилы), а ко второму – хондроциты, эндотелиальные, раковые клетки [13].

В модели капли жидкости клетка рассматривается как однородная Ньютоновская вязкая жидкость, окруженная тонкой оболочкой, испытывающей постоянное натяжение, а в модели упругого твердого тела – как однородное твердое тело.

Хотя обе использующиеся модели неплохо описывают результаты экспериментов, в реальности клетки – это сложные системы, которые на самом деле гетерогенны. Поэтому разработка более точных механических моделей остается актуальной задачей, которую предстоит решить в будущем.

Оптический пинцет

Другой метод изучения механических свойств клеток – оптический (лазерный) пинцет – основан на эффекте светового давления. В результате отражения и частичного или полного поглощения света телом последнему передается также некоторый импульс, т.е. создается давление. Если рассматривать свет как поток фотонов, можно объяснить это следующим образом. Каждый фотон обладает энергией $h\nu$ и импульсом $p = h\nu/c$ (c – скорость света, h – постоянная Планка, ν – частота электромагнитной волны света). При, например, нормальном падении и 100% отражении от зеркальной поверхности тела, от отраженного фотона передается удвоенный импульс $2p$. За время Δt от тела отражается n фотонов с суммарной энергией $\Delta E = n \cdot h\nu$, и ему передается суммарный импульс $\Delta p = 2n \cdot p = 2n \cdot h\nu/c = 2\Delta E/c$. В результате, на тело действует сила $F = \Delta p/\Delta t = 2\Delta E/(\Delta t \cdot c) = 2P/c$, где $P = \Delta E/\Delta t$ – это энергия, принесенная за единицу времени, т.е. мощность падающего света. Свет от лазерной указки мощностью полтора милливатта будет давить на зеркало с силой 10^{-11} Н. Поскольку давление представляет собой силу, приходящуюся на площадь поверхности, отсюда и возникает такое понятие как давление света. В области зайчика от полуторамилливаттной лазерной указки – пятна диаметром, например, около миллиметра световое давление – около 10^{-5} Па. В оптическом пинцете этот свет фокусируется в пятно диаметром ~ 1 мкм и давление возрастет до 10 Па.

Как видно из приведенного примера, силы и давления, порождаемые светом, ничтожно малы, иначе живые существа бы их чувствовали. Однако при определенных условиях эти силы можно использовать для прецизионного манипулирования небольшими объектами. С помощью оптического пинцета можно перемещать частицы диаметром от ~ 10 нм до ~ 10 мкм [16], используя для этого источник, способный породить мощное электромагнитное излучение, каковым является лазер. При этом силы, генерируемые лазерным излучением, лежат в диапазоне 1–200 пН [4].

Сила давления света в оптическом пинцете называется силой рассеяния (scattering force). Если она будет достаточно велика, то сможет заставить двигаться микроразмерные частицы вдоль направления распространения световой волны. Компенсация силы рассеяния от одного лазера аналогичной силой от другого лазера, направленного противоположно первому, позволяет добиться неподвижности частиц и большей свободы манипулирования ими.

Другим вариантом компенсации силы рассеяния является использование одного сильно сфокусированного лазерного пучка, интенсивность которого подчиняется распределению Гаусса. В таком случае частица, освещенная лазером, будет притягиваться к оси пучка, где интенсивность света больше, чем на периферии. Благодаря этому частица окажется в точке с наибольшей интенсивностью излучения, т.е. в фокусе, где образуется минимум в потенциальной энергии. Оказавшись в фокусе, объект будет ограничен в своих движениях по трем направлениям. Перемещая фокус, можно управлять положением частиц. Двигаться по направлению роста интенсивности света частицу заставляет, так называемая, градиентная сила (gradient force). На рисунке 1.2 приведены примеры экспериментов по использованию лазерного пинцета для деформации клеток.

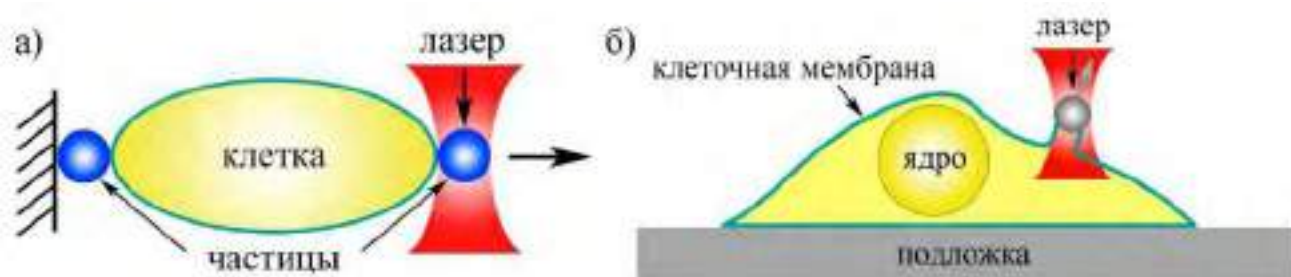


Рисунок 1.2 - Схемы экспериментов по исследованию клеток с помощью оптического пинцета а) перемещение захваченной в фокус лазера частицы вправо вызывает растяжение клетки б) движение прикрепленной к клетке частицы вдоль серой стрелки приводит к образованию мембранной тубулярной структуры (tether) [17].

На практике для измерения механических характеристик биологических объектов с помощью оптического пинцета используют диэлектрические сферические частицы диаметром ~ 1 мкм. Их прикрепляют к изучаемому объекту, а затем перемещают посредством лазерного пучка, заставляя образец деформироваться. По отклику объекта исследования на деформацию определяют его механические параметры.

С помощью лазерного пинцета исследовались эритроциты [17–20], наружные волосковые клетки внутреннего уха [21], эмбриональные стволовые клетки, кардиомиоциты [22], остеобласты и хондроциты [23], дрожжевые клетки [24].

Следует отметить, что оптический пинцет продолжает бурно развиваться. За последние годы появилось множество модификаций этого метода [25–28], которые расширяют возможности оптического пинцета и позволяют находить для него новые применения.

Для реализации экспериментов на рисунке 1.2 необходимо, чтобы сферические частицы были прочно связаны с клеткой. Чтобы добиться надежного прикрепления частиц к нативному объекту их покрывают различными веществами, способствующими усилению адгезии между шариком и клеткой (антителами, лектинами, компонентами внеклеточного матрикса) [29].

Проведение количественных измерений механических характеристик клеток становится возможным после калибровки силы захвата микрочастицы. Для определения силы захвата применяют разные методы [30]. Один из методов основан на использовании явления вязкого сопротивления движению захваченной частицы в жидкости. Сила вязкого трения сферической частицы F определяется по формуле Стокса:

$$F = 6\pi\eta RV \quad (1.2)$$

где η – динамическая вязкость жидкости, R – радиус частицы, V – ее скорость [31].

Перемещения захваченной частицы в оптическом пинцете могут отслеживаться с точностью в несколько нанометров, детектирование положения удерживаемого объекта осуществляется различными способами, например, с помощью видеокамеры или квадрантного фотодиода [32].

Методы деформируемых подложек

Использование специальных подложек позволяет оценивать силы, которые клетки оказывают на окружающие объекты.

Работа [33] посвящена описанию метода регистрации сил, которые заставляют клетку перемещаться. Были предложены специальные эластомерные подложки – тонкие листы силиконового каучука. Клетки на таком прозрачном нетоксичном материале при движении искажают поверхность подложки; в местах контакта слоя эластомера с нативным объектом образуются складки (рисунок 1.3).



Рисунок 1.3 - Деформирование гибкой подложки за счет движения клетки [33].

Эффективность подложки была испытана различными типами клеток, такими как фибробласты, печеночные макрофаги, клетки сетчатки глаза, сенсорные и симпатические нейроны, глиальные клетки. В результате почти все клетки вызвали деформацию подложки при движении.

В [34] изучалась миграция фибробластов куриных эмбрионов по подложке, состоящей из массива датчиков. Каждый датчик представлял собой кантилевер с контактной площадкой на свободном конце (рисунок 1.4). Датчики реагировали на силы, которые фибробласты сообщали подложке для изменения своего положения.



Рисунок 1.4 - Схема устройства датчика силы [34].

Касание клетки контактной площадки приводило к изгибу кантилевера. По величине отклонения последнего определялись силы, которые прикладывала клетка для своего перемещения. Получение количественной информации обеспечивалось благодаря предварительной калибровке кантилеверов [34].

Подход, похожий на предыдущий, был предложен в [35], однако в этой работе вместо кантилеверов, способных изгибаться лишь в одном направлении, использовался массив вертикальных столбиков из эластомерного материала, которые позволяли отслеживать силы, действующие на подложку со стороны клетки уже в двух направлениях (рисунок 1.5).

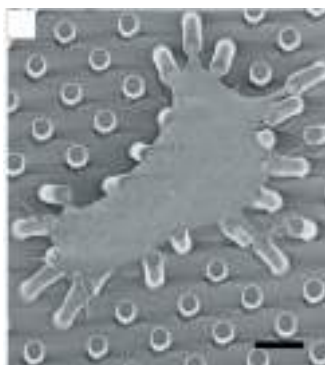


Рисунок 1.5 - Изображение гладкомышечной клетки на подложке с вертикальными столбиками, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) [35].

Описанная концепция позволила определить не только амплитуду силы адгезии клетки с подложкой, но и ее направление в различных местах сцепления клетки и подложки. Для усиления адгезии клеток верхние части столбиков покрывались фибронектином. Описанным способом исследовались коровьи гладкомышечные клетки, а также мышинные фибробласты.

Многообразие перечисленных методов деформируемых подложек не ограничивается приведенными примерами. Однако суть таких методов сходна, а отличаются лишь способы ее реализации.

1.3 АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ И МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК

1.3.1 АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ – ВИД СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В отличие от своих исторических предшественников – оптической и электронной микроскопий, работа которых основана на взаимодействии образца со светом и пучком заряженных частиц – электронов соответственно, сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) для получения информации об объекте исследования использует острую иголку – зонд. Работу СЗМ можно сравнить с таким человеческим чувством как осязание, в котором представление о свойствах объекта получается путем его ощупывания (рисунок 1.6). Только в СЗМ в качестве датчика используются не тактильные рецепторы, а нанометрово острый зонд. В результате, исследовать объекты можно более детально, т.е. с большим пространственным разрешением.



Рисунок 1.6 - Отслеживание рельефа поверхности образца в СЗМ подобно ощупыванию (слева), но в качестве датчика используются не тактильные рецепторы, а нанометрово острый зонд (справа), благодаря чему исследовать объекты можно более детально, т.е. с большим пространственным разрешением.

Вообще СЗМ – это большая группа методов исследования поверхности, действующих на различных физических принципах. Сейчас СЗМ насчитывает несколько десятков разновидностей, среди которых атомно-силовая микроскопия, сканирующая туннельная микроскопия, ближнепольная оптическая микроскопия, электросиловая микроскопия, магнитно-силовая микроскопия, сканирующая тепловая микроскопия, сканирующая емкостная микроскопия и др. [36, 37].

Родоначальником большого семейства методов СЗМ является сканирующая туннельная микроскопия (СТМ). Первый сканирующий туннельный микроскоп был построен в 1981 году Г. Биннигом и Г. Рорером [38]. Принцип работы СТМ основывается на квантовом эффекте туннелирования электронов через потенциальный барьер. В СТМ этот эффект выражается в возникновении туннельного тока в субнанометровом зазоре между зондом и образцом при наличии разности потенциалов между ними. Величина туннельного тока экспоненциально зависит от величины зазора. Поддерживая туннельный ток на постоянном уровне при перемещении зонда над образцом, можно получить карту распределения высот, т.е. топографию поверхности образца. Метод СТМ сразу же привлек к себе внимание научного сообщества, т.к. позволял исследовать поверхности твердых тел с разрешением вплоть до атомарного. Ценность СТМ подчеркивается тем, что в 1986 году его создатели были удостоены Нобелевской премии по физике.

Важным ограничением СТМ является то, что метод подходит лишь для исследования проводящих материалов. Существенно расширить область применения зондовой микроскопии позволило появление в 1986 году атомно-силового микроскопа [39] – инструмента, который сохранял основные достоинства своего прародителя – СТМ, однако, давал возможность исследовать и проводники, и полупроводники, и диэлектрики.

Работа атомно-силового микроскопа основана на силовом взаимодействии зонда (кантилевера) с исследуемой поверхностью. Зондовый датчик для АСМ представляет собой упругую консоль, один конец которой жестко закреплен, а на втором конце находится игла, с помощью которой происходит зондирование поверхности образца (рисунок 1.7). Большинство стандартных коммерчески доступных АСМ зондов производятся из кремния (Si) или нитрида кремния (Si_3N_4). Форма консоли может быть разной. Наиболее распространены прямоугольные и треугольные (или V-образные) АСМ зонды. Типичный кантилевер имеет длину 100–200 мкм, ширину 20–40 мкм и толщину 0,5–1 мкм [40]. Длина иглы стандартного зонда составляет несколько микрон, а радиус острия – единицы-десятки нанометров.

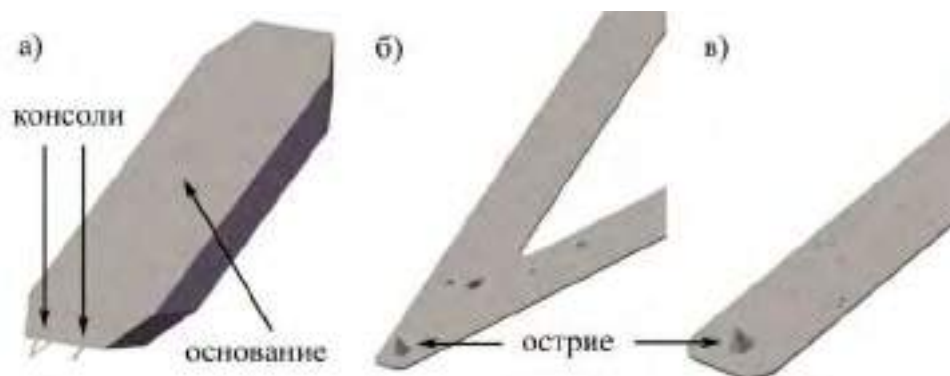


Рисунок 1.7 - а) схема АСМ зондового датчика; б) треугольный кантилевер; в) прямоугольный кантилевер.

На практике между зондовым датчиком и образцом действуют силы различной физической природы: Ван-дер-Ваальсовы, электростатические, капиллярные, магнитные и т.д. Благодаря этому, АСМ дает возможность помимо исследования рельефа поверхности, изучать дополнительные характеристики: механические, электрические, магнитные свойства материалов. Кроме того, АСМ активно используется не только для изучения, но и для модификации поверхности материалов с нанометровым разрешением с помощью методов силовой литографии [41].

Универсальность, большое разнообразие измеряемых параметров наряду с высоким разрешением способствовали популяризации метода АСМ. Сейчас АСМ – наиболее используемая разновидность СЗМ. Метод с успехом применяется в таких областях как материаловедение, физика, биология, нанотехнологии и т.д. Являясь относительно молодым методом, АСМ продолжает стремительно развиваться как в теоретическом, так и в техническом отношении, благодаря чему находит новые применения в различных научных областях.

1.3.2 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Интерпретация характера силового взаимодействия между зондом и образцом может предоставить информацию о механических характеристиках последнего. Особенно ценным является то, что благодаря размерам АСМ зонда, механические свойства образца могут изучаться на нанометровом уровне.

Тэппинг режим АСМ позволяет получать карты распределения механических характеристик поверхности объекта исследования за счет регистрации изменения фазы колебаний кантилевера. Такой подход позволяет эффективно дифференцировать разнородные материалы с отличающимися механическими свойствами, однако, носит лишь качественный характер, т.к. изменение фазы определяется суперпозицией факторов и может зависеть от сил адгезии, упругости и вязкости исследуемого материала, площади контакта зонда с поверхностью образца.

Основным способом изучения механических свойств в АСМ служит техника (нано)индентирования, т.е. деформации образца под нагрузкой со стороны зонда. А главным источником количественной информации о механических характеристиках образца в АСМ являются зависимости силы взаимодействия между зондом и образцом от расстояния между ними – так называемые, силовые кривые. Анализ силовых кривых позволяет проводить количественное определение таких механических параметров как деформация, жесткость, модуль Юнга. Кроме того, по кривым можно измерять адгезию между зондом и образцом и

диссипацию энергии во время индентирования. На практике существует несколько методов АСМ, основанных на измерении и интерпретации силовых кривых. В [42] такие режимы работы собирательно обозначаются как АСМ на основе кривых сила-расстояние (force-distance curve-based AFM).

Одним из таких режимов работы АСМ является силовая спектроскопия [43]. Измерения в ней точечные (каждая точка задается оператором), а данные регистрируются в «сыром» виде – затем их необходимо обрабатывать для вычисления нужных параметров. Силовая спектроскопия полезна, когда нет необходимости получения объемной выборки значений измеряемых величин, однако, она неудобна при анализе больших массивов данных из-за времязатратности и низкой степени автоматизации.

В режиме Force Volume [44] регистрация механических характеристик производится по координатной сетке, матрице точек, наложенной на участок исследуемой поверхности. На выходе получается массив данных в виде карты, которая может характеризовать поверхность образца теми же механическими параметрами, что и силовая спектроскопия – деформацией, модулем Юнга, силой адгезии и диссипацией. По причине того, что измерения проводятся в каждой точке с частотой обычно в диапазоне 0,1–10 Гц [45], выбор количества точек измерения, т.е. разрешение карты, в режиме Force Volume ограничивается временем, затрачиваемым на проведение эксперимента. Если требуется большая статистика, измерение может занять продолжительное время. Так, при частоте 1 Гц и разрешении 128×128 точек эксперимент в Force Volume будет продолжаться более четырех часов.

Основанный на тэппинг режиме АСМ, HarmoniX значительно повысил производительность измерений механических характеристик. Специальный T-образный зондовый датчик в этом режиме регистрирует торсионную деформацию кантилевера, что дает возможность определять механические свойства образца с тем же разрешением, что и изображение топографии поверхности. Несмотря на очевидные достоинства, HarmoniX обладает также и рядом существенных недостатков: большой амплитудой пиковой силы (в жидкости нет выигрыша от добротности, она ~ 1 , поэтому сила примерно равна произведению жесткости кантилевера на амплитуду тэппинга); необходимостью использования специализированных зондов; сложностью проведения измерений и интерпретации данных [46].

1.3.3 КВАЗИСТАТИЧЕСКИЕ РЕЖИМЫ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Развитие технических возможностей позволило реализовать на практике идею конца 1980–90-х годов [47] и создать новый квазистатический режим работы АСМ, объединяющий преимущества статического (контактного) и динамического (тэппинг) режимов – работу при

постоянной нагрузке и минимизацию латеральных сил. Т.к. концепция данного режима подразумевает операции с большими массивами данных, его реализация стала возможной благодаря разработке быстродействующих систем сбора данных и обработки сигналов в режиме реального времени [48]. Как и в силовой спектроскопии, и Force Volume, в квазистатическом режиме анализируются силовые кривые, однако, вследствие особого алгоритма работы атомно-силового микроскопа их регистрация производится гораздо быстрее, что позволяет получать подробные АСМ карты различных свойств поверхности образца с высоким пространственным разрешением.

По характеру движения зонда квазистатический режим отчасти напоминает тэппинг, но колебания кантилевера производятся на частоте, гораздо ниже собственной резонансной частоты зонда. Параметром обратной связи в квазистатическом режиме является сила (отклонение кантилевера), что роднит его с контактным режимом АСМ. Тем не менее, квазистатический режим позволяет получить гораздо больше информации об изучаемом образце. Благодаря тому, что в каждой точке измерения производится запись силовой кривой, параллельно с топографией можно оценивать механические, элетро- и магнитостатические, адгезионные силы. Силовая кривая АСМ несет в себе информацию об упругих, вязкоупругих или пластических характеристиках материала [48]. Анализируя кривую, можно осуществлять количественное определение величины деформации, жесткости, модуля Юнга, адгезии образца, диссипации энергии во время индентирования.

Концепция квазистатического режима АСМ была реализована в режиме импульсной силы (Pulsed-force mode) [49]. В Pulsed-force mode кантилевер непрерывно совершает синусоидальные колебания с частотой, ниже резонансной, зондируя образец в каждой точке измерения и отводясь затем на безопасное расстояние для перехода к следующей точке измерения. Такой подход при сравнительной простоте использования дает возможность, применяя стандартные зондовые датчики АСМ, существенно увеличить скорость измерения механических характеристик.

Следует отметить, что в настоящее время квазистатический режим активно внедряется производителями зондовых микроскопов. В приборах фирмы Bruker (США) данный режим называется PeakForce QNM (Quantitative Nanomechanical property Mapping), у компании НТ-МДТ СИ (Россия) – HD (HybriD mode), в компании JPK Instruments (Германия) режим реализован под названием QI (Quantitative Imaging), WITec (Германия) дала ему наименование DPFM (Digital Pulsed Force Mode).

Конечно, между перечисленными АСМ режимами существуют некоторые различия, в частности, в реализации алгоритмов работы АСМ и обработки полученных данных. Однако, по

сути, режимы очень похожи, и различаются лишь в деталях. В PeakForce QNM, Hybrid mode и QI наблюдаются следующие сходные черты:

1) в каждой точке измерения зонд подводится к поверхности образца, индентирует ее, а затем отводится на безопасное расстояние;

2) частота колебаний кантилевера, как правило, лежит в диапазоне от нескольких десятых долей до десяти килогерц;

3) во время каждого цикла вертикального перемещения зонда относительно образца происходит регистрация силовых кривых;

4) одновременное получение топографии поверхности и карт распределения механических характеристик с высоким пространственным разрешением за относительно непродолжительное время;

5) за счет быстрой математической обработки силовых кривых АСМ картирование механических характеристик образца осуществляется прямо во время АСМ сканирования.

Режим PeakForce QNM, оптимизированный для измерения наномеханических свойств материалов, появился на основе разработанного ранее режима фирмы Bruker PeakForce Tapping [50]. Диапазон частот измерения 0,25–2 кГц, доступный в PeakForce QNM, дает возможность получать карты распределения деформации, модуля Юнга, сил адгезии, диссипации энергии в каждом цикле зондирования образца с высоким разрешением за минуты, а не часы. Параметром обратной связи в этом режиме служит пиковая сила – максимальная номинальная сила, действующая по нормали к поверхности образца. Модуляция силы в PeakForce QNM осуществляется синусоидально. В результате зонд замедляется, приближаясь к точке максимальной силы, благодаря чему ошибка сигнала обратной связи в каждой точке измерения остается небольшой. Поэтому в данном режиме АСМ осуществляется высокоточный контроль сил и удается минимизировать воздействие зонда на образец, что благотворно влияет на сохранность обоих. Утверждается, что PeakForce QNM позволяет устанавливать силу взаимодействия зонда с поверхностью образца на уровне менее 100 пкН [45, 46]. Также отмечается широкий диапазон сил взаимодействия зонд-образец от пиконьютонов до микроньютонов, что определяется широким ассортиментом доступных зондовых датчиков с различной жесткостью [46].

Режим Hybrid (HD) также как и PeakForce QNM обеспечивает синусоидальное управление колебательным движением АСМ зонда. Существует возможность регистрировать отклонения кантилевера при частоте в диапазоне 0,5–10 кГц в ходе цикла измерений [48].

Режим QI и его расширенная версия QI-Advanced позволяют устанавливать силу взаимодействия зонда с образцом (действующую по нормали к поверхности образца) на уровне < 50 пН [51]. Подаваемое на Z-пьезосканер напряжение отличается по своей форме от

синусоидального, характерного для режимов PeakForce QNM и HybriD mode. QI-Advanced позволяет в режиме реального времени проводить количественную оценку и картировать такие наноразмерные свойства исследуемого материала как жесткость, адгезия и диссипация. Кроме того, благодаря тому, что в конечном АСМ файле сохраняются все полученные при сканировании силовые кривые, можно в процессе постобработки вычислить и построить карты распределения таких параметров образца, как деформация и модуль Юнга. Также в QI возможны гибкие настройки параметров индентирования поверхности образца в каждой точке измерения, что может быть особенно полезно, например, в случае изучения адгезии между функционализированным АСМ зондом и поверхностью образца, способной специфически связываться с «пришитыми» к зонду молекулами [42].

Режим DPFM осуществляет синусоидальную модуляцию колебаний зонда с амплитудой в диапазоне 10–500 нм и частотой 0,1–2 кГц. Интересно, что помимо стандартного набора измеряемых величин в PDFM также имеется возможность определять вязкость и время индентирования [52].

Точный контроль нагрузки, сниженные латеральные силы, возможность работы в жидкости, высокое пространственное разрешение карт распределения механических характеристик и высокая скорость сканирования, сравнимая с обычным тэппинг режимом, – все эти качества благоприятствуют применению квазистатического режима АСМ для изучения морфологии и механических свойств деликатных биологических объектов, включая клетки в нативном состоянии. Действительно, например, квазистатический режим PeakForce QNM с успехом применяется для исследования различных биологических объектов: биополимеров [53, 54], бактерий [45, 55], клеточных стенок эукариот [56, 57], животных [45, 55, 58] и раковых клеток [59, 60].

1.3.4 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

Хотя АСМ изначально рассматривался как метод исследования поверхности твердых тел, сейчас он нашел широкое применение и в биологии для изучения сравнительно мягких и деликатных биологических образцов.

Первая работа по АСМ исследованию биообъектов появилась всего спустя два года после разработки метода – в 1988 году. В ней объектом изучения стала пурпурная мембрана галобактерии [61]. Начиная с 1990-х, использование АСМ в биологии начало принимать систематический характер [62–64]. В настоящее время каждый год выходит множество публикаций, посвященных АСМ изучению биообъектов. АСМ измерения различных

биологических образцов рассмотрены в обзорных статьях [65, 66]. С помощью АСМ исследовались ткани [67], животные клетки [68, 69], бактерии [70–72], вирусы [73], белки [74], ДНК [75, 76].

Одним из самых интересных биологических объектов является клетка. АСМ предоставляет широкие возможности по изучению таких объектов как в фиксированном (специальным образом обработанном), так и в нативном состояниях. АСМ исследование клеток не требует сложной пробоподготовки, при этом дает возможность изучать морфологию и механические характеристики этих объектов с высоким пространственным разрешением.

В АСМ геометрические (форма, размеры клеток и их отдельных частей, тонкая структура плазматической мембраны) и механические свойства (величина деформации под действием АСМ зонда, жесткость, (эффективный) модуль Юнга, сила адгезии между зондом и образцом) клеток используются в качестве индикаторов, отражающих состояние этих объектов. Отклонение параметров клеток от нормальных значений может свидетельствовать о протекании внутри патологических процессов. Последнее имеет значительную ценность для медицины с точки зрения использования АСМ в диагностике заболеваний и при поиске путей лечения различных патологий на клеточном уровне.

Число работ по исследованию клеток методом АСМ за последние два десятилетия существенно выросло, и сейчас изучение клеток занимает значительную долю от всех публикаций по теме АСМ (рисунок 1.8). В силу относительной сложности исследования клеток в нативном состоянии, часть работ, посвященная таким объектам, не очень велика, тем не менее, количество публикаций год от года растет.

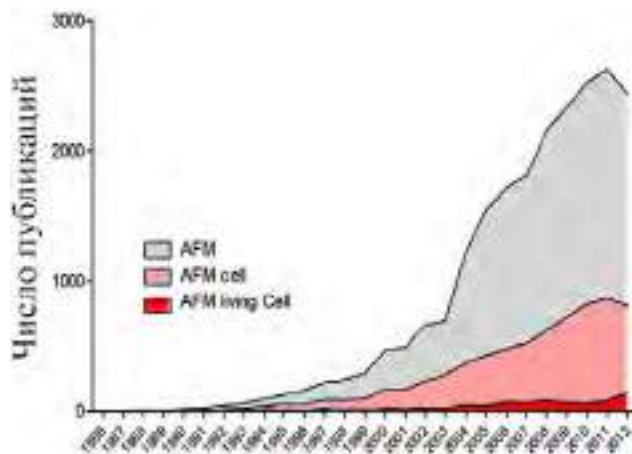


Рисунок 1.8 - Количество публикаций работ по АСМ за различные годы [77].

Для описания реакции клеток на нагрузку со стороны АСМ зонда чаще всего используют модуль Юнга (упругости). В англоязычной литературе данный параметр иногда называют *elasticity* или *elastic modulus* [68, 78]. Принимая во внимание, что модуль Юнга – параметр материала, характеризующий его сопротивляемость упругой деформации, а клетка –

структурно неоднородный объект, деформация которого может быть неупругой, такой выбор термина, по форме, нельзя считать удачным. Более уместным названием извлекаемого в результате обработки АСМ данных параметра представляется кажущийся или эффективный модуль Юнга (упругости). Последнее название мы и будем использовать далее или подразумевать его смысл, в тех случаях, когда слово эффективный опущено.

В таблице 1 приведены значения модуля Юнга для различных типов нативных клеток, измеренные методом АСМ. Разброс величин параметра составляет четыре порядка ($\sim 0,1$ – 100 кПа). Следует отметить, что даже у однотипных клеток значения модуля Юнга сильно расходятся. Наиболее типичные значения модуля Юнга для клеток, согласно данным таблицы 1, составляют ~ 1 кПа.

Таблица 1 - Значения модуля Юнга для различных типов клеток в нативном состоянии

Тип клетки	Значение модуля Юнга	Ссылка
эритроциты	$16,05 \pm 2,3$ кПа	[79]
	$4,9 \pm 0,5$ кПа	[85]
	$1,10 \pm 0,40$ кПа	[80]
	$0,15$ кПа	[81]
тромбоциты	1 – 50 кПа	[82]
фибробласты	$1,6 \pm 0,2$ кПа, $0,6 \pm 0,1$ кПа	[83]
	$17,77 \pm 1,39$ кПа	[84]
	$2,55 \pm 0,99$ кПа	[85]
	$1134,2 \pm 189,1$ Па	[86]
кардиоциты	5 – 200 кПа	[63]
эпителий	$1,59 \pm 0,33$ кПа, $1,55 \pm 0,41$ кПа	[87]
эндотелий	$1,4 \pm 0,1$ кПа, $6,8 \pm 0,4$ кПа	[88]
	$5,4$ – $13,2$ кПа, $1,3$ – $11,2$ кПа	[89]
	$0,71 \pm 0,16$ кПа, $0,94 \pm 0,06$ кПа	[90]
	$3,23 \pm 0,54$ кПа, $6,67 \pm 1,07$ кПа	
остеобласты	$2,1$ – $8,8$ кПа	[91]
	<30 кПа	[92]
	$3,5 \pm 0,3$ кПа, $5,9 \pm 0,5$ кПа	[93]
	$0,578 \pm 0,093$ кПа	[94]
хондроциты	$0,55 \pm 0,23$ кПа	[95]
нейроны	60 кПа	[96]
	$0,1$ – 2 кПа, $0,1$ – 8 кПа	[81]
	11 кПа	[97]

Проблема большого разброса определенных с помощью АСМ значений модуля Юнга клеток может быть вызвана разнообразными причинами: различиями в способе подготовки образцов, характеристиками зонда, скоростью индентирования, используемой моделью для расчета параметра, условиями проведения экспериментов, особенностями однотипных клеток, влиянием твердой подложки, выбором точки контакта на силовой кривой.

Интересно, что имеющиеся в литературе данные о влиянии некоторых факторов на измеренный модуль Юнга весьма противоречивы. Например, в [98] для двух линий эпителиальных клеток (MCF-10A и MCF-7) сообщается о возрастании модуля упругости с увеличением скорости индентирования. В другой работе утверждается, что при изучении ламеллоподий раковых клеток (линии В16) модуль Юнга практически не изменяется на разных частотах индентирования (1 Гц, 5 Гц, 250 Гц) [58].

Также расходятся результаты о зависимости измеренного модуля Юнга клеток от типа подложки. В [99] приводятся данные, согласно которым остеобласты на разных типах подложки проявляют разный модуль упругости. Клетки на подложках из белков внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген и др.) демонстрировали больший модуль Юнга, чем остеобласты, прикрепленные к стеклу или полилизину. Культивирование нейронов на полилизине, ламинине и фибронектине не привело к заметным изменениям в модуле Юнга клеток [100].

АСМ активно и успешно используется для изучения морфологии и механических характеристик нативных клеток. Из-за чрезвычайной сложности объекта исследования, его изменчивости и чувствительности к внешним условиям остается немало влияющих на АСМ измерения факторов, которые требуют тщательного анализа. В частности, актуальной является проблема сильного разброса литературных АСМ данных по модулю Юнга нативных клеток. Возможное решение данной проблемы в виде применения в АСМ исследованиях стандартизированной процедуры определения нужного параметра предложено в [101].

1.3.5 ДОСТОИНСТВА И НЕДОСТАТКИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ НАТИВНЫХ КЛЕТОК

Среди методов, позволяющих изучать морфологию и механические параметры клеток, существует ряд характеристик, которые выгодно отличают АСМ от альтернативных методов исследования. Выделим основные преимущества АСМ:

1) универсальность (можно определять различные геометрические и механические характеристики клеток);

2) субмикронное пространственное разрешение (по своему разрешению АСМ сравним с электронной и значительно превосходит оптическую микроскопию);

3) вариативность условий эксперимента (АСМ исследования могут проводиться на воздухе или в жидкости, при разной температуре; т.е. нативные клетки можно изучать в физиологически адекватных условиях);

4) отсутствие необходимости в сложной специальной и модифицирующей подготовке образцов для исследования;

5) щадящая, прецизионно контролируемая сила воздействия (способствует сохранению интактного состояния клеток);

Помимо достоинств стоит также перечислить и наиболее явные недостатки АСМ при изучении клеток:

1) непредсказуемость реакции образца (нативная клетка – изменчивый и чувствительный объект, который реагирует на внешние воздействия; сила со стороны зонда может вызвать изменение свойств клетки);

2) недостаточно высокое временное разрешение (получение АСМ изображения может занимать от нескольких минут до нескольких часов, что много для изменяемой живой системы; проблему чрезмерной длительности сканирования в настоящее время отчасти удается преодолеть благодаря развитию высокоскоростной АСМ [102]).

3) риск разрушения образца (нельзя полностью исключить вероятность механического повреждения клетки АСМ зондом);

4) примитивность моделей контактной механики, используемых для вычисления модуля Юнга, которые не учитывают специфику объекта исследования.

АСМ – это универсальный метод, который позволяет изучать морфологические и механические свойства клеток. Несмотря на ряд недостатков, он предоставляет уникальные возможности, которые недоступны другим методам. При условии преодоления существующих ограничений АСМ имеет перспективу дальнейшего распространения в исследованиях клеток и других биологических объектов.

1.3.6 МЕХАНИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ РАСЧЕТА МОДУЛЯ ЮНГА В АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Установлено, что аномальные механические свойства индивидуальных клеток могут свидетельствовать о течении патологических процессов в организме. Модуль Юнга клеток способен служить индикатором при диагностике заболеваний [103–107], поэтому измерение модуля упругости клетки может носить важное прикладное значение. В настоящее время

определение модуля Юнга нативных клеток с помощью АСМ остается нетривиальной задачей и не достигло стадии рутинных измерений.

Одной из основных проблем, мешающих точному определению модуля Юнга клеток с помощью АСМ, является выбор теоретической модели расчета модуля упругости, описывающей контакт мягкой нативной клетки с твердым АСМ зондом. В настоящее время самыми распространенными моделями, используемыми для определения модуля Юнга в АСМ, являются модели Герца [40, 108, 109], Снеддона [110], ДМТ (Дерягина-Мюллера-Топорова) [111] и JKR (Johnson-Kendall-Roberts) [112, 113].

Разработанная еще в XIX веке, теория Герца описывает силовое контактное взаимодействие двух однородных упругих гладких тел. Помимо требований к упругости и однородности материалов теория Герца предлагает следующие допущения: силы трения, как и адгезия между телами, отсутствуют, глубина индентации мала по сравнению с толщиной образца.

Модели расчета модуля упругости Снеддона, ДМТ и JKR основаны на модели Герца и нацелены на ее расширение и уточнение. Так, Снеддоном были выведены выражения для расчета модуля Юнга при аппроксимации АСМ зонда такими осесимметричными формами как цилиндр, конус, параболоид вращения и т.д. [114]. В [115] рассмотрен вариант индентора пирамидальной формы. Выбор формы индентора влияет на площадь контакта АСМ зонда с образцом и, соответственно, на давление, которое испытывает последний. Модели ДМТ и JKR позволили учесть существование сил адгезии между зондом и образцом. Важным различием данных моделей является то, что в первой считается, что силы адгезии действуют только за пределами области контакта, а во второй, наоборот – лишь внутри нее [116, 117]. ДМТ лучше подходит для описания контакта твердых материалов со слабой адгезией, а модель JKR дает более точные результаты, когда контактируют липкие податливые материалы [118].

В действительности, используемые в АСМ модели для определения модуля Юнга клеток могут предоставлять лишь оценочную, приблизительную информацию о механических свойствах этих объектов. В будущем предстоит разработать более точные модели, позволяющие учитывать как сложность строения клеток, их геометрию, так и тот факт, что, по сути, клетка не является абсолютно упругой. Кроме того, важно выработать общие подходы и создать протоколы измерения модуля упругости нативных клеток с помощью АСМ.

Несмотря на недостатки, модель Герца и ее производные модели активно применяются для определения модуля Юнга нативных клеток. Это связано, прежде всего, с простотой этих моделей, а также с удовлетворительной точностью, которые они могут предоставить.

Весьма спорным во всех рассмотренных моделях является предположение о том, что при индентировании зонд проскальзывает по поверхности образца. Учитывая свойства клетки

(мягкость, гликокаликс на поверхности), нетрудно допустить иной характер контактного взаимодействия индентора с объектом исследования, а именно зацепление кончиком зонда и ее смещение в латеральном направлении. В этом случае, клетка будет деформироваться не только по оси Z , но и в плоскости XY . Если это так и имеет место прилипание острия зонда к клетке, то при оценке модуля Юнга объекта исследования с помощью обычных моделей можно ожидать получения сильно ошибочных результатов.

Интересно, что описанное прилипание зонда к образцу, в принципе, может приводить к аномальным изгибам кантилевера, и, соответственно, неверным измерениям. Если реакция образца на сдвиг в латеральном направлении будет достаточно сильной, то консоль зондового датчика изогнется в противоположную обычной сторону.

Данную проблему можно преодолеть, используя усовершенствованную двулучевую систему детектирования изгибов кантилевера [119, 120]. Она предполагает добавление дополнительных лазера и фотодиода к стандартной оптической системе детектирования (рисунок 1.9 а). Первая пара источника излучения и фотодетектора настраивается стандартным образом – отраженный от конца кантилевера лазерный луч падает на фотодиод, а дополнительная пара юстируется так, что луч, улавливаемый детектором, отражается от середины консоли зондового датчика. Такая концепция позволяет более эффективно отслеживать изгибы кантилевера. Похожая, но немного модифицированная система детектирования описана в [121]. В ней по-прежнему используется два лазера, но уже не два фотодетектора, а лишь один (рисунок 1.9 б). Разделение сигналов от лазеров производится за счет временного разделения их импульсов.

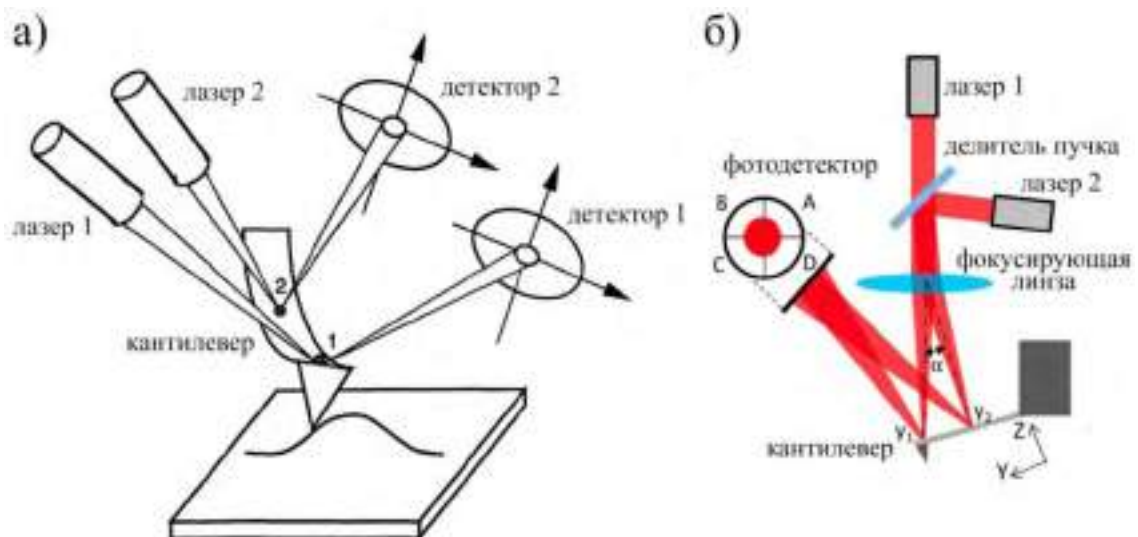


Рисунок 1.9 - Двулучевые системы детектирования отклонений кантилевера а) предложенная в [119] б) описанная в [121].

Возникают ли аномальные изгибы кантилевера при исследовании мягких клеток, не известно. Прояснению этого могли бы способствовать исследования с применением обозначенных методов двулучевого детектирования отклонений консоли зонда.

Существующие методы изучения механических свойств клеток позволяют оценивать отклик этих объектов на деформацию, а также регистрировать силы, которые клетки создают сами. Среди активных методов измерения механических характеристик индивидуальных клеток, несмотря на имеющиеся недостатки, весьма многообещающим выглядит АСМ. Он позволяет в физиологически адекватных условиях с нанометровым разрешением исследовать морфологию и механические характеристики нативных клеток. Сравнительно новые квазистатические режимы АСМ пока мало использовались для изучения клеток, однако, они могут помочь повысить информативность исследований за счет относительно быстрых измерений. Широко используемым индикатором состояния клеток является модуль Юнга. Этот параметр, в частности, может использоваться для проявления реакции нативных клеток на различные внешние воздействия. Однако, что важно для достижения цели данной работы, при выборе такого индикатора следует учитывать многочисленные факторы, влияющие на его определение (способ подготовки образца, параметры АСМ индентирования, выбранную модель расчета и др.).

2. ИЗУЧЕНИЕ НАТИВНЫХ КЛЕТОК В РЕЖИМЕ REAKFORCE QNM АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

2.1 ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ И ПРИНЦИП РАБОТЫ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

Современный атомно-силовой микроскоп – это сложный прибор, к обязательным составляющим которого относятся следующие элементы:

- 1) зондовый датчик,
- 2) сканер,
- 3) оптическая система детектирования,
- 4) система управления микроскопом,
- 5) система обработки и хранения информации.

Как правило, современные коммерческие АСМ системы также оборудуются оптическим микроскопом, который нужен для выбора места АСМ сканирования и позиционирования зонда относительно образца, а иногда также для настройки системы детектирования. Кроме того, зачастую атомно-силовые микроскопы снабжаются разнообразным дополнительным оборудованием, которое помогает расширить возможности приборов или способствует решению конкретных исследовательских задач.

Рабочая часть атомно-силового микроскопа – зонд – датчик, при помощи которого производится измерение геометрических и других параметров поверхности образца. Взаимное перемещение зонда относительно образца в АСМ осуществляется с помощью пьезокерамического сканера. Его действие основано на обратном пьезоэффекте – изменении геометрии тела в ответ на приложенное электрическое поле. Использование пьезоматериалов в конструкции сканеров атомно-силовых микроскопов позволяет производить прецизионные перемещения, что в результате дает возможность достичь высокого пространственного разрешения АСМ изображений.

Сканирование в АСМ похоже на движение пучка электронов в электронно-лучевой трубке (ЭЛТ). Подобно потоку электронов, строка за строкой движущемуся по покрытому люминофором экрану в ЭЛТ, АСМ зонд перемещается над образцом, построчно регистрируя неровности рельефа поверхности изучаемого материала. В зависимости от конструктивных особенностей модели атомно-силового микроскопа, могут реализовываться различные концепции сканирования. Так, в некоторых приборах образец устанавливается на сканер и перемещается вместе с ним относительно неподвижного зонда (сканирование образцом), в других же, наоборот, образец является статичным, а движется закрепленный на пьезосканере

зонд (сканирование зондом). Встречаются также и АСМ системы, в которых совмещены оба варианта сканирования.

В результате силового взаимодействия с исследуемой поверхностью во время АСМ сканирования кантилевер изгибается. Величину изгиба консоли зонда (угол θ) можно регистрировать различными способами. Однако наибольшее распространение в АСМ получила оптическая система детектирования. При таком способе регистрации отклонений кантилевера на тыльную зеркальную сторону консоли зондового датчика над иглой падает лазерный луч, который, отражаясь, попадает на четырехсекционный фотодиод (рисунок 2.1). За счет этого в детекторе генерируется электрический ток, причем общий сигнал складывается из суммы компонентов, возникающих в отдельных сегментах.



Рисунок 2.1 - Схематичное представление четырехсекционного фотодетектора (пятно от лазерного луча обозначено красным цветом).

Изначально, когда кантилевер находится в неизогнутом состоянии (далеко от поверхности образца) система детектирования юстируется таким образом, чтобы после отражения от балки зонда лазерный луч попадал в центр фотодетектора. В этом случае разностный сигнал между двумя верхними и двумя нижними секциями будет равняться нулю (секциями 1,2 и 3,4 на рисунке 2.1). Изгиб кантилевера приведет к смещению пятна от лазерного луча относительно центра фотодиода и пропорциональному изменению электрического сигнала (напряжения, ΔU или тока, ΔI) на фотодетекторе, т.е. $\theta \sim \Delta U$ (или ΔI). Если система детектирования работает за счет измерения напряжения, то ΔU будет определяться следующим образом:

$$\Delta U = (\Delta U_1 + \Delta U_2) - (\Delta U_3 + \Delta U_4) \quad (2.1)$$

где ΔU_i – изменение напряжение на i -том сегменте фотодиода (рисунок 2.1).

Таким образом, размер выпуклостей и вогнутостей исследуемой поверхности при АСМ сканировании можно регистрировать по величине изменения электрического сигнала фотодетектора, которое вызывается изгибами кантилевера.

На рисунке 2.2 показана упрощенная схема атомно-силового микроскопа в модификации сканирования образцом. Сканер 1 осуществляет движения образца 2 по XYZ направлениям. В результате силового взаимодействия зонда 3 с исследуемой поверхностью, кантилевер изгибается. Величина изгиба регистрируется оптической системой, состоящей из лазера 4 и четырехквadrантного фотодиода 5.

Управление в АСМ производится за счет системы обратной связи. Действие этой системы основывается на поддержании на определенном постоянном уровне выбранного параметра сканирования P , позволяющего отслеживать рельеф изучаемой поверхности [122]. В зависимости от режима работы АСМ этот параметр может меняться. Пусть исходное значение выбранного параметра P_0 , тогда при изменении высоты образца под зондом мы получим $P_1 = P_0 + \Delta P$. Для компенсации ΔP генерируется управляющий сигнал $\Delta U_{упр}$, который заставляет Z -сканер укорачиваться или удлиняться в зависимости от знака ΔP . В результате, величины смещения сканера под действием $\Delta U_{упр}$ могут использоваться для построения высотного распределения поверхности образца.

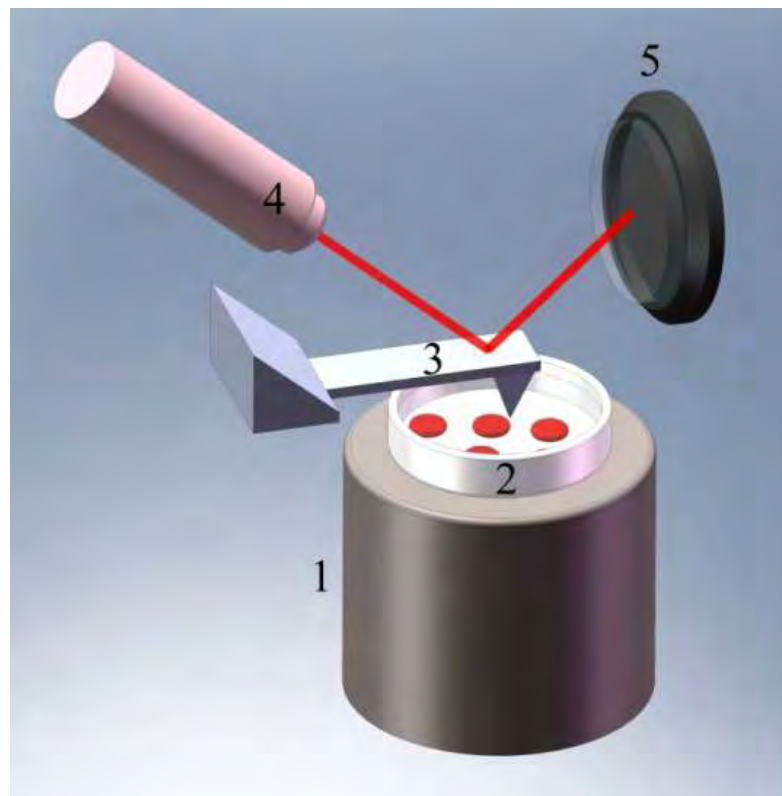


Рисунок 2.2 - Упрощенная схема атомно-силового микроскопа с оптической системой детектирования (1 – пьезосканер, 2 – образец, 3 – зонд, 4 – лазер, 5 – оптический детектор).

Обычно контроллер, отвечающий за управление атомно-силовым микроскопом, конструктивно реализуется в виде отдельного блока электроники, который соединяет рабочую часть прибора с компьютером. Последний с помощью установленного программного обеспечения позволяет посылать управляющие команды, а также осуществляет сбор, обработку

и хранение получаемых АСМ данных. «Ощупывание» образца зондом дает возможность производить визуализацию рельефа поверхности изучаемого материала за счет построения трехмерного образа топографии, получаемого программным образом путем объединения отдельных профилей высоты в единое изображение.

Допустимый размер области сканирования и максимально приемлемый перепад высот образца в АСМ зависят от характеристик установленного в приборе сканера (диапазоном движений по осям X, Y, Z) и обычно составляют величины $\sim 10\text{--}100$ мкм и $\sim 1\text{--}10$ мкм соответственно.

Существует несколько режимов работы АСМ, наиболее часто используются контактный и тэппинг режимы. В первом режиме зонд находится в постоянном контакте с исследуемой поверхностью. Во время сканирования игла зондового датчика скользит по образцу, повторяя все неровности поверхности. При этом параметром обратной связи служит величина отклонения кантилевера от выбранного первоначального положения.

В тэппинг режиме зонд постукивает по поверхности образца, контактируя с последним лишь кратковременно. Для этого возбуждаются колебания кантилевера вблизи его резонансной частоты. Параметром обратной связи в данном случае обычно является амплитуда колебаний зонда, которая изменяется в зависимости от высоты образца.

2.2 АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОП ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ BIOSCOPE CATALYST

В связи с все возрастающим интересом к АСМ со стороны биологии, в последнее время стали конструироваться коммерческие зондовые системы, оптимизированные для работы с биологическими объектами. К такого рода системам относится атомно-силовой микроскоп BioScope Catalyst [123] (Bruker, США), который использовался в данной работе. Все АСМ эксперименты проводились на микроскопе BioScope Catalyst, установленном в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН.

BioScope Catalyst (рисунок 2.3 а) совмещен с инвертированным оптическим микроскопом Carl Zeiss Axio Observer Z1, позволяющим работать с прозрачными биологическими образцами. Оптический и атомно-силовой микроскопы располагаются на виброизоляциином столе, демпфирующем паразитные внешние колебания. Атомно-силовой микроскоп оснащен отдельным блоком для юстировки оптической системы детектирования EasyAlign.

Рабочий узел атомно-силового микроскопа BioScope Catalyst (рисунок 2.3 б) состоит из базовой плиты и сканирующей головки. XY сканер встроен в базовую плиту, а за перемещения

зонда по оси Z ответственен пьезоэлемент, установленный в головке прибора. BioScope Catalyst отличают большие диапазоны сканирования: 150 мкм по осям XY и 20 мкм по оси Z [124].

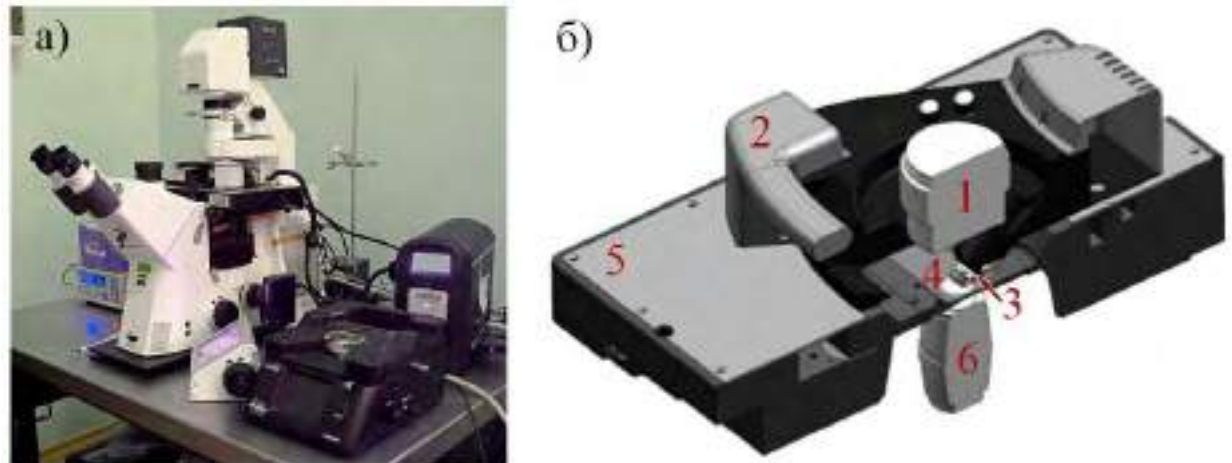


Рисунок 2.3 - а) атомно-силовой микроскоп Bruker BioScope Catalyst со вспомогательным оборудованием, б) рабочий узел атомно-силового микроскопа Bruker BioScope Catalyst (1 – конденсор; 2 – съемная головка, обеспечивающая движение зонда по оси Z ; 3 – держатель зондового датчика; 4 – место установки образца; 5 – базовая плита (перемещает образец в плоскости XY); 6 – объектив) [125].

Благодаря интегрированному в базовую плиту нагревательному столику, управляемому температурным контроллером LakeShore Model 335 [126], можно термостатировать образец во время его АСМ исследования. BioScope Catalyst хорошо приспособлен для работы в жидкости, т.к. помимо стандартных предметных и покровных стекол допускает использование чашек Петри диаметром 35, 50 или 60 мм. Эти качества АСМ системы позволяют при изучении нативных клеток обеспечить объектам исследования условия, максимально приближенные к физиологическим.

Управление атомно-силовым микроскопом производится с помощью специального программного обеспечения NanoScope 8.15 посредством блока электроники E-Vox и контроллера NanoScope V. В программной оболочке NanoScope 8.15 наряду с обычными контактными и тэппинг режимами реализован режим количественной наномеханики PeakForce QNM, который мы использовали для исследования нативных клеток.

2.3 РЕЖИМ ПОТОЧЕЧНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ PEAKFORCE QNM И ЕГО ОСОБЕННОСТИ

Применимость традиционных контактного и тэппинг режимов АСМ для исследования нативных клеток ограничена требованиями, предъявляемыми столь деликатным образцом.

Контактный режим АСМ характеризуется значительными силами, действующими в латеральном направлении, которые появляются в результате постоянного соприкосновения зонда с поверхностью образца во время сканирования. Такие паразитные силы особенно вредоносны, когда образец представляет собой легко повреждаемые нативные клетки. Острый АСМ зонд в контактном режиме деструктивно действует на клетки, нарушая целостность их плазматической мембраны. Другим следствием нежелательных латеральных сил может явиться открепление образца от подложки при зацеплении зондом в процессе АСМ сканирования.

В тэппинге латеральные силы снижены, поэтому данный режим более деликатен и, в целом, лучше подходит для изучения нативных клеток. Однако такие клетки необходимо исследовать в жидкой среде, а в тэппинг режиме АСМ могут возникнуть трудности с настройкой резонансной частоты зондового датчика из-за низкой добротности, Q , в жидкости. Если на воздухе $Q \sim 100-500$, то в жидкости значение параметра падает до $Q \sim 1$. Кроме того, тэппинг хоть и позволяет визуализировать различия в распределении механических характеристик поверхности по изменению фазы колебаний, тем не менее, не обеспечивает количественных измерений и оценка механических свойств образца носит лишь качественный характер. Также из-за отсутствия прямого контроля силы в этом режиме нельзя гарантировать неразрушающее воздействие зонда на образец.

Преодолеть ограничения контактного и тэппинг режимов работы АСМ позволяет квазистатический режим PeakForce QNM. В нем зонд в каждой точке измерения надавливает на поверхность образца, затем отводится от нее на безопасное расстояние, перемещается в следующую точку, и процесс повторяется снова. Благодаря такому подходу в процессе сканирования не возникает чрезмерных латеральных сил, способных повредить образец. А, так как кантилевер в этом режиме колеблется не на резонансной частоте, нет необходимости ее настраивать. В PeakForce QNM параметром обратной связи является пиковая (максимальная) сила надавливания зонда на образец. В связи с этим нетрудно подобрать подходящую для сканирования силу, которая, с одной стороны позволит получить качественное АСМ изображение клетки, а с другой – не будет повреждать объект исследования. Сохранение целостности образца обеспечивается возможностью контроля силы вплоть до 10 пН [127].

На практике в каждой точке измерения в режиме PeakForce QNM регистрируется, так называемая кривая «пульс» (heartbeat), которая представляет собой зависимость приложенной зондом силы от времени (рисунок 2.4 а). Время t , затрачиваемое на регистрацию кривой «пульс», составляет от 4 мс до 0,5 мс при частоте колебаний зонда 0,25 кГц и 2 кГц соответственно. «Пuls» преобразуется в функцию силы взаимодействия зонда с образцом от расстояния между ними – стандартную силовую кривую АСМ (рисунок 2.4 б). Анализируя полученную зависимость, можно вычислить деформацию образца, его модуль Юнга, силу

адгезии и диссипацию. Программная обработка и анализ кривых для извлечения количественных данных выполняется прямо во время АСМ сканирования параллельно с получением топографии поверхности образца. Такая автоматизация позволяет вместе с рельефом поверхности без дополнительной постобработки получать готовый массив статистических данных механических характеристик образца.

Горизонтальная часть синей кривой до точки 1 (рисунок 2.4 а,б) соответствует отсутствию силового контактного взаимодействия между зондом и образцом, в точке 1 кантилевер вступает в соприкосновение с поверхностью образца. На отрезке 1–2 зонд начинает с возрастающей силой давить на объект исследования, максимум силы достигается в точке 2. Отрезок красной кривой 2–3 указывает на начало отведения индентора от образца, что сопровождается постепенным уменьшением силы взаимодействия между ними. В точке 3 происходит отрыв иглы от изучаемого объекта, зонд перестает испытывать силу отталкивания со стороны образца (горизонтальная часть красной кривой после точки 3).

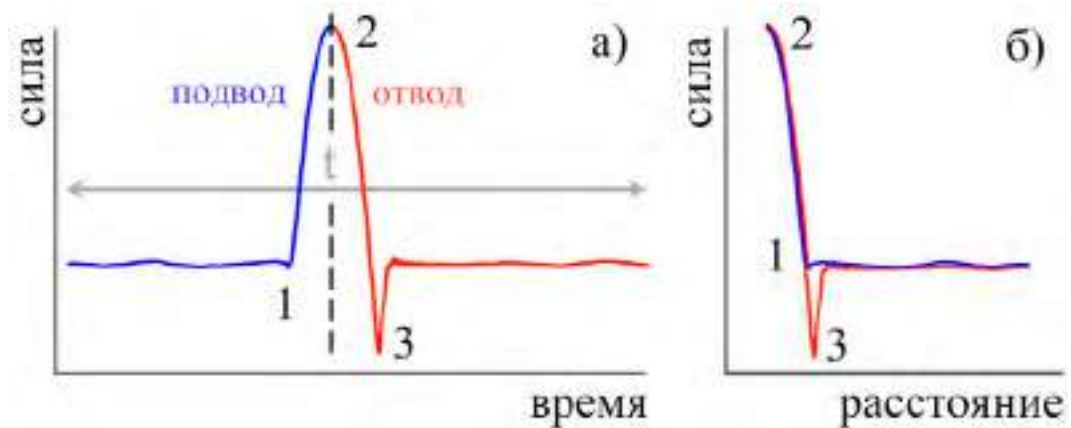


Рисунок 2.4 - а) кривая «пульс», регистрируемая в каждой точке измерения в режиме PeakForce QNM, б) силовая кривая, получающаяся в результате программной обработки кривой «пульс».

Рассмотрим подробнее силовую кривую АСМ, являющуюся источником информации о механических характеристиках образца в режиме PeakForce QNM. На рисунке 2.5 показаны параметры, которые определяются по силовой кривой: пиковая сила, величина деформации, сила адгезии, диссипация. Пиковая сила – это сумма выбранного опорного значения силы и ошибки в данной точке измерения. Деформация (глубина индентирования) показывает податливость образца при надавливании на него зондом. Более мягкий, т.е. податливый образец будет демонстрировать бóльшую деформацию, а более твердый – меньшую. Кроме деформации податливость образца можно охарактеризовать с помощью модуля Юнга изучаемого материала. Следует отметить, что точное количественное определение механических характеристик в PeakForce QNM возможно после проведения процедуры калибровки.

Адгезия показывает, с какой силой зонд липнет к поверхности образца. Эта величина определяется по кривой отвода (рисунок 2.5). Действие силы адгезии выражается в том, что при удалении от поверхности образца острие зонда остается в контакте с образцом еще некоторое время после выпрямления кантилевера, что заставляет консоль зондового датчика выгибаться в противоположную сторону. Сила адгезии зависит как от адгезионных свойств исследуемого материала, так и от площади контакта между зондом и образцом, наличия слоя воды, адсорбированной на поверхности образца в случае исследования в воздушной среде и др.

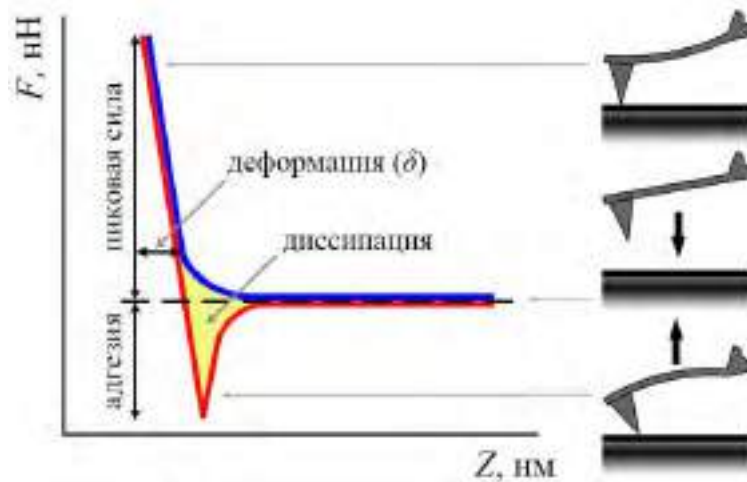


Рисунок 2.5 - Силовая кривая АСМ, синим цветом обозначена кривая подвода, а красным – кривая отвода.

Еще одним параметром, который можно определить по силовой кривой АСМ, является диссипация. Отсутствие диссипации указывает на абсолютно упругую деформацию объекта исследования, в то время как отличная от нуля диссипация будет свидетельствовать о пластической деформации или о том, что образец – вязкоупругий. Количественно диссипация определяется площадью фигуры, ограниченной кривыми подвода и отвода (рисунок 2.5).

В PeakForce QNM можно сразу получать топографию и карты распределения всех доступных характеристик образца за одно сканирование, т.к. одновременно допускается регистрация до 8 каналов различных параметров.

Полученные в ходе эксперимента в режиме PeakForce QNM данные, как правило, представляются в виде тоновых изображений. Величину измеренного параметра в точке на АСМ карте отражает тон пикселя: чем пиксель светлее – значение больше и наоборот (рисунок 2.6). Значение в точке измерения определяется по силовым кривым, причем в каждом пикселе может регистрироваться несколько кривых. Так, например, при частоте горизонтальной развертки 0,1 Гц, строчном разрешении 128 точек и частоте индентирования 250 Гц на каждую точку измерения приходится около 20 силовых кривых, т.е. измеряемый параметр, отображаемый на АСМ изображении, усредняется примерно по 20 значениям.

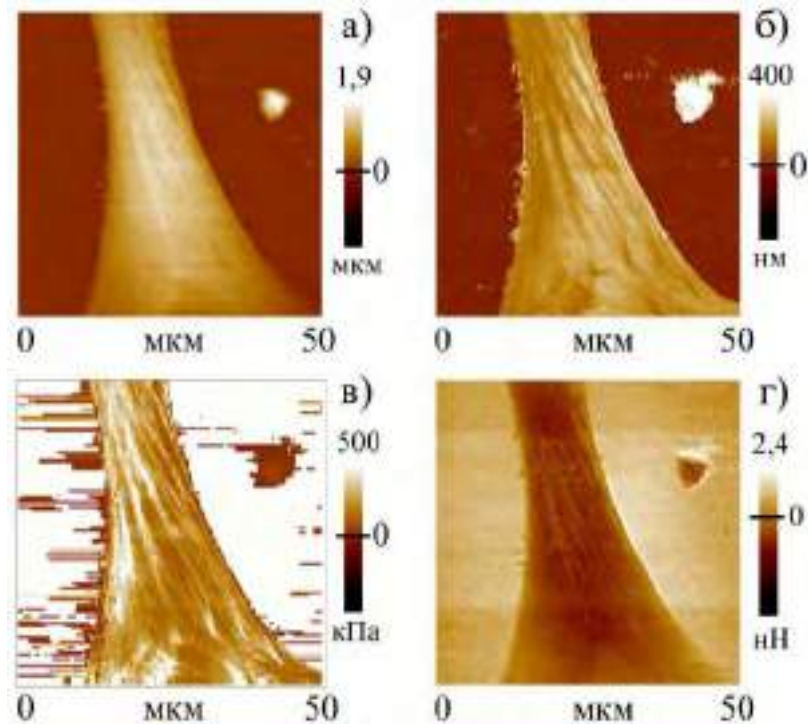


Рисунок 2.6 - Типичный набор АСМ данных в режиме PeakForce QNM на примере нативного фибробласта: а) топография, б) величина деформации, в) эффективный модуль Юнга, г) сила адгезии.

На рисунке 2.7 а показан пример экспериментальных силовых кривых, полученных на поверхности нативного фибробласта в режиме PeakForce QNM. Наклон контактной части силовых кривых подвода и отвода на клетке существенно более пологий, чем на коллагеновой подложке. Рисунок 2.7 б демонстрирует результат обработки силовых кривых в соответствии с моделью Снеддона (карту распределения эффективного модуля Юнга).

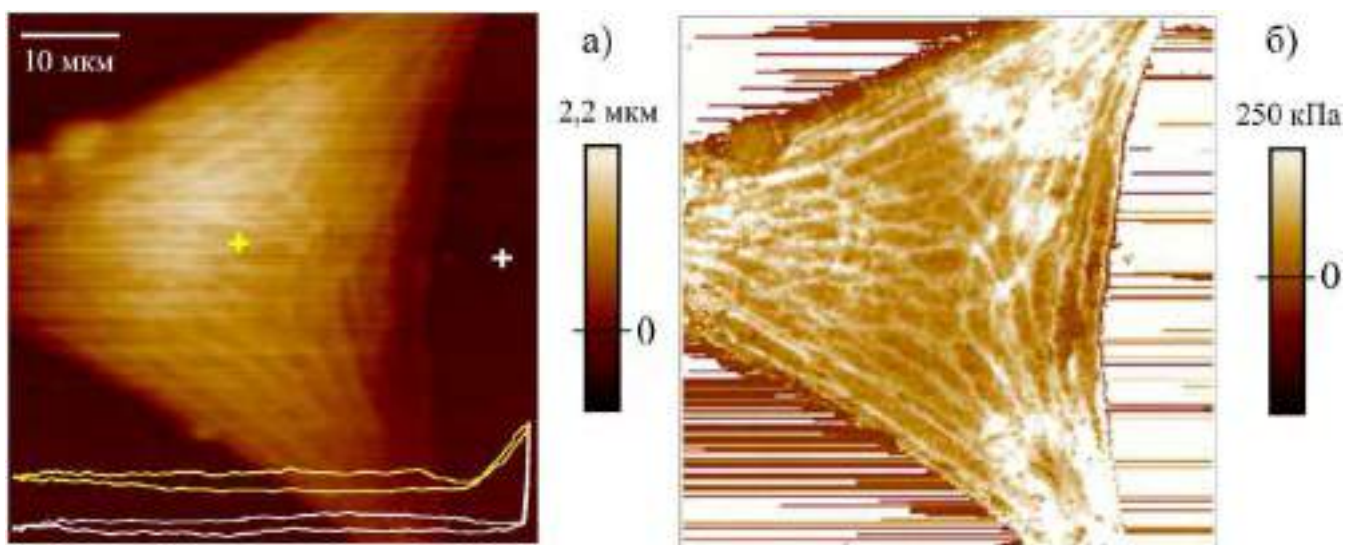


Рисунок 2.7 АСМ изображения нативного фибробласта, полученные в режиме PeakForce QNM
а) топография, б) карта эффективного модуля Юнга.

PeakForce QNM превосходит другие режимы АСМ, позволяющие определять механические характеристики объекта исследования – силовую спектроскопию и Force Volume – по скорости измерения и объему получаемых данных. Поэтому он наиболее эффективен при необходимости сбора и обработки статистических данных о распределении механических свойств по поверхности образца. Вместе с тем, режимы PeakForce QNM и Force Volume можно рассматривать как взаимодополняющие, а не конкурирующие. Force Volume предоставляет более гибкие возможности по настройке параметров индентирования, что может быть полезно в ряде случаев, например, когда высокое разрешение АСМ карт распределения механических характеристик не столь важно или необходимо разнести точки измерения в пространстве. Кроме того, более низкая частота индентирования, характерная для этого режима, уменьшает гистерезис силовых кривых при зондировании вязкоупругих образцов и, следовательно, обеспечивает повышение точности измерения механических характеристик таких объектов.

Достоинства PeakForce QNM позволяют считать этот режим АСМ перспективным для изучения механических свойств нативных клеток. Прямой контроль силы воздействия способствует сохранению целостности клетки. Быстрое индентирование дает возможность за короткое время с высоким разрешением визуализировать топографию, картировать механические характеристики клетки, а также повышает вероятность сохранения ее интактного и относительно стабильного состояния на протяжении всего АСМ эксперимента.

Стоит упомянуть также и очевидные недостатки PeakForce QNM при изучении нативных клеток. Например, синусоидальная форма электрического сигнала, управляющего Z-сканером, подразумевает неравномерную скорость движения зонда при индентировании образца. Кроме того, высокая частота вертикальных осцилляций кантилевера осложняет измерения в жидкости, т.к. вязкостное сопротивление растет с повышением скорости движения зонда.

2.4 ВЫБОР ЗОНДОВОГО ДАТЧИКА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОГО МОДУЛЯ ЮНГА НАТИВНЫХ КЛЕТОК В РЕЖИМЕ PEAKFORCE QNM

Критически важным для эффективного изучения нативных клеток является правильный выбор зонда. С одной стороны, для измерения модуля Юнга клетки необходимо деформировать. С другой, при таком исследовании нужно обеспечить неразрушающее воздействие на объект. Оптимальной считается жесткость зонда, сопоставимая с жесткостью клеток [128]. Следует учитывать также характер движения зонда в режиме АСМ PeakForce QNM. Кантилевер совершает быстрые колебательные движения в жидкости. За счет вязкости жидкая среда сопротивляется перемещениям зонда, вызывая его изгибы. В PeakForce QNM реализован механизм борьбы с такими паразитными отклонениями кантилевера в виде

фильтрации силовых кривых. Тем не менее, чем ниже константа жесткости зондового датчика, тем сильнее он будет изгибаться при колебаниях и тем больше данный эффект будет мешать АСМ измерениям.

Часто клетки имеют довольно большую высоту (несколько микрон) и выпуклую форму. Из-за резкого перепада высот у таких образцов, консоль зонда с недостаточно длинной иглой может приходиться в контакт с объектом исследования и нежелательно механически стимулировать нативный объект. В связи с этим, важно, чтобы длина иглы зонда была больше, чем высота клетки. Таким образом, форму клеток следует принимать во внимание при выборе АСМ зонда.

Для повышения точности АСМ измерений оптимально, если игла кантилевера располагается не перпендикулярно, а под определенным углом по отношению к консоли. Кантилевер (консоль) в атомно-силовом микроскопе устанавливается под небольшим наклоном к плоскости расположения образца. Так, например, в микроскопах фирмы Bruker (Veeco) этот угол обычно составляет 12° [129]. Правильный выбор угла наклона оси острия, закрепленного на краю консоли, позволяет компенсировать наклон всего зондового датчика, чтобы игла была перпендикулярна плоскости размещения образца.

Немаловажной характеристикой АСМ зонда при измерении эффективного модуля Юнга клетки является форма и острота кончика. От остроты индентора зависит максимально достижимое разрешение АСМ сканирования. На разрешение также влияет величина деформации, которую зонд сообщает клетке. Острый зонд за счет большего давления на объект исследования должен деформировать клетку сильнее, чем более тупой. Поэтому для получения наилучшего разрешения зонд не должен быть ни экстремально острым, ни слишком тупым. Не стоит забывать также, что нативная клетка – деликатный объект, который можно легко повредить, если воздействовать на него с избыточной силой. Поэтому на практике часто используют АСМ кантилеверы с прикрепленной сферической частицей известного радиуса. Она позволяет снизить нагрузку, а, следовательно, и риск повреждения клетки.

Таким образом, оптимальный АСМ зонд для изучения нативных клеток в режиме PeakForce QNM должен обладать следующими характеристиками: сопоставимой с образцом жесткостью, достаточно длинной иглой, контролируемым радиусом закругления кончика, а угол наклона консоли зонда должен быть скомпенсирован наклоном иглы.

В данной работе для измерения эффективного модуля упругости нативных клеток использовались стандартные острые зонды Bruker SNL и DNP, AppNano NITRA-TALL-V-G и субмикронные сферические зонды [130] NT-MDT CSG10 с частицей 325 нм радиуса. Жесткость кантилеверов составляла $\sim 0,01\text{--}0,1$ Н/м.

2.5 ПРОБОПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ НАТИВНЫХ КЛЕТОК. ВЫБОР ПОДЛОЖКИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ НАТИВНЫХ КЛЕТОК

АСМ исследование не требует какой-либо сложной специальной подготовки нативных клеток. Приготовление образцов может осуществляться с помощью клеточного культивирования – стандартного метода подготовки клеток для изучения в биологии, медицине, сельском хозяйстве [131]. Данный метод широко используется для выявления механизмов действия различных клеточных процессов, а также для испытания лекарственных препаратов. Культивирование – это выращивание клеток с контролем температуры и состава атмосферы (например, 37°C, 5% CO₂) в питательной среде с необходимыми для их пролиферации компонентами.

Принципиальным условием изучения нативных клеток в АСМ является их надежная иммобилизация на подложке. Способность прикрепляться к подложке, во многом, зависит от типа клетки. Как правило, в качестве подложки используются предметные стекла и стеклянные или полистироловые чашки Петри. Иногда для улучшения адгезии клеток к подложке применяют различные вещества, усиливающие их прикрепление. К таким субстанциям в частности относятся такие компоненты внеклеточного матрикса как коллаген [89], фибронектин [132, 100], ламинин [96, 100, 133], продукт переработки коллагена – желатин [88, 134], продукт бактериального синтеза – полилизин [80, 95, 100], специальный запатентованный состав Cell-Tak [135] и т.д. На поверхности плазматической мембраны клеток животных располагаются трансмембранные белки – интегрины. Интегрины являются рецепторами, которые способны взаимодействовать с другими клетками и внеклеточным матриксом. Благодаря образованию связей между интегринными клетками и подложкой, состоящей из компонентов внеклеточного матрикса, удается зафиксировать клетку для проведения АСМ экспериментов.

Для иммобилизации клеток вещества, улучшающие клеточную адгезию, тонким слоем наносятся на стеклянную или полистироловую подложку. Такая модификация поверхности подложки осуществляется заранее, до осаждения на нее объектов исследования. В данной работе закрепление клеток в чашке Петри достигалось за счет использования коллагена, желатина, фибронектина и полилизина.

Следует отметить важность чистоты образца для его изучения с помощью АСМ. Присутствие в жидкой среде, окружающей клетки, свободно плавающих частиц может привести либо к загрязнению зонда, либо негативно отразиться на сканировании. Нужно учитывать, что как движение самого АСМ зонда во время сканирования, так и конвекция, возникающая из-за разницы температур нижних и верхних слоев жидкости, может приводить к

возмущениям окружающей клетки жидкой среды и произвольным перемещениям незакрепленных объектов. Такие объекты, попадая между кантилевером и источником лазерного излучения или фотодетектором, приведут к искажению сигнала отклонения и сбою силовых кривых режима PeakForce QNM.

Немаловажное значение могут иметь и прикрепленные к подложке агрегированные фрагменты мертвых клеток, остатки соединительной ткани, а также любые другие загрязнители, появляющиеся в процессе приготовления образцов. Если частицы загрязнителя достаточно крупные, то при определенном расположении они могут соприкоснуться с консолью зонда, препятствуя контакту острия и изучаемой клетки. Таким образом, при попытке просканировать клетку кантилевер будет задевать за высокий объект и изгибаться вследствие взаимодействия с ним, а не с клеткой.

Резюмируя, нужно подчеркнуть, что для успешного изучения нативных клеток с помощью режима АСМ PeakForce QNM необходимо зафиксировать положение клетки на подложке. Для этого иногда поверхность предметных и покровных стекол или дна чашек Петри модифицируется веществами, усиливающими клеточную адгезию. Выбор субстанции, способствующей надежной иммобилизации клеток, важно осуществлять с учетом типа клетки, который планируется исследовать.

2.6 ИЗМЕРЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОГО МОДУЛЯ ЮНГА НАТИВНЫХ КЛЕТОК В PEAKFORCE QNM

В штатной программе управления атомно-силовым микроскопом Bruker BioScope Catalyst NanoScope 8.15 реализованы две модели расчета модуля Юнга – ДМТ и Снеддона. В модели ДМТ, как и в модели Герца, форма зонда считается сферической (рисунок 2.8 а), а в модели Снеддона АСМ зонд аппроксимируется конусом (рисунок 2.8 б).

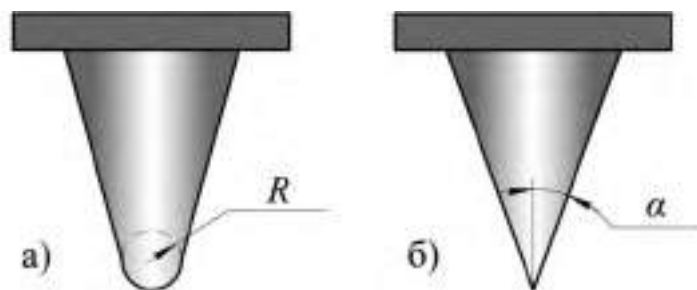


Рисунок 2.8 - Схематичное представление АСМ зонда в моделях а) ДМТ и б) Снеддона.

В общем виде вычисление модуля Юнга в рамках моделей ДМТ и Снеддона осуществляется в соответствии со следующим выражением:

$$F = \Gamma E^* \delta^n \quad (2.2)$$

где под F понимается сила взаимодействия между АСМ зондом и образцом в моделях ДМТ (F_{DMT}) и Снеддона (F_S); Γ – коэффициент, который зависит от геометрии индентора [81] (для индентора сферической формы он равен $\Gamma_{sphere} = \frac{4}{3}\sqrt{R}$, $\{R$ – радиус острия}, конической – $\Gamma_{cone} = \frac{2}{\pi}tg\alpha$, $\{\alpha$ – половинный угол раствора конуса}; E^* – приведенный модуль Юнга системы зонд-образец; δ – величина деформации (степень n зависит от формы индентора: $n_{sphere} = 3/2$, $n_{cone} = 2$).

Приведенный модуль Юнга связан с модулями Юнга зонда (E_{tip}) и образца (E_{sample}) следующим образом [136]:

$$\frac{1}{E^*} \approx \frac{1-\nu_{tip}^2}{E_{tip}} + \frac{1-\nu_{sample}^2}{E_{sample}} \quad (2.3)$$

ν_{tip} , ν_{sample} – коэффициенты Пуассона зонда и образца соответственно. Модуль Юнга АСМ зондов существенно больше, чем у нативных клеток ($E_{tip} \gg E_{sample}$). Так, модуль Юнга кремния составляет 130–185 ГПа, нитрида кремния (Si_3N_4) – 160–290 ГПа [40], а клетки, как правило, характеризуются модулем упругости ~ 1 –10 кПа. Таким образом, разница значений модуля Юнга зонда и образца в 7–8 порядков позволяет пренебречь первым слагаемым выражения. С учетом этого вычисление модуля Юнга клетки (E_{cell}) упрощается:

$$E_{sample} = E_{cell} \approx E^*(1-\nu_{cell}^2) = \frac{F(1-\nu_{cell}^2)}{\Gamma\delta^n} \quad (2.4)$$

где ν_{cell} – коэффициент Пуассона клетки.

В отличие от теории Герца (и модели Снеддона), в модели ДМТ допускается существование сил адгезии F_{adh} между соприкасающимися зондом и образцом, что и наблюдается в действительности при контакте с нативной клеткой:

$$E_{cell} = \frac{3}{4} \frac{F_{DMT} - F_{adh}}{\sqrt{R}\delta^{3/2}} (1-\nu_{cell}^2) \quad (2.5)$$

Коэффициент Пуассона – безразмерная величина, характеризующая сжимаемость тела. Клетки обычно считаются абсолютно несжимаемыми [137]. В таком случае коэффициент Пуассона равен 0,5, поэтому:

$$E_{cell} = \frac{9}{16} \frac{F_{DMT} - F_{adh}}{\sqrt{R}\delta^{3/2}}. \quad (2.6)$$

А в модели Снеддона:

$$E_{cell} = \frac{3\pi}{8} \frac{F_S}{tg\alpha \cdot \delta^2}. \quad (2.7)$$

Однако на практике вычисление модуля Юнга в программном пакете NanoScope 8.15 в режиме PeakForce QNM производится по линеаризованным силовым кривым. Так, для сферического и конического инденторов:

$$(F_{DMT} - F_{adh})^{2/3} = \left(\frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R} \right)^{2/3} \cdot \delta \quad (2.8)$$

$$\sqrt{F_S} = \sqrt{\frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \operatorname{tg} \alpha} \cdot \delta. \quad (2.9)$$

F_{DMT} , F_{adh} , F_S определяются по силовым кривым, регистрируемыми в каждой точке измерения.

Модуль Юнга в модели ДМТ вычисляется по контактной части силовой кривой отвода, в то время как при применении модели Снеддона, наоборот, анализируется кривая подвода.

В режиме PeakForce QNM при использовании острых АСМ зондов более точно форму индентора аппроксимирует конус (модель Снеддона), а в случае коллоидных зондов целесообразно рассматривать сферический индентор (модель ДМТ).

Калибровка

Для получения количественных данных о механических характеристиках образца, в частности о его модуле упругости, в режиме PeakForce QNM необходимо предварительно провести процедуру калибровки. Если обратиться к выражениям для вычисления модуля упругости в соответствии с моделями ДМТ и Снеддона, становится понятно, что для измерения модуля Юнга необходимо знать соответственно радиус шарика и половинный угол раствора конического зонда. Как правило, коммерческие кантилеверы снабжаются подробными спецификациями, включающими и размер частицы у зондов с шариком, и угол раствора для стандартных острых игл. При самостоятельной модификации кантилевера шариком с неизвестным радиусом, можно охарактеризовать кончик индентора с помощью специальных тестовых образцов или, используя СЭМ.

Также, чтобы количественно определять механические свойства поверхности образца, нужно точно контролировать силу между ней и зондом. Если представить кантилевер в виде пружины, то, согласно закону Гука, сила, действующая на зонд при контактном взаимодействии с образцом, будет равна:

$$F = k_c \cdot x \quad (2.10)$$

где k_c – коэффициент жесткости кантилевера, а x – величина деформации пружины, которая пропорциональна изгибу консоли. Таким образом, для определения силы нужно знать жесткость зонда, которую производители АСМ кантилеверов указывают в паспортных данных, однако, вследствие несовершенства технического процесса производства зондовых датчиков, не позволяющего в точности воспроизводить механические свойства кантилеверов, рекомендуется

индивидуально калибровать константу жесткости каждого зонда перед АСМ измерением. Для этой цели в программе управления атомно-силовым микроскопом Bruker BioScope Catalyst используется метод тепловых шумов [129].

Для определения жесткости кантилевера по методу тепловых шумов предварительно необходимо откалибровать чувствительность фотодетектора, т.е. установить связь между перемещением Z -пьезосканера и величиной отклонения кантилевера. Такую калибровку проводят на твердом образце, деформация которого под действием АСМ зонда пренебрежимо мала. При этом предполагается, что зонд тоже не деформируется, а вся энергия взаимодействия идет на изгиб кантилевера.

Емкостной датчик перемещений позволяет определять величину изменения длины Z -пьезосканера при заданном управляющем напряжении. Зная величину удлинения сканера при контакте с образцом, можно оценить изгиб зондового датчика. Полученный калибровочный коэффициент [нм/В] покажет, как изменяется электрический сигнал на фотодетекторе в результате изгиба зонда, вызванного приближением Z -сканера.

В данной работе в большинстве случаев калибровка чувствительности отклонения производилась на сапфировом образце SAPPHIRE-12M из стандартного калибровочного набора для PeakForce QNM PFQNM-SMPKIT-12M. Константа жесткости каждого зондового датчика калибровалась либо в воздушной среде, либо в жидкости. На воздухе производилась калибровка зондов с низкой жесткостью (с резонансной частотой $f_0 < 32$ кГц), а более жесткие ($f_0 > 32$ кГц) калибровались в погруженном в чашку Петри состоянии [138]. Углы раствора острых зондов и радиусы шариков коллоидных кантилеверов брались из спецификаций, предоставляемых поставщиками.

Следует отметить, что калибровка чувствительности отклонения по кривым, снятым на свободной от клеток и загрязнений поверхности чашки Петри, затруднена из-за плохой воспроизводимости силовых кривых. По-видимому, это связано с эффектом модификации подложки адгезивными веществами. Возможно, также негативное влияние оказывает и подогрев дна чашки Петри, вызывающий конвекцию жидкости. Процедура оценки чувствительности отклонения и константы жесткости в жидкости применялась лишь для относительно жестких зондов, калибровка которых на воздухе могла быть неточной [138].

Если силовое контактное взаимодействие между зондом и калибровочным твердым образцом вызывает лишь изгиб первого, то приложение равной по величине силы к мягкому объекту приведет не только к такому же по величине отклонению кантилевера, но и к деформации образца. Из-за этого при равных нагрузках на более податливом материале величина удлинения Z -пьезосканера будет больше, чем на твердом образце. В результате наклон контактной части силовой кривой (желтая кривая на рисунке 2.9) будет менее крутым,

чем на калибровочном материале (синяя кривая на рисунке 2.9). Деформацию мягкого образца (глубину индентации) δ можно вычислить следующим образом (рисунок 2.9):

$$\delta = \Delta Z - d, \quad (2.11)$$

где ΔZ , d – величины удлинения пьезосканера на мягком образце и на калибровочном объекте соответственно (рисунок 2.9). Зная деформацию образца при заданной силе, можно вычислить модуль Юнга.

Помимо модуля Юнга PeakForce QNM позволяет картировать также максимальную локальную деформацию образца. В реальности в канале деформации отображаются заниженные значения данного параметра. При рассмотрении силовой кривой учитывается верхняя часть контактного отрезка, от 15% до 100% от пиковой силы. Уровень отсечки в 15% можно регулировать. Нижний отрезок контактной части силовой кривой обрезается для снижения влияния шума базовой линии на измерение деформации.

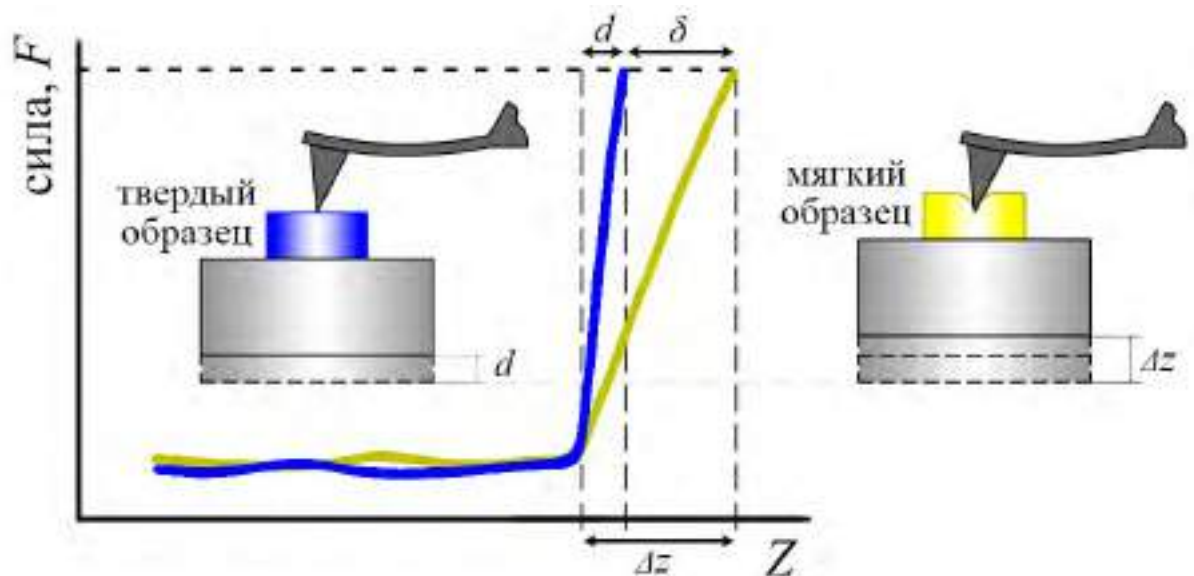


Рисунок 2.9 - Определение величины деформации по силовой кривой АСМ. Синяя кривая соответствует силовой кривой на твердом калибровочном образце, а желтая – на мягком. Схематично изображено отсутствие деформации калибровочного образца при индентировании зондом, а также ее наличие у мягкого объекта при одинаковой силе надавливания.

2.7 ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ИЗУЧЕНИЮ КЛЕТОК И ВЫБОР ПАРАМЕТРОВ СКАНИРОВАНИЯ РЕЖИМА PEAKFORCE QNM

Предваряющая эксперименты с нативными клетками процедура калибровки проводилась либо на воздухе при комнатной температуре около 21°C, либо в жидкости с клетками, подогреваемыми до 37°C. После калибровки на воздухе зонд помещался в дистиллированную воду, и производилась юстировка оптической системы детектирования АСМ в жидкости.

Образец с клетками, в наших экспериментах представляющий собой полистироловую чашку Петри диаметром 35–40 мм, на дне которой находились объекты исследования, устанавливался на термостол атомно-силового микроскопа Bruker Bioscope Catalyst. Резкий скачок температуры окружающей среды при помещении зонда в жидкость с клетками, приводил к изменению сигнала вертикального отклонения. Этот феномен можно объяснить тем, что обратная сторона зондов обычно покрывается слоем золота для улучшения отражательной способности, и любое изменение температуры приводит к изгибу кантилевера, сопровождающемуся дрейфом сигнала отклонения [40]. Достижение температурного баланса происходило в течение 10–15 минут, по прошествии которых сигнал отклонения устанавливался в «ноль» путем регулировки положения фотодетектора.

Зонд подводился к чистой (свободной от клеток и их фрагментов) поверхности образца и осуществлялась корректировка чувствительности отклонения на подложке. Впоследствии с помощью оптического микроскопа производился поиск и выбор клеток для АСМ сканирования в режиме PeakForce QNM. Как правило, исследовались надежно прикрепленные ко дну чашки Петри объекты правильной, присущей данному типу клеток, формы, которые не имели загрязнений на своей поверхности. Выбранная для АСМ исследования клетка перед сканированием фотографировалась с помощью оптического микроскопа.

При исследовании нативных клеток устанавливались минимально возможные частота строчной развертки режима PeakForce QNM – 0,1 Гц и частота индентирования – 0,25 кГц. Пиковая сила, амплитуда вертикального движения кантилевера, размер АСМ кадра и разрешение получаемых АСМ изображений подбирались индивидуально для каждого типа клетки, исходя из их свойств и требований эксперимента. Время сканирования клеток в зависимости от разрешения составляло от нескольких единиц до нескольких десятков минут.

Типичные силы зондирования различных типов клеток в режиме PeakForce QNM находились в диапазоне $\approx 0,5\text{--}3$ нН. Наиболее податливые клетки (эритроциты) сканировались с наименьшей силой, в то время как нагрузка при АСМ изучении более твердых клеток с развитым цитоскелетом (фибробластов) была выше.

В зависимости от используемого типа зондового датчика менялся канал регистрации эффективного модуля Юнга. При применении острых зондов выбирался канал эффективного модуля упругости по Снеддону, а в случае использования зонда со сферической частицей применялась модель определения эффективного модуля Юнга ДМТ.

Посредством оптического микроскопа во время АСМ сканирования осуществлялся контроль состояния клеток. В случае открепления клетки или ее повреждения АСМ сканирование немедленно прекращалось. Кроме того, непрерывно проводился мониторинг регистрируемых силовых кривых, сбой которых мог привести как к некорректному измерению

механических характеристик образца, так и к разрушению нативного объекта вследствие увеличения силы взаимодействия между зондом и образцом.

Любое необычное изменение АСМ изображений во время сканирования могло быть следствием загрязнения зонда. При подозрении на загрязнение зондовый датчик прополаскивали в дистиллированной воде и обрабатывали УФ излучением. Если подобная обработка не помогала, зонд меняли на новый.

2.8 ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОБРАБОТКЕ ДАННЫХ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Для обработки и анализа АСМ данных использовались программные пакеты NanoScore Analysis 1.50 и Gwyddion 2.44 [139]. С помощью этих программ производились сглаживание и подготовка для публикации АСМ изображений, математические действия с АСМ каналами, экспортирование данных в формате ASCII для дальнейшего статистического анализа в сторонних приложениях. Обработка численных данных осуществлялась посредством Microsoft Office Excel 2007 и OriginPro 2015. Подробная информация об использованных методиках обработки данных АСМ приведена в главах, описывающих экспериментальные результаты диссертационной работы.

2.9 АРТЕФАКТЫ ИЗОБРАЖЕНИЙ НАТИВНЫХ КЛЕТОК В РЕЖИМЕ PEAKFORCE QNM АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Для корректной обработки и интерпретации АСМ данных о свойствах клеток необходимо уметь находить и распознавать артефакты АСМ изображений. Под артефактами понимаются любые искажения АСМ кадров, несущие ложную информацию о свойствах объекта исследования. Обзор АСМ артефактов, встречающихся при изучении различных биологических объектов представлен в [140].

Для эффективного поиска и идентификации артефактов целесообразно использовать все каналы, доступные в PeakForce QNM. На практике при изучении нативных клеток на АСМ кадрах можно обнаружить разнообразные артефакты, которые условно можно классифицировать по источнику их происхождения: первая группа артефактов появляется из-за зонда, причиной второй группы можно считать образец, а третьи возникают из-за особенностей АСМ сканирования. Следует подчеркнуть, что такое деление не носит строгий характер, т.к. некоторые артефакты могут быть отнесены сразу в несколько групп. Рассмотрим подробнее каждую группу.

1. *Зонд как источник артефактов.* Характеристики модели или даже специфика конкретного АСМ зонда могут стать причиной возникновения артефактов АСМ изображений. Первым очевидным фактором, сказывающимся на АСМ измерениях, является снижение остроты кончика зонда. Причиной тому могут быть загрязнение зонда биологическим материалом или затупление острия из-за приложения чрезмерной силы на твердом образце (например, при калибровке). Иногда потеря остроты распознается по сниженной детализации АСМ изображений. Однако если сканирование клеток производится с относительно низким разрешением, то такой способ не будет эффективным. Загрязнение зонда мягкими биологическими фрагментами можно определить по изменению наклона контактной части силовых кривых на свободной от клеток подложке, увеличению адгезии между зондом и подложкой, сильным осцилляциям зонда из-за нестабильности контакта. При налипании на кантилевер крупного объекта могут возникнуть трудности с подведением зонда к образцу.

Не только кончик, но и вся форма зонда – индентора может вносить искажения в АСМ данные. При сильном уширении индентора к основанию в местах резких изменений высоты клетки кантилевер может перестать контактировать с образцом своим острием, вместо этого в соприкосновение с объектом исследования вступит боковая грань зонда. В этом случае также будет наблюдаться падение разрешения АСМ изображений, но уже не общее, а локальное (рисунок 2.10).

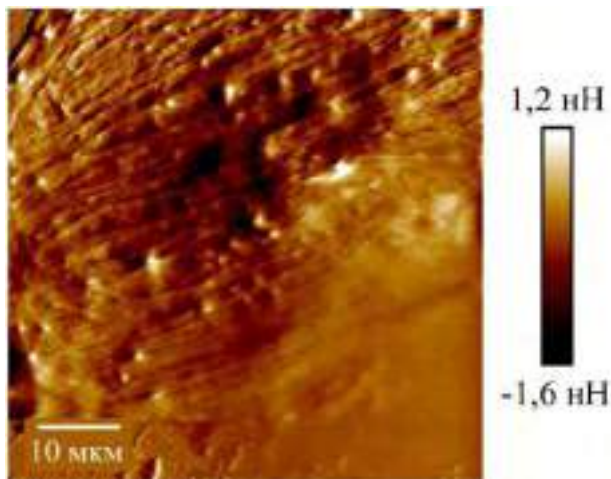


Рисунок 2.10 - АСМ изображение ошибки обратной связи эндотелиальной клетки. В правом нижнем углу наблюдается явное падение разрешения, которое вызвано недостаточно большим аспектным отношением иглы, пирамиды АСМ зонда.

Недостаточная длина иглы зондового датчика в зависимости от выбранного угла сканирования может привести к появлению на АСМ изображении топографии клеток мнимых выростов (рисунок 2.11 а) и плавных склонов (рисунок 2.11 б).

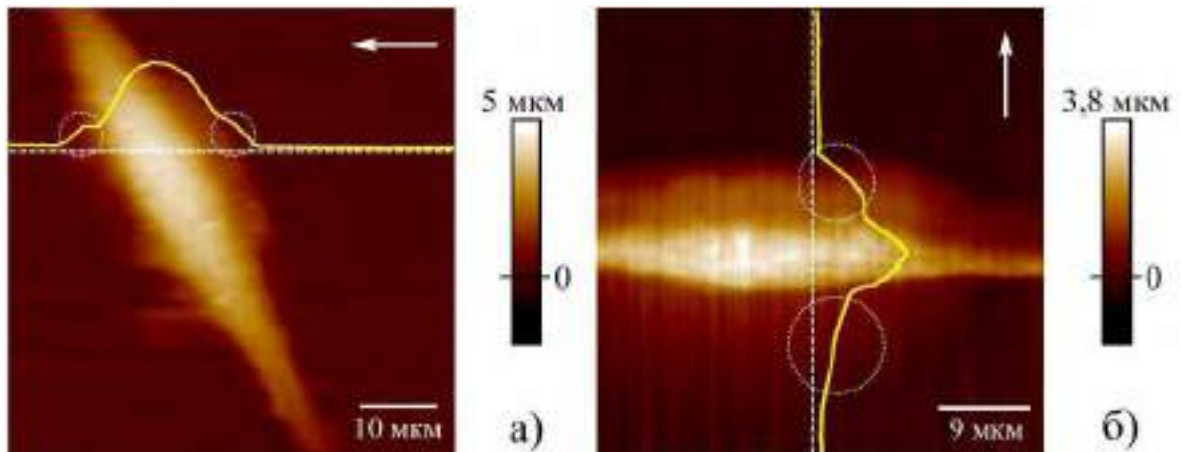


Рисунок 2.11 - АСМ топографии сенсорных нейронов с сечениями, отмеченными пунктирной прямой а) при сканировании перпендикулярно оси и б) параллельно оси кантилевера (окружностями показаны артефакты, вызванные недостаточной длиной иглы зондового датчика, стрелками обозначено направление сканирования).

2. *Образец как источник артефактов.* Часто особенности образца становятся причиной появления артефактов АСМ изображений. Клетка – нативный объект, который может изменять форму, двигаться, реагировать на внешние стимулы. Даже если при наблюдении в оптический микроскоп клетка никак заметно не изменяется, в ней непрерывно протекает множество сложных процессов, сопровождающих ее жизнедеятельность. Поэтому иногда при сканировании клетки изменяют свою форму, что неминуемо отражается на АСМ изображениях.

Нередко к поверхности клетки прилипают частицы из окружающей среды. Если такие частицы надежно прикреплены к клетке, то не мешают АСМ сканированию. Их лишь стоит избегать при дальнейшем анализе данных (рисунок 2.12). Слабо связанные, напротив, могут необратимо исказить силовые кривые. Результат необратимого искажения силовых кривых во время сканирования можно наблюдать в канале эффективного модуля Юнга на рисунке 2.13.

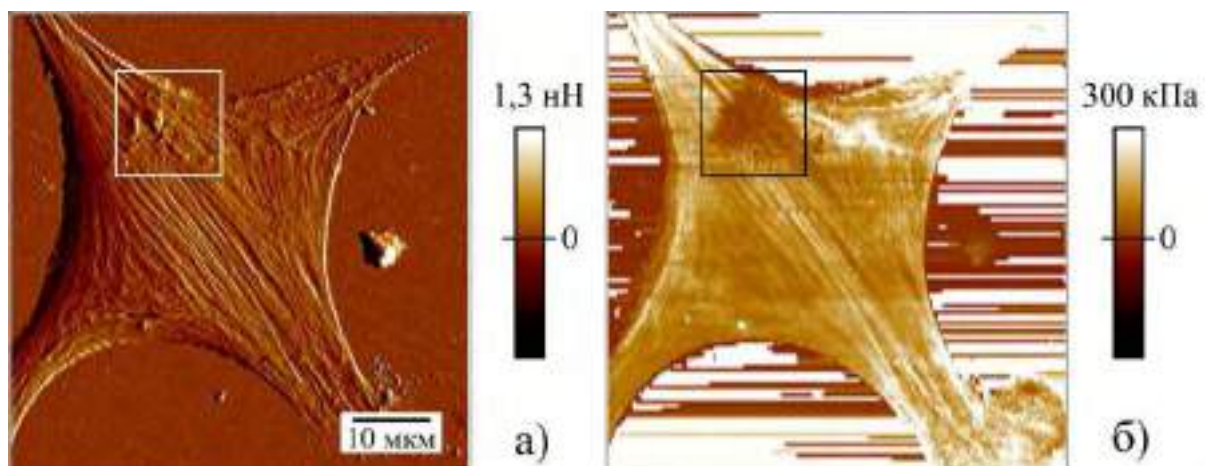


Рисунок 2.12 - АСМ изображения нативного фибробласта а) в канале ошибки обратной связи хорошо заметна область клетки, на которую налипли посторонние частицы (квадратное

выделение) б) на карте распределения эффективного модуля упругости эта область мягче по сравнению с окружающими частями клетки.

Некоторые типы клеток имеют тенденцию расплываться по подложке, в результате чего толщина их края может быть небольшой. Таким свойством обладает, например, сосудистый эндотелий. Его толщина уменьшается от ядра к периферии и на краю может спадать до сотни нанометров. При индентировании таких тонких слоев, существенный вклад в измеряемый эффективный модуль упругости может вносить жесткая подложка.

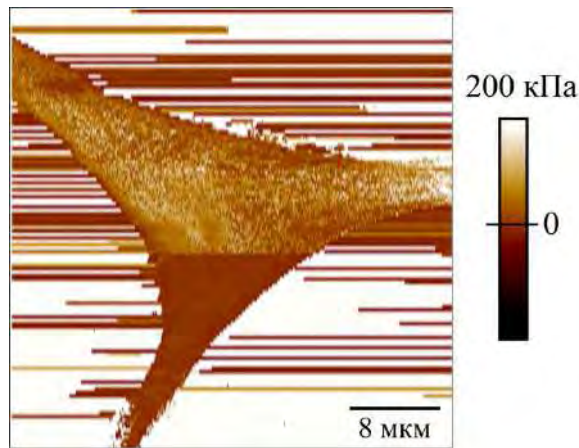


Рисунок 2.13 - АСМ карта распределения эффективного модуля Юнга по поверхности нативного фибробласта. Некорректное измерение в результате сбоя настройки силовых кривых.

В случае недостаточно надежного закрепления на подложке клетка может сдвигаться. Это бывает хорошо заметно по различному положению изучаемого объекта при одновременной регистрации прямого и обратного проходов зонда. Если наблюдается значительная разница в положении клетки в каналах прямого и обратного направлений сканирования, можно сделать вывод, что взаимодействие зонда с клеткой носило плохо контролируемый характер и такой объект лучше не анализировать.

3. Особенности сканирования как источник артефактов. Неоптимально подобранные параметры сканирования в PeakForce QNM или диапазон Z-сканера также могут привести к появлению артефактов на АСМ изображениях. Во-первых, недостаточное усиление петли обратной связи при сканировании высоких клеток приведет к возникновению "шлейфа", спадающего вдоль направления сканирования (рисунок 2.14 а). Во-вторых, резкое возрастание высоты объекта исследования приводит к большой ошибке в цепи обратной связи, и скачку силы, в частности, приводящему к некорректному измерению эффективного модуля Юнга. В-третьих, при неправильной настройке диапазона Z-сканера или при неточном подводе зонда к образцу верхняя часть высоких клеток может обрезаться. Такой артефакт несложно обнаружить по плоскому участку рельефа наиболее высокой части клетки в канале топографии (рисунок 2.14 б).

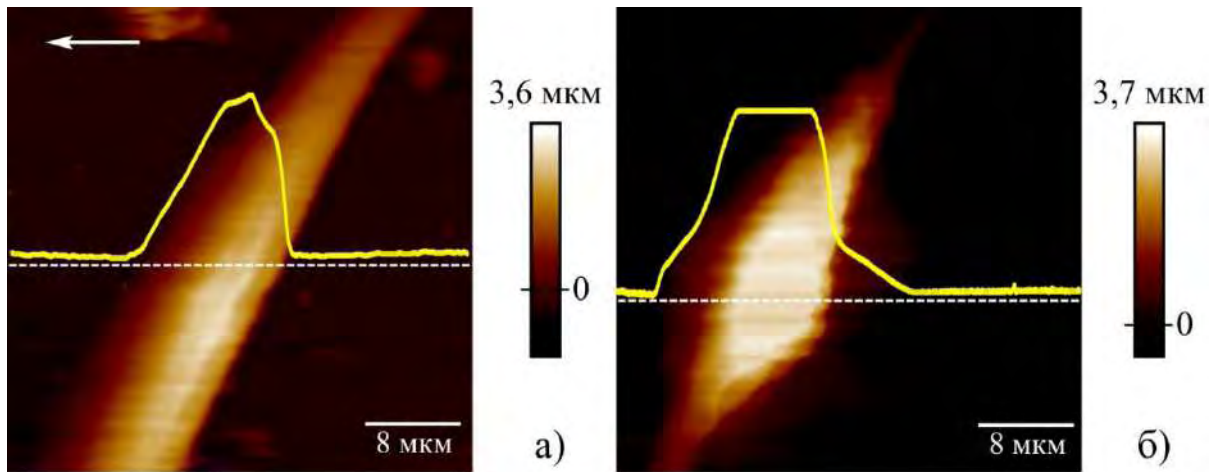


Рисунок 2.14 - АСМ топография и сечение, обозначенное пунктирной прямой, а) кардиомиоцита (из-за недостаточного усиления обратной связи наблюдается пологий склон при спуске с клетки) б) сенсорного нейрона (в области максимальной высоты клетки наблюдается срезание части данных).

Запаздывание обратной связи при подстройке расстояния зонд-образец может привести к появлению артефакта, показанного на рисунке 2.15 а. Обведенная область изображения демонстрирует завышенные значения эффективного модуля Юнга нативного фибробласта. Возникновение данного артефакта несложно объяснить, если рассмотреть сигнал ошибки обратной связи в интересующем месте (рисунок 2.15 б). При номинальной пиковой силе сканирования 3 нН на границе высокого ядра с более тонкой периферией фибробласта ошибка достигает значения -3 нН, что указывает на то, что зонд практически перестает деформировать клетку. Близкая к нулевой деформация приводит к шумам эффективного модуля Юнга, соизмеримых по амплитуде со значениями параметра на твердой подложке.

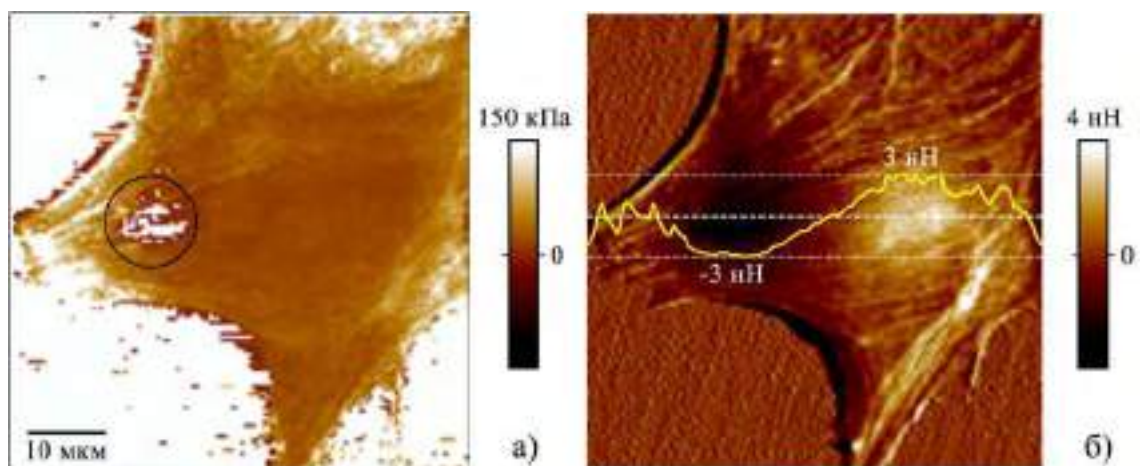


Рисунок 2.15 - АСМ изображения нативного фибробласта: а) карта эффективного модуля Юнга б) распределение сигнала ошибки обратной связи. Окружностью отмечена область с завышенными значениями эффективного модуля Юнга. Приведен профиль сигнала ошибки, полученный в месте, обозначенном белой штриховой линией.

Итак, в методической главе были рассмотрены основные компоненты атомно-силового микроскопа и принцип его работы. Приводятся особенности прибора Bruker BioScope Catalyst и квазистатического режима АСМ PeakForce QNM, применяемых в данной работе для исследования нативных клеток. В том числе дана информация о принципах измерения эффективного модуля Юнга в PeakForce QNM. Описана специфика выбора зондового датчика при изучении клеток и особенности пробоподготовки образцов с нативными клетками для АСМ исследования. Перечислены использованные для обработки и анализа АСМ данных программные пакеты. Отмечено, что полученные данные об эффективном модуле Юнга клеток и других характеристиках образца нужно анализировать, исключая из рассмотрения области с артефактами. В связи с этим, рассмотрены характерные артефакты в АСМ изображениях с клетками.

3. ПРИМЕНЕНИЕ КАНТИЛЕВЕРОВ С РАЗЛИЧНОЙ ФОРМОЙ КОНЧИКА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ УСТРОЙСТВА ПРИПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ НАТИВНЫХ КЛЕТОК

3.1 ИССЛЕДОВАНИЕ НАТИВНЫХ КЛЕТОК ЗОНДАМИ С РАЗНОЙ ГЕОМЕТРИЕЙ КОНЧИКА

Широко распространенный в АСМ исследованиях метод характеристики механических свойств клеток по значению модуля Юнга, определенному в соответствии с моделями контактной механики на основе теории Герца, носит неточный, приближенный характер. Это подтверждается литературными данными – значения модуля упругости клеток у разных авторов сильно расходятся. Более того, несогласованность модулей Юнга клеток проявляется при непосредственном сравнении результатов применения различных моделей для определения этого параметра [90, 141, 142].

Явным недостатком теории Герца применительно к клеткам можно считать допущение об однородности объекта исследования. Животная клетка гетерогенна, поэтому при АСМ измерении ее модуля Юнга значение параметра формируется из суммы вкладов отдельных составляющих элементов: гликокаликса, плазматической мембраны, цитоскелета, ядра, органелл. На практике на определяемый в АСМ модуль Юнга влияют не только механические характеристики клеточных компонентов, но и морфология исследуемого объекта, а также пространственное распределение внутриклеточных структур. Низкая точность моделей на основе теории Герца компенсируется их простотой, с которой, главным образом, и связано широкое применение таких моделей для анализа механических характеристик нативных клеток.

Два преобладающих варианта определения модуля упругости в АСМ – это индентирование острым кантилевером [132, 143] и зондирование образца микроразмерным шариком [86, 144]. В первом случае можно получить высокое разрешение при картировании модуля Юнга, но сильно меняющуюся площадь контакта, а во втором – наоборот, низкое разрешение при более постоянной площади соприкосновения. При использовании острого зонда немал риск повредить нативный объект из-за большого локального давления со стороны индентора на клетку, если приложенная сила окажется чрезмерной. В отличие от этого, кантилеверы с микронным шариком распределяют нагрузку по большой площади клеточной мембраны, поэтому вероятность повреждения нативного объекта резко снижается.

Разработанный недавно метод изготовления АСМ зондов с субмикронной сферической частицей позволяет получить кантилеверы, комбинирующие достоинства острых и сферических зондовых датчиков [130]. Сохраняя относительно высокое пространственное разрешение при картировании механических характеристик, такие зонды одновременно

снижают локальное давление на клетку. В отличие от стандартных острых зондов кантилеверы с субмикронной сферической частицей меньше подвержены затуплению, поэтому площадь контакта индентор-клетка – это более постоянная по сравнению с острыми зондами величина. Несмотря на явные преимущества, до сих пор субмикронные сферические зонды для изучения нативных клеток применялись мало [130]. Мы использовали стандартные острые, а также субмикронные сферические АСМ зонды для картирования локальных механических характеристик нативных фибробластов с целью сравнения эффективных модулей упругости клеток, получаемых в соответствии с моделями Снеддона (для конического индентора) и ДМТ (с индентором сферической формы).

Фибробласты (клетки соединительной ткани) – это весьма удобный для изучения с помощью АСМ тип клеток. Благодаря развитому цитоскелету нативные фибробласты выдерживают существенные нагрузки, что позволяет картировать их модуль упругости в Force Volume и даже визуализировать такие объекты в контактном режиме АСМ [132, 143]. Фибробласты надежно прикрепляются к подложке, способны прилипать даже к необработанному пластику [84, 143]. Кроме того, к достоинствам этих клеток для АСМ также можно отнести и форму, рельеф фибробластов: при осаждении на подложку клетки расплываются, но остаются достаточно высокими, их толщина от центра к периферии меняется плавно. Поэтому, можно ожидать, что твердая подложка не должна мешать корректному определению эффективного модуля Юнга этих клеток.

Фибробласты использовались в АСМ для исследования цитоскелета нативных клеток [143] – структуры, которая вносит определяющий вклад в механические характеристики данных объектов. Изучению индивидуальных вкладов отдельных компонентов цитоскелета в общие механические свойства клетки способствует применение специальных веществ, селективно действующих на архитектуру актиновых нитей, промежуточных (виментиновых) филаментов, а также тубулиновых микротрубочек.

В нашей работе ставилась задача на примере фибробласта изучить устройство нативной клетки как слоистой системы. Можно предположить, что внешние и внутренние слои фибробласта не различаются по жесткости, и зондирование клеток кантилеверами с разной геометрией кончика приведет к неодинаковому продавливанию объекта при соизмеримой силе воздействия за счет разного давления на клетку. Острый индентор должен сильнее деформировать образец, чем затупленный зонд с субмикронной сферической частицей, т.к. в этом случае сила сосредоточена на существенно меньшей площади мембраны. Учитывая данную гипотезу, интересно сравнить эффективные модули Юнга фибробластов при измерении острыми и затупленными зондами. В связи с этим, мы, используя режим картирования механических свойств PeakForce QNM, проводим сравнительный анализ результатов АСМ

измерения механических характеристик клеток посредством стандартных острых зондов и кантилеверов с приклеенной субмикронной сферической частицей. Следует отметить, что в нашей работе сравниваются результаты быстрого индентирования (время $\sim 10^{-3}$ с, скорость ~ 1 мм/с) нативных фибробластов зондами с разной геометрией кончика размером < 1 мкм, что ранее не проводилось.

3.2 ПРОБОПОДГОТОВКА НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ИХ ЗОНДИРОВАНИЮ

В качестве объектов изучения были выбраны нативные фибробласты сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов. Сердечные фибробласты синтезируют в сердце компоненты межклеточного матрикса, за счет чего позволяют сохранять структурную целостность органа, поддерживать его правильную форму [145].

Фрагменты сердца механически измельчали до кусочков размером $1\text{--}3$ мм³ и проводили ферментативную обработку в 0,125% растворе трипсина (Sigma, США) в течение одной минуты, затем кусочки тщательно дважды промывали в растворе Хенкса. Механическую диссоциацию производили путем пипетирования при 4°C. Суспензия клеток помещалась в предварительно обработанные коллагеном полистироловые чашки Петри с питательной средой следующего состава: 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла, 10% фетальной сыворотки коровы с добавлением 0,5 ЕД/мл инсулина, 0,6% глюкозы, 2 мМ глутамина и 100 ЕД/мл гентамицина. Полученные фибробласты культивировали в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37°C и 5% CO₂ в течение 5-ти суток. В части экспериментов в культуральную среду добавляли коленовую кислоту в концентрации 10^{-6} М. Контрольные фибробласты культивировали в условиях питательной среды стандартного содержания. В результате проведенных АСМ исследований, отличий между двумя группами клеток – с добавлением указанной субстанции и контрольной – обнаружено не было. Поэтому группы считались одинаковыми, в связи с чем АСМ данные были объединены в одну выборку.

Для сканирования нативных фибробластов в режиме АСМ PeakForce QNM использовали стандартные острые (с номинальным радиусом закругления кончика $R \leq 12$ нм) Bruker SNL-(D) (рисунок 3.1 а), а также субмикронные сферические (с SiO₂ сферической частицей радиусом $R = 325$ нм) зонды NT-MDT CSG10 (рисунок 3.1 б) [130]. Жесткость кантилеверов калибровалась перед сканированием клеток методом тепловых шумов.

Расчет эффективного модуля Юнга фибробластов при АСМ сканировании острыми зондами производился в штатной программе управления атомно-силовым микроскопом Bruker BioScope Catalyst согласно модели Снеддона (форма индентора аппроксимировалась конусом с

углом раствора 36°), а при использовании субмикронных сферических кантилеверов эффективный модуль упругости вычислялся по модели ДМТ (сферическая форма индентора).

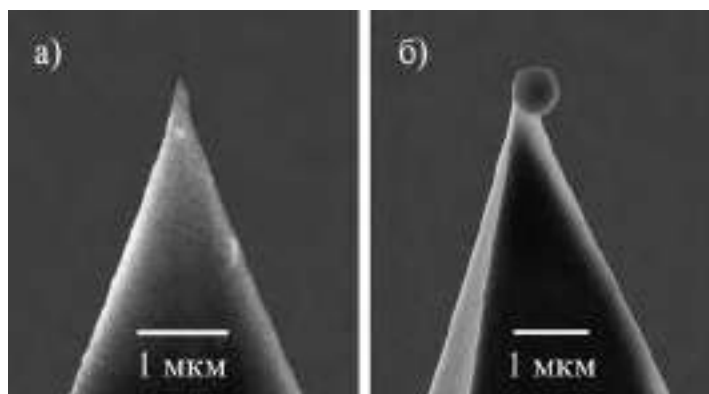


Рисунок - 3.1 СЭМ изображения а) стандартного острого зонда, б) зонда со сферической частицей 325 нм радиуса.

Для АСМ изучения выбирались надежно прикрепленные к подложке фибробласты без видимых в оптический микроскоп признаков загрязнения мембраны. АСМ визуализации подвергались различные по форме клетки: некоторые фибробласты были поляризованы (с псевдоподиями на одном или двух полюсах) [146], другие же находились на подложке в распластанном состоянии (имели множество псевдоподий по периметру).

АСМ сканирование нативных фибробластов осуществлялось в питательной среде с частотой строчной развертки 0,1 Гц, клетки зондировались в каждой точке с частотой 250 Гц и амплитудой (Peak Force Amplitude) 1 мкм. Пиковая сила была установлена на уровне 3,0 нН и 2,5 нН при применении острых и субмикронных сферических зондов соответственно. Число строк в АСМ кадре было выбрано равным 128. В результате, время получения одного кадра с клетками составляло ≈ 20 минут. Как правило, за данный период не обнаруживалось видимых в оптический микроскоп изменений формы клеток или повреждения исследуемых объектов в результате их АСМ зондирования. Обычно длительность АСМ экспериментов с нативными фибробластами не превышала 3 часа. Образец не был изолирован от внешней среды, и временное ограничение было введено, чтобы исключить слишком сильный рост концентрации веществ питательной среды вследствие испарения.

При обработке полученных АСМ данных в NanoScope Analysis 1.50 устранялись строчные артефакты изображений. Программный пакет Gwyddion 2.44 использовался для расчета локальной жесткости фибробластов, а также экспортирования данных о характеристиках клеток в численном виде для дальнейшей обработки в программах OriginPro 2015 и Excel 2007. Вычисление контактной жесткости клеток осуществлялось путем сложения номинальной пиковой силы с АСМ каналом сигнала ошибки обратной связи и последующим делением полученной суммы на карту деформации. Участки АСМ кадров с артефактами исключались из

последующего рассмотрения. В рамках исследования анализировались АСМ изображения топографии, эффективного модуля Юнга, деформации фибробластов. По АСМ топографиям определялись максимальные высоты клеток, а по картам эффективного модуля Юнга и деформации – средние и медианные значения соответствующих параметров.

Автор признателен сотруднице лаборатории физиологии возбудимых мембран ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН с.н.с., к.б.н. Валентине Альбертовне Пеннийнен за подготовку образцов с нативными фибробластами.

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ЗОНДИРОВАНИЯ НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КАНТИЛЕВЕРАМИ С РАЗНОЙ ГЕОМЕТРИЕЙ КОНЧИКА

В отличие от результатов работ [132, 147], мы не обнаружили явной разницы между ригидностями ядерной и дистальной областей нативных фибробластов. «Почувствовать» разницу в модуле Юнга ядра и периферии мешала развитость цитоскелета этих клеток. В наших экспериментах фибробласты часто демонстрировали значительную неоднородность модуля упругости, связанную с наличием крупных элементов цитоскелета, которые проявляли повышенный эффективный модуль Юнга. Сильная гетерогенность локального модуля упругости нативных фибробластов наблюдалась ранее и другими авторами [148, 149]. Например, в [132] модуль Юнга в зависимости от области клетки мог изменяться на два порядка.

Проведенные нами эксперименты показали, что механические характеристики фибробластов в популяции отличаются разнообразием. Распределение фибриллярных структур под мембраной существенно варьировалось от клетки к клетке, что особенно отчетливо проявлялось на АСМ картах эффективного модуля Юнга фибробластов, полученных с помощью острого зондового датчика. У части фибробластов наблюдалось относительно равномерное распределение эффективного модуля упругости (рисунок 3.2 а), другие же демонстрировали различные особенности: крупные параллельные фибриллы вдоль длинной оси клетки (рисунок 3.2 б), сетчатую структуру цитоскелета (рисунок 3.2 в), локальное упрочнение в области максимальной концентрации цитоскелетных составляющих (рисунок 3.2 г). Разнообразие форм фибробластов и распределения жестких белковых волокон можно объяснить высокой подвижностью данного типа клеток, обеспечиваемой динамическими перестройками их цитоскелета. Так, в [148] приводятся данные о различиях в локальной жесткости у статичных и движущихся фибробластов.

Согласно [143] наблюдаемые при АСМ картировании крупные и жесткие элементы цитоскелета клеток соответствуют актиновым стресс-фибриллам. Стресс-фибриллы

представляют собой пучки актиновых волокон, скрепленных вместе молекулами миозина. Данные наших измерений на рисунке 3.1 в,г показывают, что самые жесткие области фибробластов соотносятся с местами соединения или наложения крупных стресс-фибрилл. Определить точно характер взаимодействия стресс-фибрилл между собой и их трехмерную архитектуру по АСМ изображениям представляется сложным, т.к. карты эффективного модуля упругости не позволяют оценить глубину локализации цитоскелетных структур под мембраной клетки. Тем не менее, фибробласты с локальными сосредоточениями жестких фибрилл, определяющимися на АСМ картах эффективного модуля Юнга, демонстрируют наибольший перепад значений данного параметра по поверхности клетки.

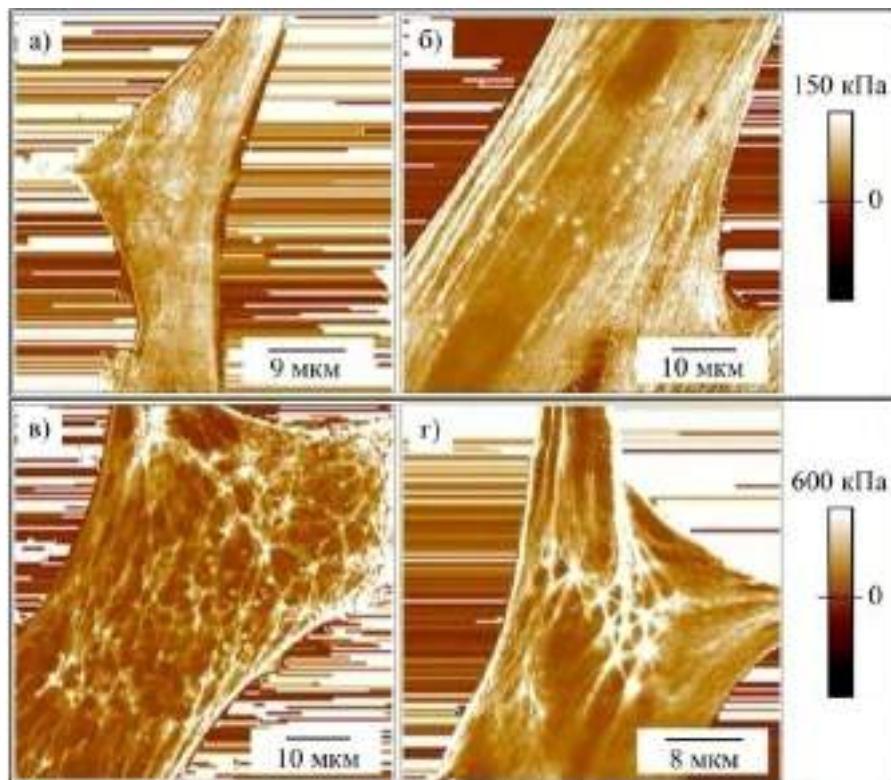


Рисунок 3.2 - АСМ карты распределения эффективного модуля Юнга фибробластов, полученные острым АСМ зондом и демонстрирующие разнообразие архитектуры цитоскелета под мембраной клеток.

Закономерно, применение острых зондов, по сравнению с субмикронными сферическими, обеспечивает картирование эффективного модуля Юнга с более высоким пространственным разрешением (рисунок 3.3 а). Тем не менее, следует отметить, что и затупленные зонды позволяли различать отдельные крупные фибриллы (рисунок 3.3 б). При индентировании более тупым сферическим зондом разброс значений эффективного модуля Юнга был существенно меньше по сравнению со случаем использования острого кантилевера. В этой связи, можно сделать вывод, что сферический зонд выступает в роли своеобразного фильтра, удаляющего крайние значения эффективного модуля упругости и, по сути, производит усреднение.

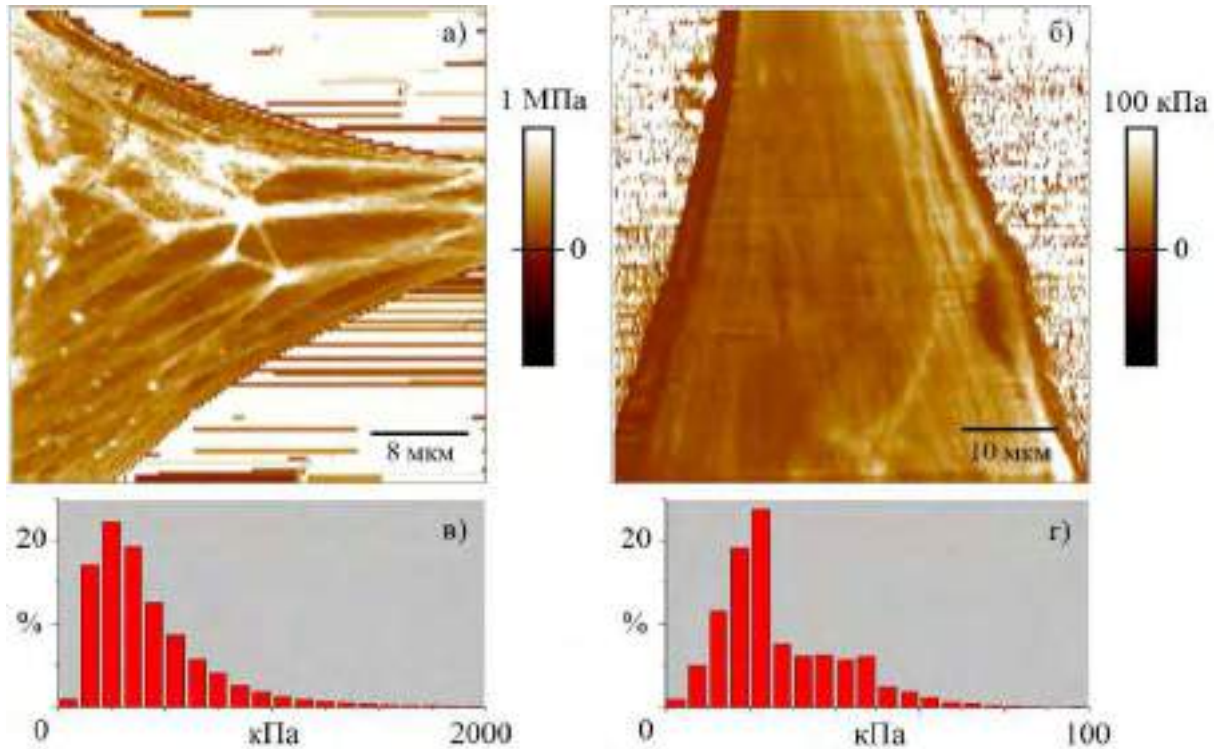


Рисунок 3.3 - а,б) АСМ карты эффективного модуля Юнга, полученные с помощью стандартного острого и субмикронного сферического зондов соответственно; в,г) гистограммы распределения эффективного модуля Юнга по поверхности фибробластов с а,б).

На рисунке 3.3 в,г видно, что распределения эффективного модуля Юнга по фибробластам асимметричны, поэтому мы характеризовали клетки не только средними, но и медианными значениями данного параметра. Далее в тексте результаты статистического анализа приводятся в виде средних значений эффективного модуля Юнга, соответствующие медианы указываются в скобках.

Эффективный модуль Юнга нативных фибробластов по АСМ картам определялся по полной площади клетки в кадре за исключением краев, где зонд мог взаимодействовать с объектом не кончиком, а боковой гранью. Чтобы избежать возможных нарушений условия предельной деформации [68], при расчете использовались поправочные коэффициенты, позволяющие учесть малую толщину объекта исследования [150, 151]. Вычисление эффективного модуля Юнга фибробластов E при зондировании клеток острым индентором производилось в соответствии со следующим выражением:

$$F_s = \frac{8Etg\alpha\delta^2}{3\pi} \left\{ 1 + 1,7795 \frac{2tg\alpha}{\pi^2} \frac{\delta}{h} + 16(1,7795)^2 tg^2\alpha \frac{\delta^2}{h^2} + O\left(\frac{\delta^3}{h^3}\right) \right\} \quad (3.1)$$

где F_s – сила взаимодействия, α – половинный угол раствора конического зонда, δ – деформация, h – локальная высота (применимость: при $\delta < 80\%$ от h). А при использовании

субмикронных сферических зондов расчет эффективного модуля упругости клеток осуществлялся по другому выражению:

$$F_{DMT} = \frac{16E}{9} \sqrt{R\delta}^{3/2} (1 + 1,133\chi + 1,283\chi^2 + 0,769\chi^3 + 0,0975\chi^4) \quad (3.2)$$

где

$$\chi = \frac{\sqrt{R\delta}}{h} \quad (3.3)$$

а F_{DMT} – сила взаимодействия, R – радиус закругления кончика зонда (применимость: при $0,1R < h < 12,8R$).

Скорректированные значения эффективного модуля Юнга фибробластов составили 200 ± 180 кПа (170 ± 160 кПа) (количество измеренных клеток, $n = 97$) при зондировании острым кантилевером и 40 ± 20 кПа (40 ± 10 кПа) ($n = 23$) при индентировании субмикронным сферическим зондом. Таким образом, соотношение $E_S/E_{DMT} \approx 5$.

Интересно, что такая существенная разница значений эффективного модуля Юнга не сопровождается столь же значительным расхождением деформаций фибробластов: в экспериментах по индентированию клеток острыми зондами с пиковой силой $3,0$ нН индентация составила 200 ± 70 нм (200 ± 70 нм) ($n = 112$), а при сканировании субмикронными сферическими зондами с номинальной пиковой силой $2,5$ нН – 160 ± 50 нм (160 ± 50 нм) ($n = 24$). Из приведенных данных следует, что наблюдаемое расхождение деформаций фибробластов при зондировании острыми и сферическими зондовыми датчиками связано с небольшим различием в пиковых силах. Действительно, расчет средней контактной жесткости дал практически одинаковые значения – 18 ± 7 мН/м ($n = 118$) и 18 ± 4 мН/м ($n = 22$) – для острого и сферического инденторов соответственно. Средние жесткости совпадают, поэтому при равных пиковых силах не будут различаться и средние деформации клеток.

Совпадение жесткостей в принципе может отражать то, что острые и затупленные зонды индентировали разные по глубине слои фибробластов. Однако при анализе максимальных высот по АСМ изображениям топографии не было выявлено различий в средних значениях данных параметров у клеток, сканированных зондами с разной формой кончика. При зондировании острым индентором средняя максимальная высота составила $1,7 \pm 0,5$ мкм ($n = 112$), а при использовании коллоидных зондов – $1,7 \pm 0,4$ мкм ($n = 24$).

Примеры АСМ изображений рельефа нативных фибробластов, полученные инденторами с различной геометрией кончика показаны на рисунке 3.4 а,б. Вставки на данных изображениях соответствуют поперечным сечениям, отмеченным линиями белого цвета на топографиях. Видно, что максимальные высоты представленных на рисунке 3.4 а,б фибробластов

практически равны. При рассмотрении соответствующих АСМ карт деформации этих фибробластов (рисунок 3.4 в,г) оказывается, что гистограммы деформации клетки близки по таким параметрам, как положение максимума и ширина. Глубина индентирования фибробласта на рисунке 3.4 а при сканировании стандартным острым зондом равна 110 ± 50 нм (100 нм), что соответствует значениям эффективного модуля Юнга 840 ± 970 кПа (570 кПа), рассчитанным по модели Снеддона для индентора конической формы с углом раствора $2\alpha = 36^\circ$. Статистический анализ АСМ данных фибробласта, зондированного субмикронным сферическим кантилевером, на рисунке 3.4 г, дает деформацию 160 ± 50 нм (160 нм). При такой величине деформации, если в штатной программе обработки индентационных кривых использовать модель ДМТ для сферического индентора с $R = 325$ нм, эффективный модуль Юнга составит 40 ± 20 кПа (40 кПа). Таким образом, в приведенном примере у фибробластов, индентированных зондами с разной формой острия, при несовпадении средней деформации лишь в $\approx 1,5$ раза, получается, что рассчитанный по моделям Снеддона и ДМТ средний эффективный модуль Юнга различается более чем в 20 раз.

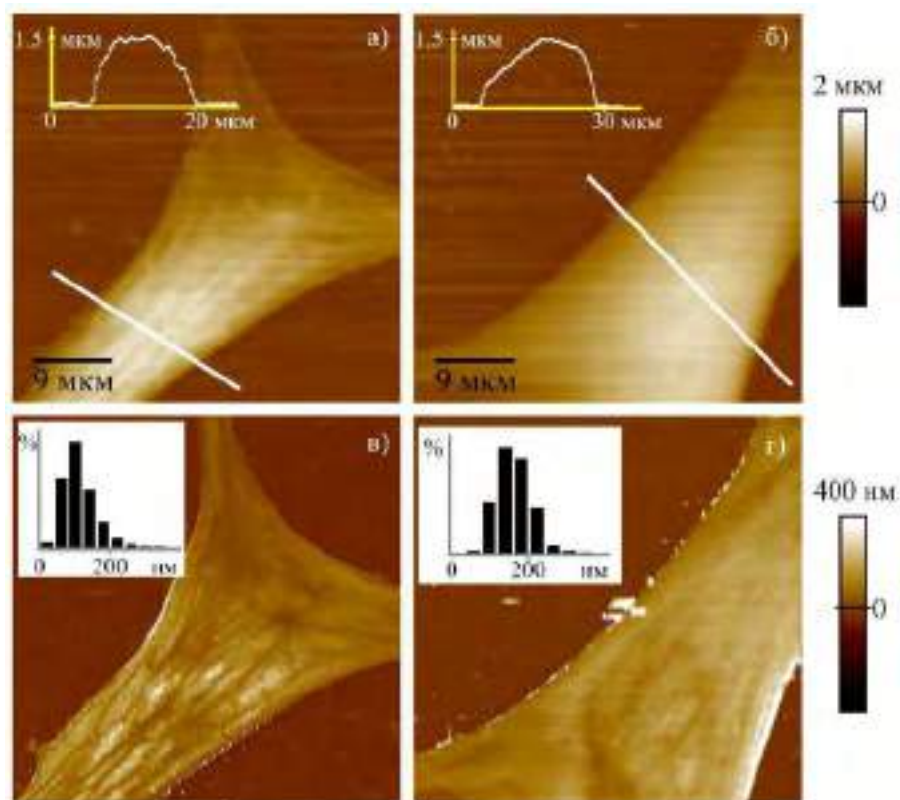


Рисунок 3.4 - АСМ изображения а,б) топографии поверхности нативных фибробластов с профилями максимальной высоты при сканировании острым и субмикронным сферическим зондами соответственно в,г) деформации с гистограммами распределения по поверхностям клеток а,б.

3.4 ВЫВОДЫ ОБ УСТРОЙСТВЕ НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ДАННЫХ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Проведенный анализ данных АСМ зондирования нативных фибробластов стандартными острыми и субмикронными сферическими зондами показал, что средние эффективные модули Юнга клеток, определенные в соответствии с моделями Снеддона и ДМТ, существенно различаются. При индентировании объектов острыми кантилеверами эффективный модуль упругости составил 200 ± 180 кПа, а использование коллоидных зондов привело к получению существенно меньшего значения – 40 ± 20 кПа. Такой результат позволяет сделать вывод, что расчет эффективного модуля Юнга нативных фибробластов по моделям Снеддона и ДМТ привел к получению неверных результатов.

Однако средние локальные жесткости оказались одинаковыми в обоих случаях: 18 ± 7 мН/м и 18 ± 4 мН/м (для острого и сферического инденторов соответственно). Индентирование фибробластов кантилеверами с различной геометрией кончика с равной нагрузкой должно привести к получению, в среднем, сходных величин деформации клеток.

Рассмотрим стандартные зависимости силы F от индентации δ для моделей Снеддона и ДМТ:

$$F_S = \frac{2}{\pi} \operatorname{tg} \alpha \frac{E_S}{(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (3.4)$$

$$F_{DMT} = \frac{4}{3} \sqrt{R} \frac{E_{DMT}}{(1-\nu^2)} \delta^{3/2} + F_{adh} \quad (3.5)$$

где F_S, F_{DMT} и E_S, E_{DMT} – силы взаимодействия зонд-образец и величины модуля Юнга в моделях Снеддона и ДМТ соответственно, F_{adh} – сила адгезии, (прилипание), ν – коэффициент Пуассона образца. При равной деформации можно получить следующее соотношение между модулями упругости, найденными по двум моделям:

$$\frac{E_S}{E_{DMT}} = \frac{2\pi}{3 \operatorname{tg} \alpha} \sqrt{\frac{R}{\delta}} \quad (3.6)$$

Если подставить использованные в наших экспериментах значения параметров $\alpha = 18^\circ$, $R = 325$ нм, а δ взять равным 200 нм (средняя деформация острым зондом), то отношение $E_S/E_{DMT} \approx 8$. Аналогичное соотношение, вычисленное в результате программной обработки силовых кривых, было несколько меньше, ≈ 5 . Теоретическая оценка и экспериментальное значение E_S/E_{DMT} несколько различаются, но следует учитывать существенный разброс экспериментальных значений эффективного модуля Юнга. Можно объяснить полученную разницу также тем, что в модели Снеддона для извлечения модуля упругости штатная

программа Nanoscope Analysis использует кривую подвода, а в ДМТ модели – кривую отвода. Т.к. на мягких клетках часто наблюдается гистерезис силовых кривых, использование для расчета эффективного модуля Юнга кривых неодинакового типа (подвода и отвода) может привести к наблюдаемому расхождению.

Полученные в экспериментах значения эффективного модуля упругости стоит сравнить с имеющимися в литературе данными об АСМ измерениях модуля Юнга нативных фибробластов. В [132] при зондировании острым кантилевером значения модуля Юнга находились в диапазоне 4–100 кПа. Также оцененный с помощью острого зонда в [84] модуль упругости фибробластов на полистироловой подложке составил $17,8 \pm 1,4$ кПа. Значение $2,55 \pm 0,99$ кПа было получено при помощи острого зонда в [85]. В [86] медианное значение модуля Юнга нативных фибробластов при индентировании 10 мкм сферической частицей равнялось $1,13 \pm 0,19$ кПа. Измерение фибробласта зондом с шариком диаметром 5 мкм в [147] привело к получению распределения модуля Юнга клетки с максимумом ≈ 10 кПа. В [106] с помощью 9 мкм сферических зондов модули упругости нескольких типов фибробластов находились в диапазоне ≈ 1 –2 кПа. Таким образом, согласно проанализированным источникам, измеренный посредством АСМ средний модуль Юнга нативных фибробластов составляет единицы-десятки килопаскалей.

Извлеченный нами эффективный модуль упругости фибробластов оказался выше, чем в литературных источниках. Завышенные значения эффективного модуля Юнга в наших экспериментах могут быть связаны с высокой частотой зондирования. При соизмеримых с нашими амплитудах вертикальных осцилляций зонда, индентация в работах других авторов, как правило, производилась с частотами на уровне единиц Герц. В то время как в режиме АСМ PeakForce QNM, который использовали мы, частота вертикальных осцилляций зонда была на два порядка больше. Особенно ярко проявляется различие наших и литературных данных при измерении стандартными острыми зондами. Ранее в литературе уже отмечался эффект завышения модуля Юнга нативных клеток при индентировании зондами с острой геометрией кончика [152]. Поэтому многие авторы считают использование зондов сферической формы при изучении нативных клеток предпочтительным [86, 144, 153]. В измерениях зондами с субмикронными шариками значения эффективного модуля Юнга были больше, чем литературные, полученные в результате индентирования относительно крупными микроразмерными частицами. В этом случае завышение значений эффективного модуля упругости может быть связано с тем, что нарушается условие применимости модели ДМТ, согласно которому радиус закругления кончика зонда R должен быть существенно больше, чем величина деформации δ . В наших экспериментах значения параметров были соизмеримы ($R \sim \delta$). Анализируя расхождения наших и литературных модулей Юнга нативных

фибробластов, не стоит также игнорировать данные о том, что свойства этих клеток могут различаться в зависимости от типа фибробластов [143].

В любом случае, проведенное нами сравнение данных индентирования нативных фибробластов стандартными острыми и коллоидными зондами показало, что эффективные модули Юнга сильно различаются при одинаковой контактной жесткости клеток. Этот результат свидетельствует о некорректности примененных для определения эффективного модуля Юнга нативных фибробластов в режиме PeakForce QNM моделей Снеддона и ДМТ. В наших экспериментах локальная жесткость более адекватно описывала механические свойства этих клеток.

Выдвинутая нами ранее гипотеза о слоистом устройстве фибробластов со слоями одинаковой жесткости не подтвердилась в проведенных экспериментах. При одинаковой жесткости слоев, деформации, сообщенные клеткам зондами с различной остротой, должны были различаться. У нас же индентирование фибробластов стандартными острыми зондами и кантилеверами со сферической частицей 325 нм радиуса приводило к получению близких средних деформаций.

Если предположить, что внешние слои фибробласта существенно мягче внутренних и, в отличие от сферического, острый зонд их «не чувствует», то в измерениях сферическим зондом клетки должны казаться выше. Однако анализ АСМ топографий показал, что средние максимальные высоты фибробластов равны $1,7 \pm 0,5$ мкм (при измерении острым зондом) и $1,7 \pm 0,4$ мкм (сферический зонд), т.е. клетки равновысокие.

Полученный результат независимости контактной жесткости фибробласта от остроты индентора можно объяснить, рассматривая внешние слои этих клеток как жесткую оболочку, глубина продавливания которой определяется только величиной приложенной силы. Локальная жесткость такой оболочки может определяться такими ее параметрами как модуль Юнга, толщина, а также характерный размер ячеек, сформированных в результате подпирания оболочки сеткой цитоскелета.

Можно оценить жесткость ячейки по формуле для слабого изгиба пластинки сосредоточенной силой [154]:

$$k = \frac{F}{\delta} \sim Eh^3 a^{-2} \quad (3.7)$$

где E – модуль упругости, h и a – соответственно толщина и линейный размер пластинки. Для оценки подставим $k = 18$ мН/м, $a \sim 1$ мкм и $h \approx 200$ нм. Тогда модуль Юнга $E \sim 1$ МПа. Это значение характеризует интегральный модуль Юнга плазматической мембраны и кортикального слоя фибробластов. Полученное выражение полезно при анализе АСМ данных. Оно прогнозирует увеличение контактной жесткости на клетках с более развитым

цитоскелетом. Такое увеличение наблюдалось в наших экспериментах (например, на рисунке 3.2 г у клетки с хорошо проявленным цитоскелетом эффективный модуль Юнга в несколько раз больше, чем у клетки на рисунке 3.2 а).

Многие авторы подчеркивают важную роль цитоскелета в механических характеристиках клеток [132, 143]. Цитоскелет – это активно изменяющаяся трехмерная белковая структура, ответственная за поддержание формы клеток, их движение, деление, играющая важную роль во внутриклеточном транспорте, участвующая в трансдукции сигналов, реакции на внешние силы [86, 155]. Вклад отдельных компонентов цитоскелета (микрофиламентов, микротрубочек и промежуточных филаментов) в общий модуль упругости фибробластов подвергся анализу в работах [85, 132, 143]. В результате был сделан вывод, что актиновая сеть и промежуточные филаменты вносят значительный вклад в модуль Юнга клеток, а микротрубочки существенно не влияют на данный параметр.

Идея о слоистом устройстве клеток не нова. В [156] клетки рассматриваются как слоистые структуры, и отмечается, что помимо других цитоскелетных компонентов микротрубочки также могут влиять на измеряемый модуль Юнга, но при больших глубинах индентирования, т.к. слой с микротрубочками в клетке находится глубже актинового слоя. Модель клетки в виде слоистой структуры легла в основу так называемой, жесткостной томографии (stiffness tomography) [157]. Фактически суть метода заключается в дифференциальном рассмотрении контактной части силовой кривой АСМ, т.е. в ее разбиении на отрезки и определении модуля Юнга для каждого отрезка в отдельности. Такой подход должен позволить учесть сложную архитектуру клетки, а корректная интерпретация данных даст возможность получить информацию о механических характеристиках клетки на различной глубине индентации.

В работе [144] сообщается, что влияние на измеряемый с помощью АСМ модуль упругости может оказывать внешний слой клетки, окружающий клеточную мембрану эукариотических клеток. Этот слой состоит, в основном, из микроворсинок, ресничек и гликокаликса. Особо подчеркивается, что у некоторых клеток, в частности, фибробластов при определенных условиях (при добавлении сыворотки) гликокаликс может сильно разрастаться.

В пользу того, что клетку можно рассматривать как совокупность нескольких слоев выступает также факт, что актиновые филаменты непосредственно под плазматической мембраной образуют плотную сеть с размером ячейки от 20 до 250 нм, которую называют кортикальным слоем [155]. Кортикальный слой представляет собой своего рода оболочку для внутреннего содержимого клетки и играет роль каркаса для билипидной мембраны (рисунок 3.5 а). На рисунке 3.5 б показаны изображения двух типов человеческих эндотелиальных клеток – из пупочной вены (HUVEC) и из внутренней стенки канала Шлемма (SC CELL), окрашенных на фибриллярный актин [90]. На изображениях видно, что вдоль

границ клеток наблюдается повышенная концентрация актина. Насыщенный актином слой и есть кортикальный. Кортикальный слой у животных клеток служит аналогом клеточной стенки прокариот, но располагается не снаружи, а внутри клеток. Основным компонентом кортикального слоя является актин. Актиновые фибриллы толщиной около 8 нм [1] вместе с миозиновыми моторными молекулами и белками, сшивающими актин, образуют связанную с мембраной сеть, которая не только позволяет поддерживать форму, но и дает возможность клеткам перемещаться за счет динамических преобразований кортикального слоя.

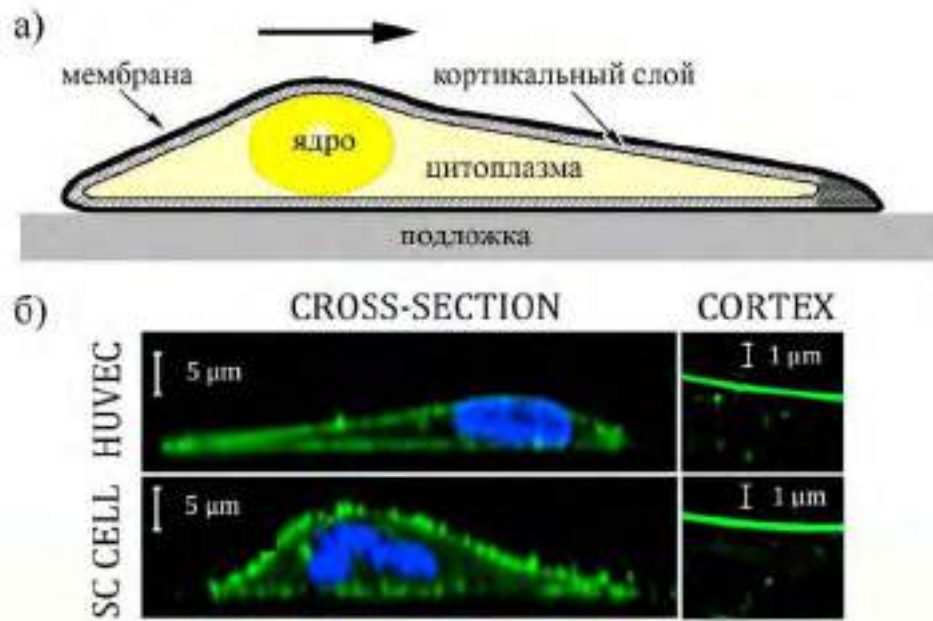


Рисунок 3.5 - а) схематичное изображение перемещающейся по подложке клетки (направление движения показано стрелкой сверху) б) изображения двух типов эндотелиальных клеток, полученные с помощью конфокального микроскопа. Флуоресцентными веществами помечены фибриллярный актин (зеленый) и ядро (синий), также справа приведены изображения микроскопии высокого разрешения (structured illumination microscopy), демонстрирующие высокую концентрацию актина непосредственно под мембраной клеток [90].

Толщина кортикального слоя по порядку величины составляет сотни нанометров [90, 158]. В АСМ экспериментах по зондированию клеток для минимизации возможного эффекта твердой подложки [68] при измерении модуля упругости, как правило, стараются снизить силу воздействия. В результате величина деформации клетки также не превышает нескольких сотен нанометров. Поэтому, если клетка имеет достаточную высоту, более глубокие клеточные структуры, такие как микротрубочки, промежуточные филаменты, ядро и органеллы должны оставаться вне зоны досягаемости АСМ зонда. В нашем случае средняя деформация нативных фибробластов не превышала ≈ 200 нм, поэтому можно считать, что в зону индентирования зонда, в основном, попадали гликокаликс, плазматическая мембрана и

кортикальный слой. На АСМ картах фибробластов мы часто визуализировали крупные фибриллярные структуры, соответствующие актиновым стресс-фибриллам. Именно эти структуры отвечали за наиболее жесткие области клетки. Таким образом, выявленный в результате наших экспериментов внешний слой нативных фибробластов с повышенной по сравнению с внутренними слоями жесткостью (жесткая оболочка) может включать окруженную гликокаликсом плазматическую мембрану, а также примыкающий к ней кортикальный слой с актиновыми стресс-фибриллами. Кортикальный слой, вероятно, вносит наибольший вклад в эффективный модуль Юнга клетки.

Кортикальный слой постоянно претерпевает реорганизацию. В связи с этим, следует отметить, что при долговременной деформации (> 1 мин) кортикальный слой ведет себя как вязкая жидкость, а при малых временах (меньших, чем время перестройки) он подобен упругому твердому телу [155]. При индентировании клеток в режиме PeakForce QNM регистрация одной кривой «пульс» занимает 0,004 с. Лишь часть данного временного периода АСМ зонд находится в контакте с клеткой, деформируя ее. Исходя из этого, можно сделать вывод, что в нашем случае кортикальный слой должен проявлять свойства упругого тела.

С помощью режима PeakForce QNM АСМ были исследованы нативные фибробласты сердечной ткани куриных эмбрионов на коллагеновой подложке. Установлено, что рассчитанные по АСМ данным значения эффективного модуля Юнга клеток недостаточно адекватно описывают механические свойства данных объектов. Поэтому в качестве параметра для количественного анализа использованы значения контактной жесткости. Зондирование стандартными острыми зондами и зондами со сферической коллоидной гранулой, радиусом 325 нм, привело к получению одинаковых средних значений контактной жесткости фибробластов. В связи с этим, можно сделать вывод, что жесткость биомеханической системы: «зонд атомно-силового микроскопа – нативный объект (фибробласт куриного эмбриона в жидкой питательной среде) – коллагеновая подложка» не зависит от размеров вершины зонда, если радиус ее кривизны порядка или менее 100 нм, а время индентирования составляет $\sim 10^{-3}$ с.

Полученный результат можно объяснить тем, что внешние слои фибробласта, включающие гликокаликс, плазматическую мембрану, кортикальный слой ведут себя как жесткая по отношению к цитоплазме оболочка, на величину деформации которой влияет амплитуда пиковой силы, но не размеры кончика зонда. Представленный подход по АСМ исследованию механических свойств фибробластов можно использовать для выявления особенностей устройства приповерхностного слоя нативных клеток.

4. ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

4.1 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ И ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

Трудно переоценить степень влияния состояния кровеносной системы и крови на здоровье организма. Кровь выполняет питательную, защитную, терморегуляторную и другие функции [159]. В связи с этим, всестороннее изучение крови и ее компонентов имеет важное значение и не только способствует установлению механизмов протекания физиологических процессов, но и помогает в поиске путей борьбы с весьма распространенными патологиями, связанными с нарушениями функций крови. АСМ – это один из методов, с успехом применяющихся для исследования форменных элементов крови: эритроцитов [105, 160], лейкоцитов [161–163], тромбоцитов [82, 164].

Среди всего многообразия клеток, изучавшихся с помощью АСМ, можно особо выделить эритроциты или красные кровяные тельца, т.к., вероятно, именно им принадлежит первенство по количеству АСМ исследований. Распространенности АСМ исследований эритроцитов способствует ряд причин, к которым можно отнести следующие.

Доступность. Эритроциты – это самые многочисленные форменные элементы крови. В 1 мм^3 человеческой крови содержится 4,5–5,0 млн. эритроцитов. Четвертая часть всех клеток организма человека приходится на красные кровяные клетки.

Важное физиологическое значение. Основной функцией эритроцитов является транспорт газов. Клетки насыщаются кислородом в легких и через кровоток распространяют газ по организму, доставляя молекулы кислорода в органы и ткани. В обратном направлении они переносят продукт метаболизма – углекислый газ. Помимо газотранспортной, эритроциты способны выполнять и некоторые другие функции. В частности, клетки могут адгезировать на своей поверхности различные химические вещества и доставлять их к тканям организма. Также эритроциты обладают способностью связывать токсины, тем самым, не позволяя им оказывать негативное влияние на другие клетки. Нарушение нормальной работы эритроцитов может привести к тяжелым последствиям для организма.

Простое строение. Эритроциты к настоящему времени неплохо изучены. Известны структура, форма, химический состав этих клеток. Ввиду отсутствия ядра и некоторых органелл в зрелых эритроцитах, данные кровяные клетки характеризуются относительно простым строением и не могут синтезировать белки в ответ на внешние воздействия. Большую часть цитоплазмы эритроцитов занимает гемоглобин – белок, ответственный за связывание

кислорода и придающий этим клеткам характерный красный цвет. Каждый эритроцит содержит порядка 10^8 молекул гемоглобина [165].

Несложная пробоподготовка. Способы приготовления образцов эритроцитов к АСМ измерениям различаются в зависимости от задач исследования. Обязательным условием является лишь осаждение клеток на подложку, их иммобилизация.

Наиважнейшей характеристикой красных клеток крови является их деформируемость, т.е. способность деформироваться. Считается, что здоровому эритроциту присуща форма двояковогнутого диска. Такие эритроциты называют дискоцитами (рисунок 4.1 а). Форма клеток способствует лучшему газообмену с внешней средой. Проходя через капилляры кровеносного русла, диаметр которых меньше размера клетки, эритроциты подвергаются значительным деформациям (рисунок 4.1 б). Снижение деформируемости эритроцитов затрудняет их прохождение через микрососуды и может привести к ишемии и гипоксии тканей [166].

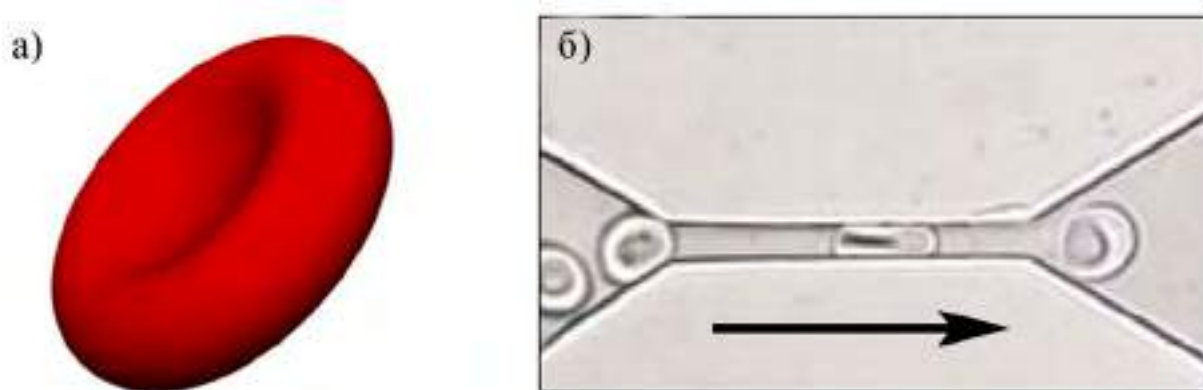


Рисунок 4.1 - а) схематичное изображение дискоцита, б) микрофотография эксперимента, в котором человеческий эритроцит проходит через 4 мкм канал (рисунок адаптирован из [167]).

Следует отметить, что не все эритроциты в свободном состоянии характеризуются формой двояковогнутого диска (рисунок 4.2 а). Даже в здоровом организме часть клеток имеет другую форму (рисунок 4.2 б-г), однако, большинство красных клеток крови представляют собой дискоциты. При некоторых заболеваниях форма значительной доли эритроцитов может отличаться от нормальной [80, 168]. В связи с этим, соотношение эритроцитов аномальной и нормальной форм у больного человека выше, чем у здорового. Патологические клетки, как правило, хуже справляются со своими функциями. Кроме того, их механические свойства ухудшаются, что выражается в снижении деформируемости.

При подготовке образцов эритроцитов для АСМ исследований существует два основных подхода. В одних случаях клетки подвергаются фиксации – специальной обработке, позволяющей увеличить их твердость, а в других – объекты остаются в нативном состоянии. Абсолютное большинство работ по АСМ исследованию эритроцитов посвящено

фиксированным клеткам. Экстремальная податливость красных кровяных клеток сильно затрудняет их АСМ изучение в нативном состоянии. В связи с этим, АСМ сканирование нативных эритроцитов в контактном режиме практически невозможно, а их визуализация с помощью тэппинг режима затруднена из-за слабого контроля силы.

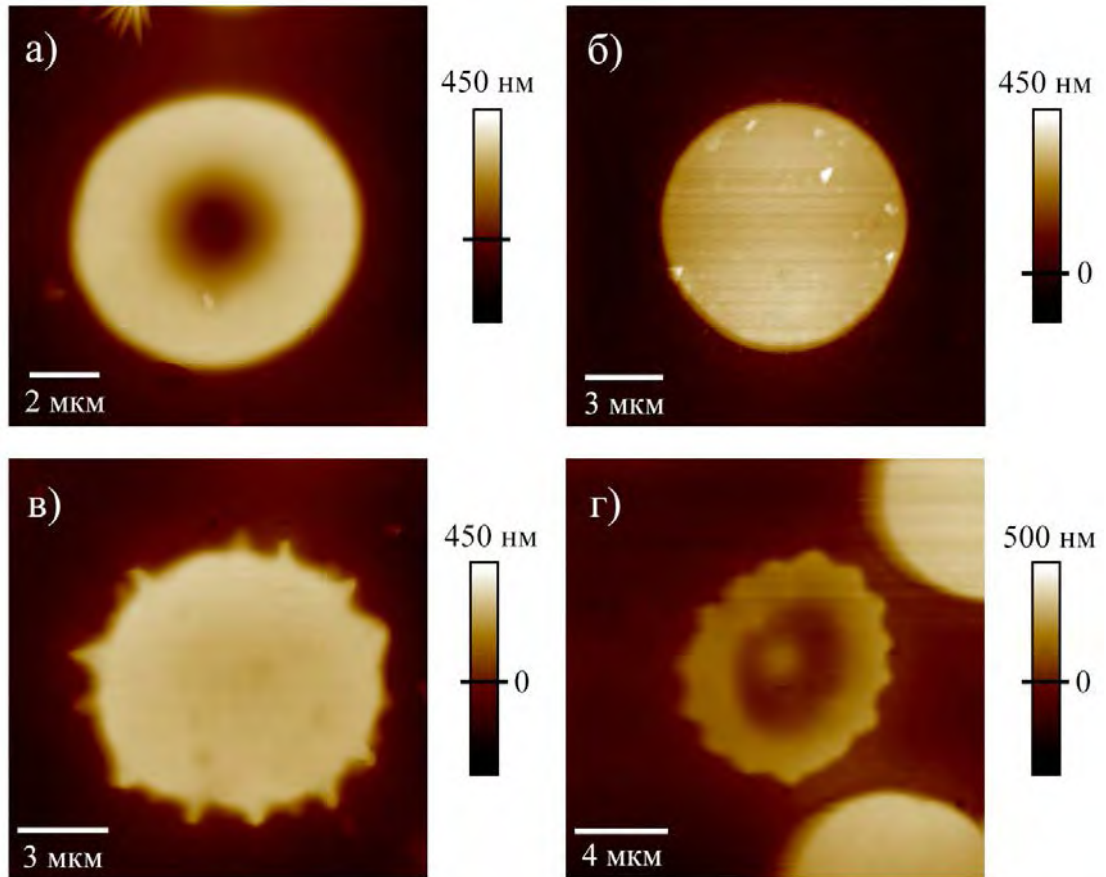


Рисунок 4.2 - а-г) АСМ топографии человеческих эритроцитов разной формы, полученные на воздухе.

На самом деле можно считать два подхода к пробоподготовке эритроцитов взаимодополняющими, т.к. каждый из них обладает своими преимуществами и может быть предпочтительным в зависимости от задач исследования. Так, фиксированные эритроциты позволяют получить более подробную информацию о геометрии клеток, а изучение нативных клеток обеспечивает большую достоверность их механических характеристик.

Можно выделить несколько способов фиксации эритроцитов для АСМ: высушивание [169], заморозка [170], воздействие химическими агентами [105, 171]. Для химической фиксации чаще всего применяют глутаровый альдегид. Концентрация активного вещества в растворе, а также длительность воздействия на эритроциты у разных авторов варьируется от 0,5% до 2,5% и от 1 минуты до 30 минут соответственно. Также иногда для отверждения эритроцитов используют формалин [68] и этиловый спирт [172]. Считается, что

фиксированные клетки, изменяя свои механические свойства, сохраняют форму и структуру мембраны. Образцы фиксированных эритроцитов обладают следующими достоинствами.

1. Долговременная стабильность. Образцы эритроцитов при соблюдении определенных условий могут храниться длительное время без потери своих изначальных характеристик.

2. Возможность достижения высокого пространственного разрешения. Если нужна информация о поверхностной структуре мембраны эритроцитов, то фиксирование позволяет достичь более высокого пространственного разрешения. Фиксированные клетки хорошо держат форму под действием механической силы со стороны зонда. Зонд не причиняет эритроцитам больших деформаций, снижающих разрешение при АСМ сканировании.

3. Нетребовательность к условиям проведения экспериментов. Фиксированные эритроциты можно изучать в вакууме, в воздушной и жидкой средах. Их надежная адгезия с подложкой позволяет проявлять большую гибкость при выборе АСМ режима сканирования, дает возможность использовать широкий спектр моделей зондов, поскольку фиксированные клетки способны, не повреждаясь, выдерживать большую нагрузку.

Фиксация клеток неизбежно приводит к их отверждению. Тем не менее, определенный интерес к исследованиям механических свойств фиксированных эритроцитов с помощью АСМ остается. Например, установлено, что после кратковременной химической обработки глутаровым альдегидом разница в деформируемости красных клеток крови у здоровых доноров и людей с некоторыми патологиями сохраняется [105].

Образцы с нативными эритроцитами обладают преимуществами, представленными ниже.

1. Аутентичность свойств. Необработанные, нативные эритроциты *in vitro* почти не отличаются по своим характеристикам от клеток в естественных условиях, *in vivo*. Поэтому изучение нефиксированных клеток должно предоставлять более актуальную информацию об их свойствах.

2. Наблюдение реакции на воздействия в динамике. То, что эритроциты являются нативными, дает возможность оценивать их реакцию на внешние воздействия, варьирование условий окружающей среды, добавление различных химических веществ. Причем изменение свойств клеток из-за внешних факторов можно наблюдать на одних и тех же образцах, сравнивая контрольные измерения с измерениями, произведенными после того или иного воздействия.

К недостаткам исследования нативных эритроцитов следует отнести короткое время жизни (часы), высокую чувствительность к внешним условиям, необходимость использовать минимально возможную силу при их зондировании и, соответственно, требовательность к способу их АСМ сканирования и характеристикам зондов.

В АСМ исследованиях красных кровяных клеток одним из наиболее стремительно развивающихся направлений является сравнительный анализ структурно-механических характеристик нормальных и патологических эритроцитов как в нативном, так и в фиксированном состояниях. К перспективным направлениям АСМ исследований помимо диагностики «здоровья» эритроцитов можно отнести также контроль состояния этих клеток в процессе проведения терапии, а также тестирование действия лекарственных субстанций непосредственно на клетки *in vitro*.

Было опубликовано несколько работ по АСМ изучению влияния сахарного диабета на характеристики эритроцитов [172, 173]. При исследовании высушенных эритроцитов в [173] получены данные о том, что сахарный диабет 2-го типа приводит к полиморфизму эритроцитов (увеличению количества клеток с аномальной формой по отношению к общему числу эритроцитов) и увеличению среднего «кажущегося модуля упругости» клеток и его дисперсии по сравнению с эритроцитами здоровых людей.

В [172] также сравнивались эритроциты больных диабетом со здоровыми клетками. Для анализа состояния красных кровяных клеток использовались АСМ и СЭМ. С помощью СЭМ было обнаружено, что патологические эритроциты имеют нестандартную вытянутую форму, а их поверхность выглядела более гладкой по сравнению со здоровыми клетками. АСМ исследование фиксированных глутаровым альдегидом эритроцитов на воздухе показало, что в среднем эритроциты больных диабетом имеют меньший размер и меньшую глубину вогнутости, а шероховатость мембраны таких клеток приблизительно в 2 раза ниже, чем у здоровых.

В рамках исследования эритроцитов, предварительно фиксированных с помощью глутарового альдегида, на воздухе факт относительного упрочнения эритроцитов больных сахарным диабетом по сравнению со здоровыми клетками был подтвержден и в [166].

С помощью АСМ в работе [105] рассматривалось влияние различных типов анемии на модуль упругости фиксированных глутаровым альдегидом эритроцитов. Исследование проводилось в натрий-фосфатном буфере (PBS). Было обнаружено, что эритроциты здоровых людей наиболее податливы, т.е. имеют наименьший модуль Юнга (26 ± 7 кПа). Наличие любого вида анемии приводило к увеличению значения модуля упругости эритроцитов, причем средний модуль упругости патологических клеток мог трехкратно превосходить значение модуля Юнга для здоровых эритроцитов. Был определен средний модуль упругости эритроцитов для трех типов анемии (наследственный сфероцитоз – 43 ± 21 кПа, талассемия – 40 ± 24 кПа, дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – 90 ± 20 кПа).

Характеристики нормальных и деоксигенированных нативных эритроцитов от пациентов, страдающих серповидно-клеточной анемией, рассматривались в [80]. В крови

больных было обнаружено большое количество клеток аномальной формы и размеров. Было определено, что нормальные и деоксигенированные клетки имеют мультимодальные распределения значений модуля Юнга. Так, у обоих типов образцов наблюдались пики на уровне 1 и 3 кПа. Предполагается, что первый пик характеризует здоровые эритроциты, а второй соответствует патологическим клеткам. Кроме того, у оксигенированных клеток обнаруживался дополнительный пик на значении 15 кПа, а у деоксигенированных – 40 кПа. Т.е. наблюдалось упрочнение бескислородных эритроцитов. Также авторами указывается, что на полученные характеристики эритроцитов мог повлиять принимаемый больными лекарственный препарат гидроксисурия.

В [168] АСМ исследованию подверглись высушенные эритроциты людей с железодефицитной анемией. Был проведен сравнительный анализ трех типов образцов. Изучались клетки здоровых доноров, эритроциты людей с диагнозом железодефицитная анемия, а также клетки пациентов с подтвержденным заболеванием, проходивших лечение в течение одного месяца. Сравнение эритроцитов проводилось по следующим морфологическим параметрам: латеральные размеры, максимальная высота, глубина вогнутости, перепад значений между максимальной и минимальной высотами, структура поверхности мембраны. В крови больных людей, не подвергавшихся лечению, эритроциты преимущественно имели эллиптическую форму без вогнутостей. Макроморфологические параметры эритроцитов после месяца лечения существенно улучшились, приблизившись к параметрам здоровых клеток. Однако месячной терапии оказалось недостаточно, чтобы в полной мере вернуть эритроцитам изначальную, присущую здоровым дискоцитам, структуру поверхности мембраны.

Рассмотрению влияния системной красной волчанки на свойства эритроцитов посвящена работа [174]. В результате исследования фиксированных глутаровым альдегидом клеток было определено, что в отличие от здоровых эритроцитов, клетки людей, больных волчанкой, имеют искаженную по сравнению с нормальной структуру мембраны.

В [175] исследовалась морфология высушенных эритроцитов, пораженных паразитом *Plasmodium falciparum*, вызывающим малярию. Рассматривались АСМ изображения топографии клеток на различных стадиях поражения малярийными паразитами. Установлено, что действие плазмодиев на мембрану приводит к появлению на ней выпуклостей, которые, как считается, способствуют приклеиванию пораженных эритроцитов к стенкам кровеносных сосудов, что, в конечном счете, может вызвать нарушение кровоснабжения и отказ внутренних органов [176]. Число выпуклостей на мембране эритроцита коррелировало с количеством паразитов, поразивших клетку. С удвоением первого, удваивалось и последнее.

Кроме того, на поздних стадиях развития паразита на поверхности мембраны помимо выпуклостей также наблюдались поры.

Нативные эритроциты больных сахарным диабетом, ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью изучались в [104]. Также рассматривались образцы крови курящих людей. Исследования показали, что эритроциты из обобщенной выборки больных людей характеризуются большим модулем Юнга ($8,6 \pm 0,8$ кПа), чем клетки здоровых доноров ($4,9 \pm 0,5$ кПа). Наиболее явный рост среднего модуля Юнга эритроцитов был зарегистрирован у пациентов с диабетом и курящих людей. Стоит отметить, что при всех рассмотренных заболеваниях отмечалось уширение распределения значений модуля Юнга по сравнению с распределением для здоровых клеток, даже в случаях, когда существенного изменения среднего значения модуля упругости не наблюдалось.

Действие двух лекарственных препаратов – аминофиллина и метилпреднизолона, применяемых при лечении астмы, на морфологию и модуль упругости эритроцитов тестировалось в [177]. АСМ измерения фиксированных глутаровым альдегидом клеток осуществлялись в PBS. Инкубирование эритроцитов с фармакологическими препаратами приводило к изменению их модуля Юнга и структуры мембраны клеток. Аминофиллин в терапевтической концентрации 0,01 мг/мл вызвал увеличение размеров эритроцитов: диаметр и высота выросли соответственно с $7,4 \pm 0,1$ мкм и $1,6 \pm 0,1$ мкм (контрольные значения у клеток без воздействия) до $8,3 \pm 0,1$ мкм и $2,3 \pm 0,1$ мкм. Кроме того, обработка этой субстанцией приводила к упрочнению эритроцитов. Реакция клеток на метилпреднизолон была другой: вещество в близкой к терапевтической концентрации 0,1 мг/мл заставляло эритроциты размягчаться. Влияние метилпреднизолона на морфологию клеток при концентрации 1 мг/мл выражалось в виде появления бугров на поверхности эритроцитов.

В работе [178] авторы посредством АСМ проверили, влияет ли введение в организм стимулирующего вещества – синтетического эритропоэтина на характеристики эритроцитов. Сравнение обработанных глутаровым альдегидом клеток крови здоровых доноров и людей с анемией, принимающих эритропоэтин, не выявило существенных различий в средней величине деформации эритроцитов под действием АСМ зонда. Однако в контрольной группе деформация эритроцитов одного донора приблизительно в 4 раза превышала среднюю величину деформации клеток других людей. В результате проведения дополнительных исследований было установлено, что донор с аномально мягкими эритроцитами страдает редкой формой диабета.

Таким образом, АСМ позволяет эффективно выявлять различия в геометрических и механических свойствах эритроцитов при различных заболеваниях и воздействии некоторых лекарств. Следует отметить, что АСМ исследования патологических эритроцитов не дает

возможности напрямую проводить диагностику заболеваний, т.к. девиация свойств клеток может вызываться различными причинами. В связи с этим, определенный с помощью АСМ модуль Юнга эритроцитов может лишь выявить наличие патологии и указать на необходимость проведения дополнительных исследований [178]. АСМ зарекомендовал себя как перспективный инструмент мониторинга процесса лечения, а также оценки эффективности действия применяемых методов терапии и используемых лекарственных препаратов. С помощью этого метода можно подбирать наиболее эффективные средства борьбы с болезнью, корректировать дозировку применяемых лекарств.

Нетрудно заметить, что в литературе, измеренный с помощью АСМ модуль упругости, существенно различается. Этот факт можно объяснить неодинаковостью способов подготовки образца с эритроцитами у разных авторов. С увеличением концентрации вещества-фиксатора и времени экспозиции растет и модуль упругости клеток. Не стоит забывать также и о вариациях к подходам АСМ измерений эритроцитов: тип зонда, скорость индентирования, модель расчета модуля Юнга также могут влиять на результаты определения модуля упругости.

Как и любые другие клетки, эритроциты для АСМ исследования должны быть иммобилизованы на подложке. Однако т.к. форменные элементы крови не склонны к адгезии, традиционные для других типов клеток подложки, такие как компоненты межклеточного матрикса, для этого не подходят. Поэтому, как правило, нативные эритроциты в АСМ экспериментах закрепляют с помощью поли-L-лизина [8, 80, 81]. Поли-L-лизин коммерчески доступен. На рынке представлены как уже готовые твердые подложки, обработанные данным веществом, так и полилизин в виде раствора или порошка для самостоятельной модификации поверхности подложек для клеток. Хотя производители полилизина снабжают его информацией об общих правилах использования, стандартных протоколов по обработке подложки полилизином для закрепления нативных эритроцитов не приводится. Некоторые рекомендации по применению полилизина для иммобилизации эритроцитов можно найти в работе [8]. Отмечалось, что адгезия клеток к полилизину может быть настолько сильной, что объекты сильно меняют свою форму, расплываясь по поверхности [179].

АСМ исследований нативных эритроцитов в физиологически адекватных условиях крайне мало. Применяемый в таких работах способ иммобилизации нативных эритроцитов с помощью полилизиновой подложки изучен не полностью. Учитывая сообщения некоторых авторов о сильной адгезии полилизина и клеток, а также экстремальные механические характеристики нативных эритроцитов, можно ожидать, что прикрепление к подложке может изменить свойства столь деликатных объектов. Действительно, в [8], утверждается, что эритроциты на полилизине из-за сильного натяжения мембраны могут подвергаться лизису.

Нами была предпринята попытка посредством АСМ в режиме PeakForce QNM изучить нативные эритроциты на поли-L-лизине и оценить влияние подложки на морфологию и эффективный модуль Юнга данных клеток.

4.2 ПОДГОТОВКА НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ К ИССЛЕДОВАНИЮ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В наших экспериментах для получения образцов с клетками, надежно иммобилизованными на подложке, дно стандартных полистироловых чашек Петри диаметром 40 мм обрабатывалось полилизинном. Модификация подложки осуществлялась водным раствором полилизина «Poly-L-lysine solution P8920» [180] (Sigma, США) с молекулярной массой 150–300 кДа. Исходный 0,1% раствор разбавляли в 100 раз, после чего заливали полученный раствор в чашку, выдерживали его в течение 5 минут, а затем сливали. Чашки Петри использовались для иммобилизации эритроцитов после высушивания при комнатной температуре.

Изучались нативные эритроциты крыс линии Wistar. Для приготовления образцов у наркотизированных (уретановый наркоз, 1,2 г/кг) самцов крыс брали кровь из брюшной аорты. Предварительно в кровеносное русло грызунов вводили гепарин в дозе 50 ЕД на 100 г массы тела в 1 мл физиологического раствора (ФР). Сразу после забора крови эритроциты выдерживали в пробирке для осаждения в гравитационном поле, удаляли плазму, промывали клетки с помощью ФР с рН 7,4. Каплю суспензии эритроцитов в ФР (в соотношении 1:50) наносили на дно чашки Петри, предварительно обработанное полилизинном. В чашку с эритроцитами добавляли 1 мл ФР, ждали 20 мин, чтобы клетки смогли осесть на ее дне, затем удаляли слабо закрепленные объекты, несколько раз обновляя ФР. После этого помещали чашку в атомно-силовую микроскоп для проведения экспериментов.

4.3 ИЗУЧЕНИЕ НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ, ПРИКРЕПЛЕННЫХ К ПОЛИЛИЗИНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ, С ПОМОЩЬЮ РЕЖИМА PEAKFORCE QNM АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Как правило, в наших экспериментах крысиные эритроциты при наблюдении в инвертированном световом микроскопе представляли собой оптически контрастные объекты округлой формы и в стандартном режиме светлого поля имели красноватую окраску (рисунок 4.3 а). Равномерность окрашивания прикрепленных к полилизину клеток свидетельствовала в пользу плоской формы эритроцитов, в то время как относительно слабо

связанные с подложкой клетки больше напоминали стандартные дискоциты (правый нижний угол рисунка 4.3 а).

АСМ зондирование в режиме PeakForce QNM осуществлялось стандартными острыми зондовыми датчиками Bruker SNL-(D) с паспортной жесткостью 0,06 Н/м. Константа жесткости каждого кантилевера устанавливалась методом тепловых шумов до начала экспериментов с клетками.

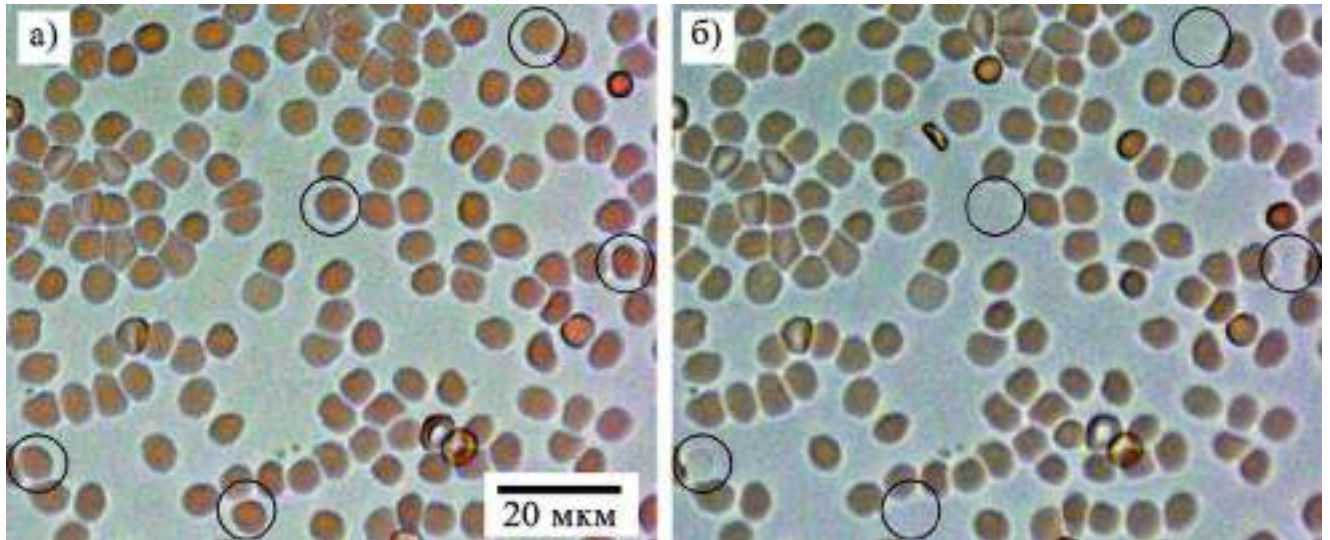


Рисунок 4.3 - Микрофотографии образца эритроцитов, закрепленных на полилизиновой подложке, а) непосредственно после приготовления образца б) 90 минутами позже (окружностями отмечены обесцветившиеся клетки).

В данном исследовании анализировались АСМ топографии подложки с эритроцитами и карты распределения эффективного модуля Юнга. Средние значения эффективного модуля Юнга эритроцитов определялись на АСМ изображениях, сглаженных фильтром, ослабляющим высокочастотные составляющие сигнала. Анализировался сигнал в центре клетки, внутри квадратной области размером приблизительно $2 \times 2 \text{ мкм}^2$. Эксперименты с эритроцитами проводились с максимальной силой надавливания на уровне 500 пН, минимально возможной частотой сканирования 0,1 Гц, амплитудой вертикального движения зонда (Peak Force Amplitude) в каждой точке измерения 1 мкм, частотой движения по вертикали 250 Гц. Как правило, линейный размер кадра АСМ данных составлял 15–20 мкм.

АСМ сканирование показало, что эритроциты имеют плоскую или плоскую с бугорком по центру форму. Интересно, что похожие результаты наблюдались в работе [8] при сканировании нативных эритроцитов в тэппинг режиме. На рисунке 4.4 а,б показаны АСМ изображения сигнала ошибки обратной связи, полученные в тэппинге авторами [8], а также в PeakForce QNM нами.

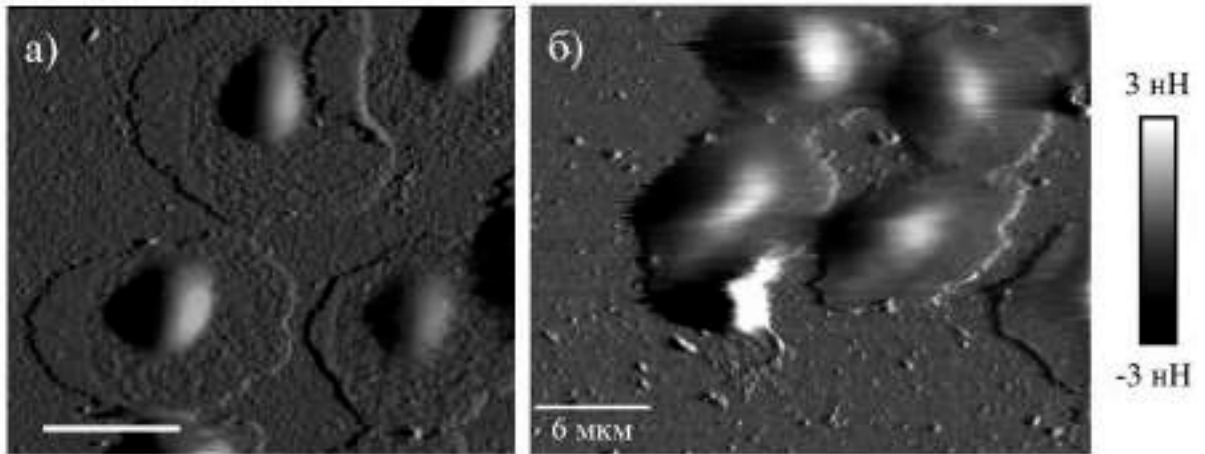


Рисунок 4.4 - АСМ изображения ошибки обратной связи а) нативных человеческих эритроцитов, полученное в тэппинге [8] б) нативных крысиных эритроцитов, полученное в PeakForce QNM.

Стоит отметить, что некоторые эритроциты с плоской поверхностью демонстрировали высоту в десятки нанометров, что несильно превышает толщину двойного слоя билипидной плазматической мембраны (рисунок 4.5). Т.к. по АСМ карте деформаций у таких клеток глубина индентирования была сопоставима с высотой, можно предположить две возможных причины столь малой высоты эритроцитов: либо сильное взаимодействие с полилизинной подложкой настолько растягивает клетку, что она становится плоской, либо во время зондирования кантилеверу не хватает чувствительности, и он не изгибается, продавливая клетку.

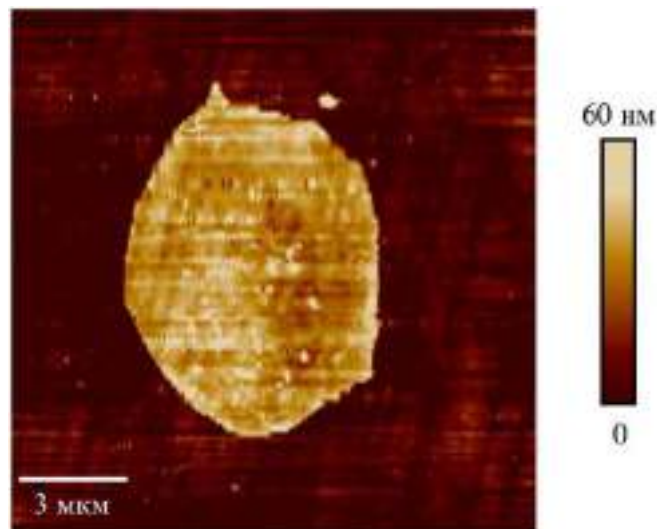


Рисунок 4.5 - АСМ топография плоского эритроцита.

При наблюдении за эритроцитами через оптический микроскоп в течение нескольких часов, было обнаружено, что некоторые клетки со временем обесцвечиваются и становятся практически невидимыми (рисунок 4.3 б). В этом случае лишь контуры клеток слабо проявляются на фоне подложки. Изменение оптических свойств эритроцитов сопровождается

также и трансформацией их формы. Так, если эритроциты в исходном состоянии были плоскими и невысокими – $0,3 \pm 0,3$ мкм ($n = 22$), то трансформировавшиеся оптически прозрачные клетки становились значительно выше – $1,7 \pm 0,5$ мкм ($n = 7$), и имели выпуклую куполообразную форму. На рисунке 4.6 а-г для сравнения показаны АСМ топографии и профили высоты плоского и выпуклого эритроцитов. Также важно отметить, что в среднем трансформировавшиеся эритроциты демонстрировали меньшую площадь проекции по данным АСМ топографии – 29 ± 7 мкм² ($n = 6$) против 44 ± 8 мкм² ($n = 18$) у клеток в исходном состоянии.

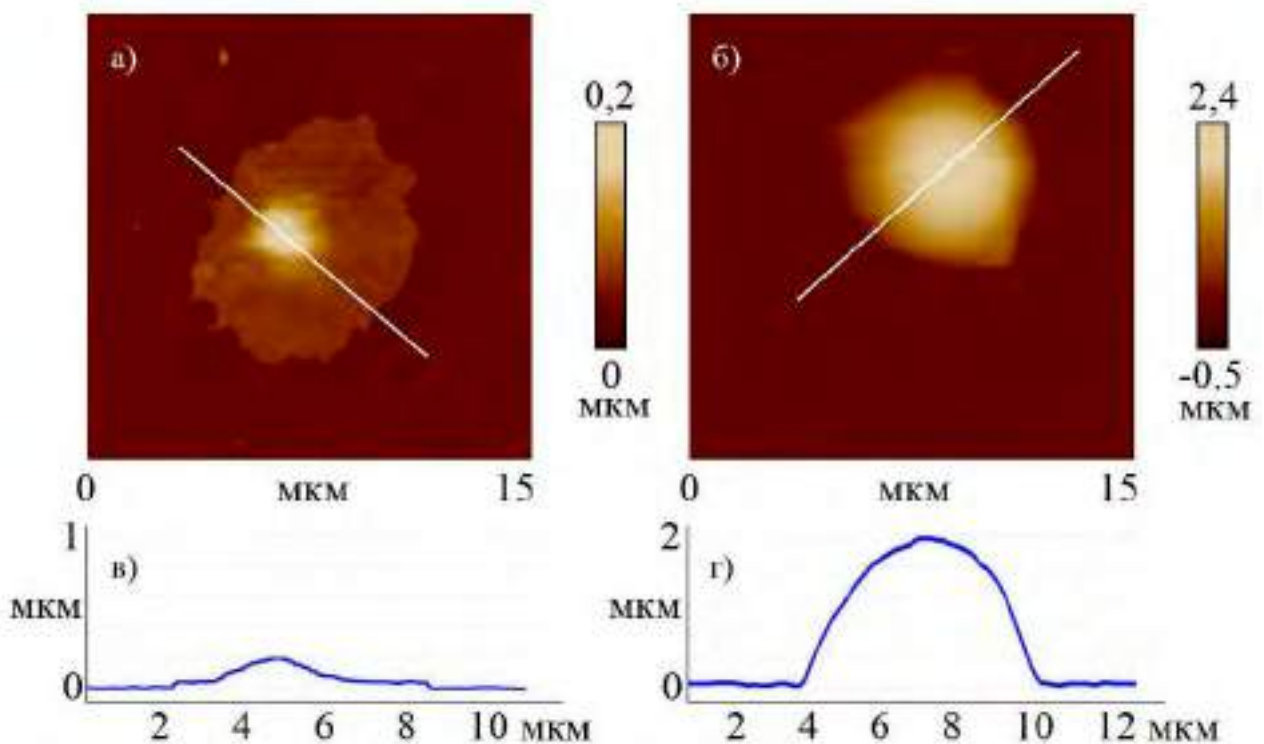


Рисунок 4.6 - а,б) АСМ топографии эритроцитов в исходном и трансформировавшемся состояниях; в,г) поперечные сечения плоского и выпуклого эритроцитов, обозначенные прямыми на а,б.

Анализ АСМ карт распределения эффективного модуля Юнга показал, что эритроциты в исходном состоянии и обесцвеченные трансформировавшиеся клетки характеризуются разной деформируемостью. Средний эффективный модуль Юнга обесцвеченных эритроцитов был почти в 4 раза больше, чем у оптически контрастных – 48 ± 10 кПа ($n = 6$) и 13 ± 9 кПа ($n = 17$) соответственно. Пример АСМ карт эффективного модуля Юнга эритроцитов в двух разных состояниях, приведенных на рисунке 4.6, а также гистограммы значений этого параметра представлены на рисунке 4.7 а-г.

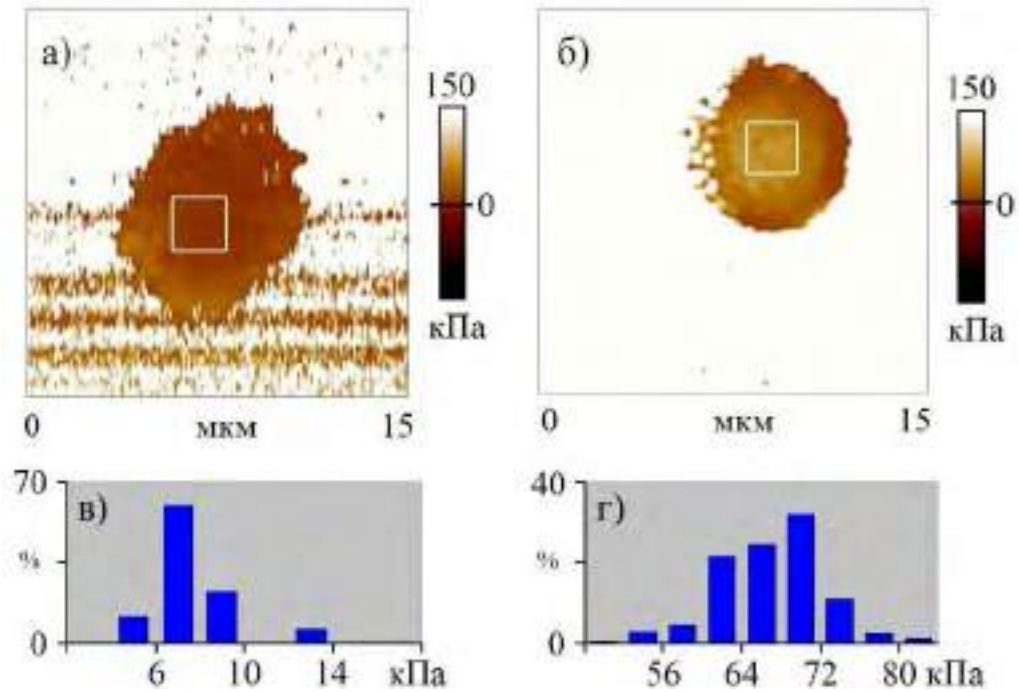


Рисунок 4.7 - а,б) АСМ карты распределения эффективного модуля Юнга для эритроцита в исходном состоянии и трансформировавшейся клетки; в,г) гистораммы распределения эффективного модуля Юнга по квадратным областям, обозначенным на а,б.

Обесцвечивание эритроцитов на полилизиновой подложке, сопровождающееся трансформацией формы и упрочнением клеток, развивается довольно стремительно. Так, мы неоднократно наблюдали процесс обесцвечивания эритроцитов с помощью светового микроскопа. Как правило, трансформация клеток занимала несколько секунд. В одном из АСМ экспериментов был зарегистрирован процесс трансформации эритроцита. На рисунке 4.8 а,б видно, что эритроцит, расположенный в верхней части кадра, прямо во время сканирования претерпевает изменение формы, также меняется и распределение эффективного модуля упругости по его поверхности.

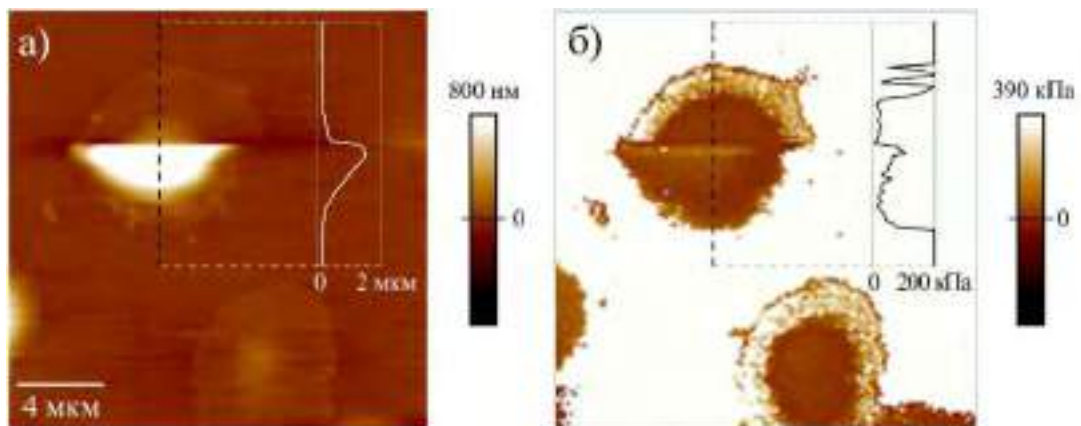


Рисунок 4.8 - АСМ а) топография нативных эритроцитов (верхняя клетка набухла во время сканирования), пунктиром показано место сечения б) карта распределения эффективного модуля Юнга. Медленная ось сканирования направлена вниз.

4.4 ВЫВОДЫ О ДИНАМИКЕ ПОВЕДЕНИЯ НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ НА ПОЛИЛИЗИНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ

Считается, что модуль Юнга измеряется точно, если образец деформируется АСМ зондом менее чем на десятую долю своей толщины [88]. При нарушении данного условия модуль Юнга завышается, т.к. свой вклад в значение определяемого параметра вносит твердая подложка. В наших экспериментах эритроциты в исходном состоянии обладали малой высотой $0,3 \pm 0,3$ мкм ($n = 22$), которая была сопоставима с деформацией $0,2 \pm 0,2$ мкм. В связи с этим, понятно, что близость подложки должна отражаться на эффективном модуле Юнга эритроцитов. Поэтому полученное значение 13 ± 9 кПа эффективного модуля Юнга таких клеток завышено. Трансформировавшиеся эритроциты имели большую высоту – $1,7 \pm 0,5$ мкм ($n = 7$), почти на порядок превышающую деформацию. Следовательно, можно предположить, что результат 48 ± 10 кПа достоверно характеризует эффективный модуль Юнга трансформировавшихся эритроцитов при заданной скорости индентирования в режиме PeakForce QNM. Таким образом, при трансформации наблюдается как минимум трехкратное упрочнение клеток. Учитывая завышенный эффективный модуль Юнга эритроцитов до трансформации, можно предположить, что в реальности эффект упрочнения должен быть выражен еще сильнее.

Анализ литературных данных по АСМ изучению модуля Юнга нативных эритроцитов показывает, что у разных авторов результаты сильно варьируются. Так, в АСМ исследовании нативных эритроцитов [79] модуль упругости был оценен в 16 ± 2 кПа. Авторы [80, 104] получили значения на уровне единиц килопаскалей, а в работе [81] сообщается о приблизительно 150 Па. К несогласию в данных могут вести различные причины. В [79] определялся модуль Юнга эритроцитов крыс, а в [80, 81, 104] объектами исследования служили человеческие клетки. В [80, 104] измеренные с помощью АСМ значения модуля Юнга эритроцитов человека по порядку величины совпадают, но оказываются ниже, чем у крысиных клеток. Особенно низкий модуль Юнга в [81], вероятно, есть результат использования не стандартных острых АСМ зондов, как в [79, 80, 104], а кантилевера со сферической частицей диаметром 4 мкм на кончике.

В исследовании [181] отмечалось, что на подложках, обработанных раствором полилизина в концентрации 100 мкг/мл, эритроциты меняли форму, а при концентрации 250 мкг/мл происходил лизис клеток. В нашей работе брались на порядок меньшие концентрации полилизина, но отклонения формы эритроцитов от традиционной дисковидной двояковогнутой геометрии не исчезали.

Поликатион полилизин широко используется для иммобилизации различных типов клеток в электронной микроскопии и АСМ. Он позволяет прикреплять даже не склонные к адгезии

клетки крови. Иммунизация с помощью данного вещества может быть настолько надежной, что при разрушении клетки специальным методом, закрепленная на полилизине плазматическая мембрана останется на подложке [179]. Эффект сильного взаимодействия между клеткой и полилизином достигается за счет того, что положительно заряженный полилизин связывается с отрицательно заряженной поверхностью клетки. С внешней стороны мембрана нормальных эритроцитов имеет отрицательный заряд, который в естественных условиях не дает клеткам формировать агрегаты (агглютинировать), а также прилипать к стенкам сосудов. За отрицательный заряд на поверхности эритроцитов, в основном, ответственны COO^- группы сиаловых кислот [182]. Схема, иллюстрирующая механизм адгезии клеток к стеклянной подложке, покрытой полилизином, приведена на рисунке 4.9.

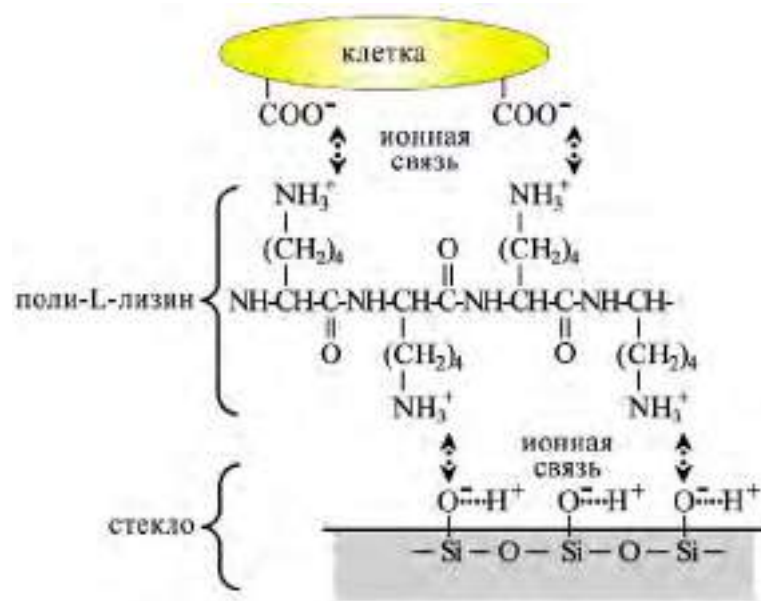


Рисунок 4.9 - Схема адгезии клеток к обработанной полилизином стеклянной поверхности (изображение адаптировано из [183]).

Стоит отметить, что у коммерчески доступного полилизина молекулярная масса вещества может различаться на порядок: от нескольких десятков до нескольких сотен кДа [184]. Чем больше молекулярная масса полилизина, тем больше связей каждая молекула способна образовывать. Поэтому полилизин с массой в сотни кДа будет сильнее взаимодействовать с клеткой по сравнению с аналогичным поликатионом, но с массой в десятки кДа. В связи с этим, использовавшийся нами раствор полилизина с молекулами массой в диапазоне 150–300 кДа, очевидно излишне сильно взаимодействует с нативными эритроцитами, что приводит к искажению формы клеток. Вероятно, применение полилизина с меньшей молекулярной массой позволит снизить натяжение мембраны и, тем самым, сохранить форму эритроцитов близкой к естественной. Поэтому важно не только подобрать правильную концентрацию раствора, но и выбрать подходящую по молекулярной массе марку полилизина.

Как и у нас, ранее в работе [8] наблюдалось обесцвечивание эритроцитов на полилизине. Авторы связали данное явление с разрывом плазматической мембраны и лизисом клеток (рисунок 4.10 а). Объяснялось данное явление продолжительным натяжением мембраны клеток за счет сильного адгезионного взаимодействия с полилизиновой подложкой. Согласно расчетам, у распластанных на полилизине клеток величина натяжения мембраны составляет примерно $0,001 \text{ Н/м}$ [8]. Это на порядок больше естественного натяжения, в связи с чем сделан вывод, что дополнительное натяжение может вызывать разрыв мембраны и спонтанный лизис клетки. В работе приведен предполагаемый механизм взаимодействия нативных эритроцитов с полилизиновой подложкой. Авторы считают, что непосредственно после осаждения на покрытую полилизинем поверхность эритроцит приобретает выпуклую форму. Эту гипотезу подтвердила визуализация в PBS фиксированных глутаровым альдегидом эритроцитов (рисунок 4.10 б). Далее, по прошествии времени мембрана эритроцитов рвется, происходит лизис клеток.

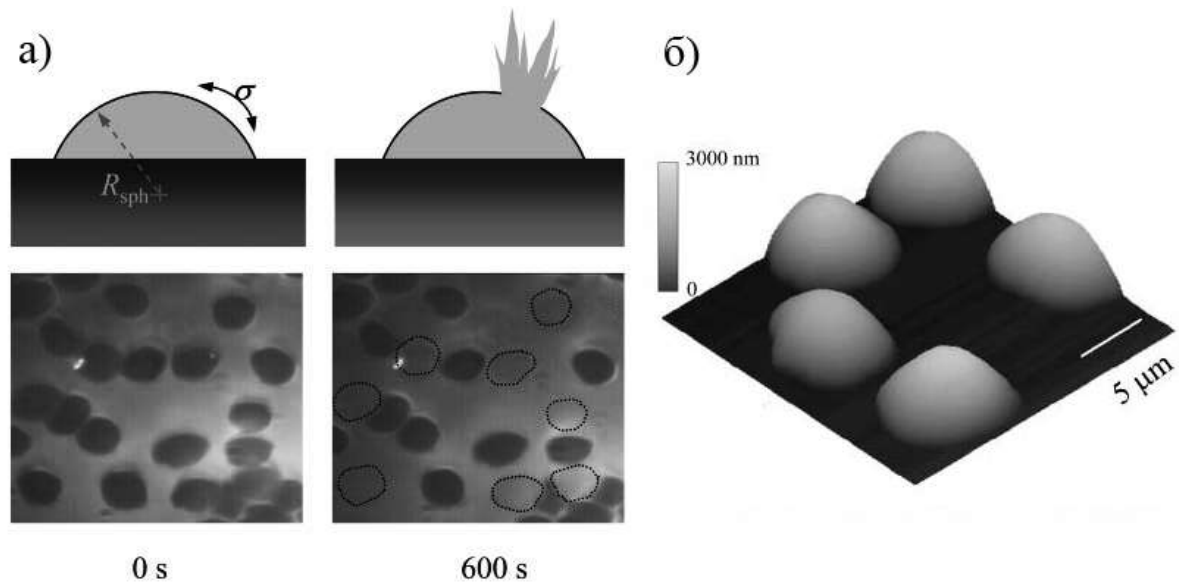


Рисунок 4.10 - а) схема лизиса, вызванного длительным натяжением прикрепленной мембраны эритроцита и фотографии эритроцитов сразу после помещения образца в микроскоп и по прошествии 600 с, б) АСМ топография поверхности фиксированных эритроцитов, полученная в контактном режиме АСМ [8].

Наши эксперименты показали, что при обесцвечивании эритроциты увеличивались в объеме и упрочнялись, но целостность мембраны сохранялась, и разрушения, т. е. лизиса трансформировавшихся клеток, не происходило. Наблюдаемый эффект отражает набухание клеток и, по-видимому, связан с истощением физиологического ресурса механочувствительных катионных каналов, ответственных за поддержание постоянства клеточного объема, и может быть вызван деградацией гемоглобина с образованием низко молекулярных димеров [185].

Близкий механизм обсуждался в работах [186, 187], где показано, что эритроциты животных, нокаутированных по белкам семейства Piezo, образующим механочувствительные катионные каналы, регулирующие клеточный объем, могут увеличиваться в объеме и понижать осмотическую устойчивость вследствие гипергидратации и *in vitro*, и *in vivo*. Индикатором такого понижения является рост внутриклеточного давления за счет поступления в эритроцит дополнительной жидкости, что отражается на значении эффективного модуля Юнга клетки. В конечном счете, стрессовая стадия упрочнения и гипергидратации эритроцитов может привести к гемолизу. Это подтверждается, например, АСМ изображением, полученным при попытке просканировать один из обесцветившихся эритроцитов (рисунок 4.11). На АСМ кадре сигнала ошибки обратной связи видно, что на месте предполагаемого нахождения клетки, на подложке располагаются лишь небольшие фрагменты, которые, скорее всего, соответствуют обрывкам плазматической мембраны эритроцита.

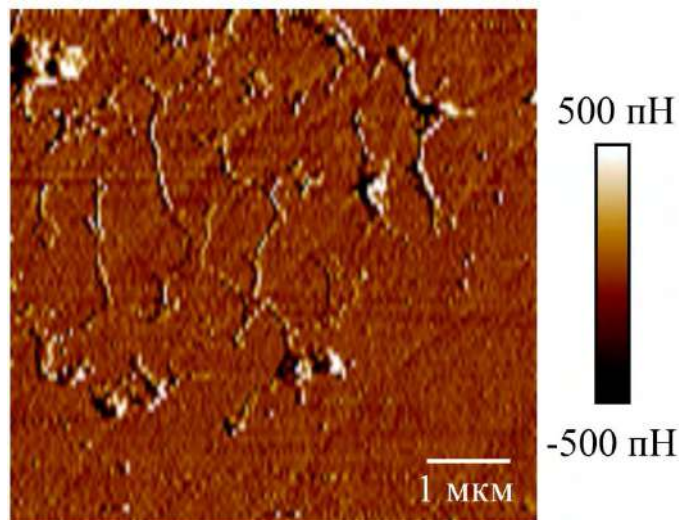


Рисунок 4.11 - АСМ изображение сигнала ошибки обратной связи эритроцита, претерпевшего лизис.

Мы получили дополнительные свидетельства в пользу упрочнения эритроцитов за счет гипергидратации. Оптические исследования показали, что трансформация закрепившихся на подложке эритроцитов развивалась в ≈ 3 раза быстрее в гипотоническом (с пониженной в 1,5 раза тоничностью) растворе, чем в изотоническом.

Результаты проведенных нами экспериментов позволяют следующим образом взглянуть на механизм взаимодействия нативных эритроцитов с полилизинной подложкой (рисунок 4.12). Изначально свободный дискоцит осаждается на обработанную полилизинной подложку (1). Из-за сильной адгезии между клеткой и подложкой эритроцит растягивается, распластываясь по полилизину (2). По истечении некоторого времени эритроцит набухает за счет поступления в него жидкости извне (3). В конечном итоге мембрана клетки не выдерживает натяжения и разрывается, происходит лизис эритроцита (4).

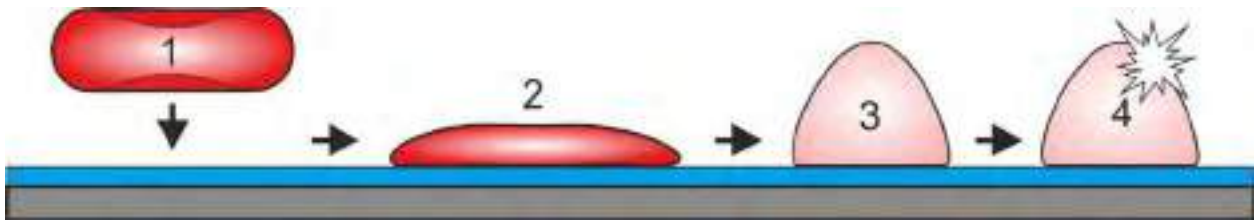


Рисунок 4.12 - Предполагаемый механизм трансформации эритроцитов при сильном адгезионном взаимодействии с полилизиновой подложкой.

Таким образом, в ходе проведенных оптических и АСМ экспериментов установлено влияние подложки и времени контакта с ней нативных эритроцитов на форму и эффективный модуль Юнга клеток. Обнаружено необратимое изменение состояния эритроцитов, продолжительное время (несколько часов) контактирующих с подложкой, обработанной раствором полилизина. Оно проявляется в том, что клетки приобретают куполообразную форму, уменьшают площадь контакта с подложкой и становятся тверже по сравнению с исходным распластанным и мягким состоянием. Причиной обнаруженной трансформации эритроцитов предполагается деградация гемоглобина вследствие его автоокисления с образованием низко молекулярных димеров [185]. Это может вызывать увеличение транспорта воды в клетку по осмотическому градиенту. После прохождения промежуточной стадии набухания эритроциты подвергаются лизису. Полученный результат представляется важным учитывать в АСМ исследованиях механических свойств не только эритроцитов, но и других нативных клеток. Конечно, в отличие от большинства других животных клеток, зрелые эритроциты утрачивают ядро, и их реакция на внешние воздействия носит более ограниченный характер. Тем не менее, можно предположить, что натяжение мембраны животных клеток, вызванное сильной адгезией с полилизинном, может влиять на измеряемый с помощью АСМ эффективный модуль Юнга таких объектов.

5. ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

5.1 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ

Корректное функционирование кардиоваскулярной системы, во многом зависит от состояния эндотелия, выстилающего кровеносные сосуды изнутри. Эндотелий представляет собой непрерывный монослой плотно контактирующих эндотелиоцитов или эндотелиальных клеток (ЭК), который изолирует кровь от внешних слоев сосудистой стенки. Выполняемые эндотелием функции весьма разнообразны: он служит барьером, определяющим обмен веществ между кровью и тканями; регулирует сосудистый тонус и артериальное давление; управляет процессом тромбообразования; участвует в воспалительных реакциях и т.д. [188, 189]. Эндотелиоциты постоянно подвергаются механическим воздействиям от протекающей крови, периодических изменений внутрисосудистого давления, растяжения и сжатия окружающих тканей. Такие механические стимулы запускают процессы механотрансдукции, приводя к структурным и биохимическим изменениям клеток [190]. Благодаря механочувствительности эндотелиоциты могут эффективно выполнять возложенные на них функции, адаптируясь к изменяющимся условиям окружающей среды.

С дисфункцией ЭК связано множество патологий: артериальная гипертензия, атеросклероз, поражение сосудов при сахарном диабете и др. Изучение эндотелия как целого, так и отдельных эндотелиоцитов – это путь к пониманию причин зарождения и прояснению механизмов течения различных сердечно-сосудистых заболеваний, а значит, в перспективе и к разработке способов лечения патологических состояний. В этой связи, АСМ оказывается весьма ценным источником информации о морфологии и механических характеристиках индивидуальных эндотелиоцитов.

Механические свойства ЭК влияют на синтез оксида азота (NO) – соединения, которое, регулируя тонус васкулярных гладкомышечных клеток, изменяет внутренний диаметр сосуда и кровяное давление в нем [191]. Более жесткие ЭК вырабатывают меньше NO [192]. Внутриклеточная NO-синтаза, ответственная за производство оксида азота, располагается вблизи плазматической мембраны эндотелиоцитов [193]. Также непосредственно под мембраной клеток находится состоящий преимущественно из актина кортикальный слой толщиной ~10–100 нм [90]. Таким образом, NO-синтаза встроена в кортикальный слой, и, как показали исследования, именно механические свойства кортикального слоя ЭК определяют активность данного фермента [194]. Поэтому жесткость кортикального слоя эндотелиоцитов

играет ключевую роль в регуляции кровяного давления, а также в патогенезе такой широко распространенной патологии как артериальная гипертензия [195]. Важной и актуальной задачей является разработка способов контролируемого влияния на жесткость кортикального слоя ЭК, позволяющих управлять синтезом NO и, соответственно, артериальным давлением.

Кортикальный слой животных клеток составляют актиновые фибриллы с различными белками, связывающими актин и стабилизирующими структуру сети микрофиламентов. Помимо актина немаловажный вклад в механические свойства кортикального слоя также вносят моторные белки, способные сшивать актиновые волокна между собой и создавать сократительные усилия внутри кортикальной сети [190]. Основным моторным белком ЭК является немышечный миозин II типа. Вместе с актином он образует актомиозиновый комплекс в виде поперечно связанных миозином актиновых микрофиламентов. Актимиозин динамически перестраивается как за счет полимеризации и деполимеризации актина, так и благодаря появлению новых и разрушению старых связей между актином и миозином. От активности немышечного миозина II типа зависят механические свойства кортикального слоя эндотелиоцитов [195]. Фосфорилирование регуляторных легких цепей молекулы миозина способствует ее связыванию с актином. Этот процесс лежит в основе сократимости ЭК [196]. Основным ферментом, активирующим миозин, является киназа легких цепей миозина (КЛЦМ) [197]. В ЭК преобладает ее высокомолекулярная изоформа КЛЦМ210 [198]. Этот белок не только активирует работу немышечного миозина II типа, но может и сам соединять отдельные элементы цитоскелета между собой [199]. Влияние КЛЦМ210 на механические свойства ЭК изучены слабо, поэтому необходимы дополнительные исследования, способствующие прояснению роли данного белка в регуляции механических свойств эндотелиоцитов.

Выявить вклад КЛЦМ210 в динамику механических характеристик ЭК можно с помощью метода АСМ. АСМ активно применяется для исследования морфологии и измерения жесткости или модуля упругости фиксированных и нативных эндотелиоцитов [88, 90, 200–202]. Из-за специфики этих клеток их АСМ исследование сопряжено с рядом проблем. При анализе АСМ данных необходимо учитывать, что свойства эндотелиоцитов могут различаться в зависимости от местонахождения клеток в сосудистой системе [203]. Эндотелиоциты обладают механочувствительностью, поэтому могут изменять свои свойства, реагируя на стимуляцию со стороны АСМ зонда [204]. Однако более сложным для преодоления фактором может оказаться то, что точное измерение жесткости или модуля упругости тонких областей клетки затруднено близостью твердой подложки, на которой они обычно культивируются [68]. Решение этой проблемы принципиально важно, т.к. эндотелиоциты имеют очень неоднородный по высоте рельеф. Максимальная высота (обычно несколько микрон) находится в центральной части клетки, в области локализации ядра, а при удалении от ядра, на периферии она может спадать

до нескольких сотен нанометров. Насколько велико влияние подложки при АСМ измерении механических характеристик тонких дистальных областей ЭК, до конца не ясно (рисунок 5.1).



Рисунок 5.1 - Схематичное изображение зондирования периферии культивированной на подложке ЭК.

Иногда для выявления действия различных химических веществ на механические характеристики ЭК, в том числе и на тонкой периферии, применяют метод фиксации клеток с помощью глутарового альдегида или формальдегида [202, 205]. Химическая фиксация также дает возможность визуализировать эндотелий даже в контактном режиме АСМ (рисунок 5.2); применение этого режима для изучения не фиксированных, а нативных клеток часто приводит к их разрушению.

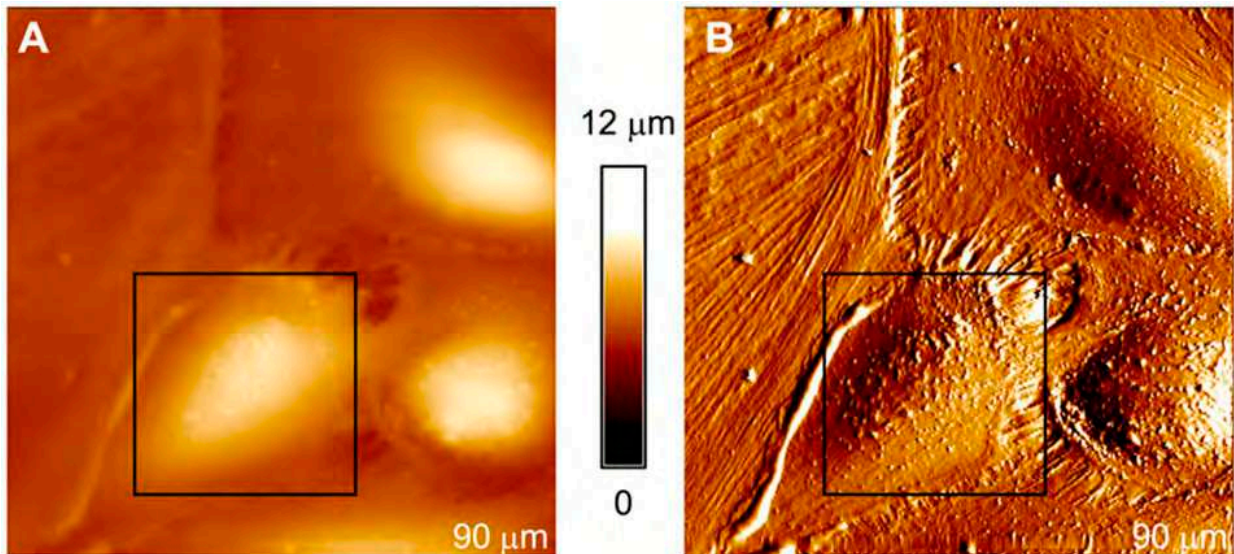


Рисунок 5.2 - АСМ изображения (А) топографии и (В) сигнала отклонения участка конфлюэнтного слоя фиксированных артериальных ЭК человеческих легких, полученные в контактном режиме [205].

В ряде случаев фиксация позволяет правильно выявить тенденцию изменений жесткости контрольных и подвергнутых воздействию различных субстанций ЭК. Тем не менее, такой результат не универсален. В [195] АСМ применялась для сравнения механических характеристик эндотелия бычьей аорты в нативном и фиксированном состояниях. Монослои ЭК подвергались действию цитохалазина Д – вещества, подавляющего полимеризацию

актиновых филаментов или ингибитора миозина II типа – блеббистатина, а затем фиксировались глутаровым альдегидом либо параформальдегидом. Снижение жесткости ядерной области эндотелия под действием цитохалазина D регистрировалось как у нативных, так и у фиксированных ЭК. Например, клетки, обработанные параформальдегидом, при инкубировании с цитохалазином D (50 нМ) демонстрировали меньшую жесткость – $3,82 \pm 0,06$ пН/нм – против $4,09 \pm 0,04$ пН/нм у контрольных ЭК. В нативных объектах ингибитор актина вызывал сходную динамику изменения жесткости: $1,26 \pm 0,03$ пН/нм и $1,76 \pm 0,02$ пН/нм у обработанных цитохалазином D (50 нМ) и контрольных ЭК соответственно. Было отмечено, что блеббистатин тоже размягчает нативный эндотелий, однако, при фиксации ЭК данный тренд не сохраняется. Авторы связывают это с тем, что активность немышечного миозина II типа носит энергозатратный характер. Таким образом, подчеркивается, что вклад актиновой компоненты цитоскелета в механические свойства ЭК можно изучать с помощью АСМ и на фиксированных образцах. Роль миозина, напротив, явно проявляется лишь у нативных объектов.

Фиксация клеток способствует преодолению временного ограничения силовых измерений в АСМ [202]. Действие некоторых веществ носит непродолжительный характер, что препятствует регистрации динамических изменений механических характеристик нативных клеток в традиционных времязатратных режимах АСМ индентирования – силовой спектроскопии и Force Volume. Решить проблему недостаточно быстрых измерений механических характеристик нативных клеток может помочь применение квазистатических режимов АСМ, обеспечивающих высокочастотное индентирование (с характерным периодом ~ 1 мс) и быстрое измерение характеристик образца.

Следует отметить, что дистальные области ЭК представляют особый интерес при исследовании механических характеристик эндотелия, т.к. свойства периферии определяют качество контактов между клетками и целостность эндотелиального монослоя. Кроме того, известно, что ядро имеет собственное подобие каркаса, скелета – так называемую, ядерную ламину, поэтому при индентировании АСМ зондом центральной части ЭК можно ожидать вклада от этой жесткой ядерной структуры в измерениях упругой реакции клетки в ответ на сдавливание.

Учитывая типичные величины деформации клеток АСМ зондом ~ 100 нм, можно предположить, что основным находящимся в зоне зондирования компонентом ЭК, который вносит решающий вклад в измеренную жесткость, является кортикальный слой. Роль кортикального слоя при измерении модуля Юнга человеческих ЭК пупочной вены (HUVES) и внутренней стенки канала Шлемма (SCEC) посредством острых и микроразмерных сферических АСМ зондов изучалась в [90]. Полученные в результате индентирования HUVES

и SCEC острыми зондами, значения модуля упругости составили соответственно $4,46 \pm 0,65$ кПа и $5,78 \pm 2,40$ кПа, а при измерении кантилеверами со сферической частицей диаметром 4,5 мкм на кончике – $1,40 \pm 0,33$ кПа и $1,18 \pm 0,31$ кПа. Такую разницу в модулях Юнга при измерении зондами с разной геометрией кончика авторы объясняют влиянием кортикального слоя ЭК. Разрушение кортикального слоя за счет добавления актин-деполимеризующего латрункулина А привело к уменьшению разницы в измеренных острым и сферическим зондами значениях модуля Юнга: отношение модулей упругости $E_{\text{острый}}/E_{\text{сферический}}$ для HUVES уменьшилось с 3,2 до 1,3, и для SCEC – с 4,9 до 4,2. В связи с полученными результатами сделан вывод, что зондирование ЭК сферическим индентором проявляет совокупную реакцию более твердого кортикального слоя и менее твердого внутреннего цитоскелета, в то время как больший модуль Юнга, измеренный острым зондом, определяется преимущественно кортикальным слоем клетки.

Для изучения роли различных белковых молекул, в частности КЛЦМ210, в механических свойствах эндотелия необходимо оценить возможность выявления различий в эффективном модуле Юнга дистальных областей нативных ЭК при добавлении веществ, регулирующих активность этих молекул. Следует выяснить, каково влияние твердой подложки на измеряемые с помощью АСМ механические характеристики ЭК, и не будет ли малая толщина объекта исследования и близость подложки препятствовать регистрации потенциальных возмущений механических свойств ЭК, вызванных введением специфических ингибиторов. Решению данной задачи может способствовать сравнение механических характеристик периферии нативных эндотелиоцитов при их обработке веществами, влияющими на отдельные составляющие цитоскелета (актиновые микрофиламенты, тубулиновые микротрубочки) и активность главного моторного белка (немышечного миозина II типа), и механических характеристик контрольных клеток. К таким веществам, например, относятся ингибиторы латрункулин В, нокодазол и блеббистатин, специфически действующие на актин, тубулин и миозин соответственно. Эти и подобные субстанции широко применяются в АСМ для исследования цитоскелета клеток, в том числе и эндотелия [143, 206, 207]. Так, учитывая, что актин является основным составляющим элементом кортикального слоя ЭК, ингибирование полимеризации актиновых микрофиламентов ожидаемо приводит к размягчению клеток [90]. Такой же тренд наблюдается и при снижении активности миозина в нативной клетке [195]. Напротив, в [208] утверждается, что применение нокодазола не вызывает снижения жесткости ЭК. Важно оценить эффект действия этих веществ на тонком периферийном слое нативных ЭК при близких значениях толщины клетки и величины индентации.

Описанное выше состояние дел позволяет дать расширенную формулировку задачи исследования следующим образом: используя метод АСМ наноиндентирования, проявить по

вариациям механических характеристик тонких дистальных областей нативных ЭК реакцию микрососудистого эндотелия на ингибиторы компонентов цитоскелета – латрункулин В, нокодазол и главного моторного белка эндотелиоцитов – блеббистатин.

При решении поставленной задачи мы, применяя индентирование в квазистатическом режиме АСМ PeakForce QNM, измеряли эффективный модуль Юнга клеток и сравнивали средние значения этого параметра у контрольных и обработанных указанными веществами ЭК. Действие специфических ингибиторов на эндотелий анализировалось по вариациям эффективного модуля Юнга клеток, определенному не только на тонкой периферии толщиной ~100 нм, но и над на порядок более высоким ядром.

Исследование микрососудистого эндотелия проводилось совместно с сотрудниками лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии ФГБУ Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва) Михаилом Васильевичем Самсоновым и д.б.н. Владимиром Павловичем Ширинским.

5.2 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ НАТИВНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ИХ ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ РЕЖИМА PEAKFORCE QNM АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

ЭК для АСМ исследования получали из микрососудов инбредных (полученных путем скрещивания близкородственных организмов) мышей породы C57BL. Клетки выделялись из мышинных легких, имеющих высокое содержание эндотелиоцитов.

Мыши сначала усыплялись изофлураном, а затем умерщвлялись отсечением головы. Их легкие извлекались и механически диспергировались, после чего полученные фрагменты легких обрабатывались 1 час в 1,5 мг/мл растворе коллагеназы А (Roche, Германия) в ДМЕМ (ПанЭко, Россия) с последующим пипетированием (≈ 100 циклов). Полученная таким образом суспензия клеток разделялась на фракции путем центрифугирования в течение 10 мин (200g), жидкая фаза удалялась.

После этого клетки инкубировались со сферическими суперпарамагнитными частицами диаметром 4,5 мкм Dynabeads Sheep anti-Rat IgG (Invitrogen, США), покрытыми специфическими для эндотелия антителами cd31, в течение 1 часа при 4–8°C, в среде ДМЕМ + FBS 2% (эмбриональная бычья сыворотка). Затем после проведения магнитной селекции клетки помещались в 100 мм чашки Петри, куда также добавляли 7–10 мл питательной среды EGM-2 MV (Lonza, Швейцария). Клетки культивировались 2–5 суток, при этом питательная среда заменялась каждые 48 часов. По достижении уровня конфлюэнтности 50–70% клетки отделяли

от подложки с помощью трипсина, а затем подвергали повторной селекции. Клетки снова переносили в 100 мм чашки Петри и выдерживали в контролируемых условиях до накопления нужного количества. Для АСМ экспериментов клетки вместе с питательной средой (1,5–2 мл) помещали в предварительно покрытые желатином (0,2%) полистироловые чашки Петри диаметром 30 мм, и до исследования в атомно-силовом микроскопе выдерживали 30 минут при температуре 37°C.

С помощью АСМ изучалась реакция нативных ЭК мышей на следующие вещества: ингибиторы актина – латрункулин В (150 нМ), тубулина – нокодазол (7 мкМ) и немышечного миозина II типа – блеббистатин (8 мкМ). Механические характеристики обработанных ингибиторами эндотелиоцитов сравнивались с аналогичными характеристиками контрольных клеток без воздействия.

Из-за специфики пробоподготовки кроме ЭК на дне чашки Петри могли оказаться и другие типы клеток: фибробласты, альвеолоциты. ЭК на подложке идентифицировались с помощью оптического микроскопа по наличию магнитных шариков, специфически связывающихся лишь с эндотелиоцитами. Учитывая функциональное назначение ЭК, неудивительно, что они склонны к образованию плотных контактов между собой и стремятся создать монослой. Однако наши образцы готовились таким образом, чтобы избежать полной конфлюэнтности клеток. Обычно АСМ исследованию подвергались несколько эндотелиоцитов, находящихся в контакте между собой. Часть АСМ кадра, как правило, занимала свободная от клеток подложка. Наличие подложки рядом с ЭК помогало подводить АСМ зонд к поверхности образца, не возмущая клетки избыточной силой при первом касании: установка большего значения силы во время приближения зонда ко дну чашки Петри помогает справиться с проблемой ложного подвода, связанной с преодолением порога отклонения кантилевера за счет вязкого сопротивления жидкости. Подложку рядом с объектами исследования при необходимости можно использовать также для корректировки чувствительности отклонения непосредственно перед сканированием клеток. Кроме того, твердая подложка в АСМ кадре помогает контролировать стабильность силовых кривых, реагировать и оперативно устранять отклонения в их форме при сбоях. Следует отметить, что во избежание появления артефактов АСМ изображений области сканирования ЭК в атомно-силовом микроскопе, как правило, выбирались таким образом, чтобы в них не попадали относительно высокие и не всегда прочно закрепленные магнитные частицы.

Были выбраны следующие параметры сканирования эндотелиоцитов в режиме PeakForce QNM: пиковая сила – 1 нН, частота и амплитуда индентирования (Peak Force Amplitude) – 250 Гц и 500 нм соответственно, частота строчного сканирования – 0,15 Гц. Типичное разрешение АСМ кадров составляло 256×64 пикселей. При перечисленных параметрах

сканирования на один полный АСМ кадр затрачивалось ≈ 7 минут. За счет относительно непродолжительной по времени механической стимуляции клеток зондом снижалась вероятность внесения возмущений в АСМ измерения из-за реакции эндотелиоцитов на деформацию.

Для зондирования ЭК применялись кантилеверы с острым кончиком Bruker SNL-(D) с паспортной жесткостью 0,06 Н/м. Константа жесткости каждого зондового датчика калибровалась посредством метода тепловых шумов перед измерением нативных клеток. Обработка силовых кривых для извлечения значений эффективного модуля Юнга осуществлялась в соответствии с моделью Снеддона для конического индентора.

Анализ усредненных значений эффективного модуля Юнга эндотелиоцитов проводился отдельно в двух областях клеток – над ядром и на периферии. Местонахождение ядра определялось по АСМ изображениям топографии как район максимальной высоты клетки. Области ЭК за исключением ядерной считались дистальными. При определении эффективного модуля упругости дистальных областей эндотелиоцитов край клеток (область по периметру клеток шириной приблизительно 5–10% от их среднего размера в плоскости подложки) из рассмотрения исключался.

За предоставление образцов с ЭК автор благодарен сотруднику лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии ФГБУ Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации Самсонову Михаилу Васильевичу.

5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ НАТИВНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

При наблюдении культивированных на желатине ЭК через инвертированный оптический микроскоп хорошо различимы ядра, а периферия клеток имеет низкий контраст по отношению к подложке, что затрудняет идентификацию границ объектов исследования. В ядерной области эндотелиоцитов зачастую наблюдались магнитные шарики, применяемые для селекции клеток (рисунок 5.3). По периметру ядер располагается эндоплазматический ретикулум, который визуализировался как скопление небольших пузырьков. Одиночные ЭК встречались редко, в основном преобладали скопления клеток.

Границы ЭК в оптическом микроскопе определялись путем варьирования положения фокуса объектива относительно образца и использования разных режимов световой микроскопии (светлого поля, фазового и интерференционного контрастов).

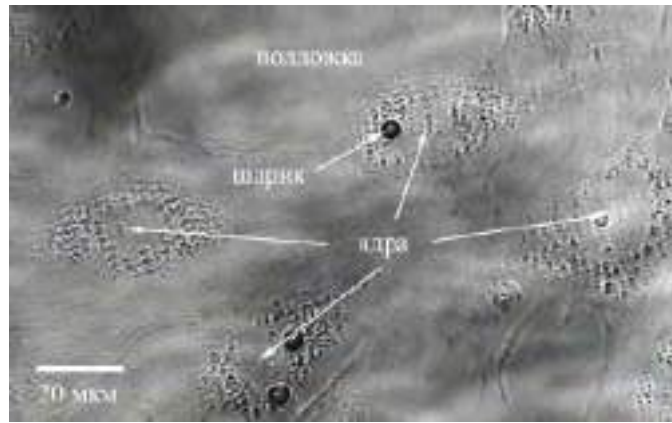


Рисунок 5.3 - Фотография эндотелиальных клеток на желатиновой подложке.

Область АСМ сканирования ЭК в режиме PeakForce QNM выбиралась так, чтобы в нее попадали ядерная, дистальная области эндотелиоцитов, а также подложка. В большинстве случаев АСМ кадры представляли собой квадраты со стороной от 50 мкм до 90 мкм.

Данные, полученные с помощью атомно-силового микроскопа, показали, что ЭК сильно распластываются по подложке. В таком состоянии эндотелиоциты имели выпуклость в центральной части, соответствующую ядру клетки, и плоскую протяженную периферию. Ядерная область характеризовалась существенно большей высотой по сравнению с дистальными районами клетки. ЭК образовывали плотные контакты с соседними эндотелиоцитами (рисунок 5.4 а). Толщина дистальных областей у уединенных клеток была меньше, чем у агрегированных эндотелиоцитов. АСМ индентирование с помощью острого зонда позволяло проявлять отдельные филаменты жесткого цитоскелета под плазматической мембраной ЭК в канале эффективного модуля Юнга (рисунок 5.4 б). В результате, картирование сигнала эффективного модуля упругости эндотелиоцитов показало его сильную неоднородность. Стоит отметить, что на рисунке 5.4 клетка, расположенная в верхнем левом углу кадра, существенно мягче своих соседей, что можно объяснить, например, тем, что она не является эндотелиальной и поэтому демонстрирует иные механические характеристики.

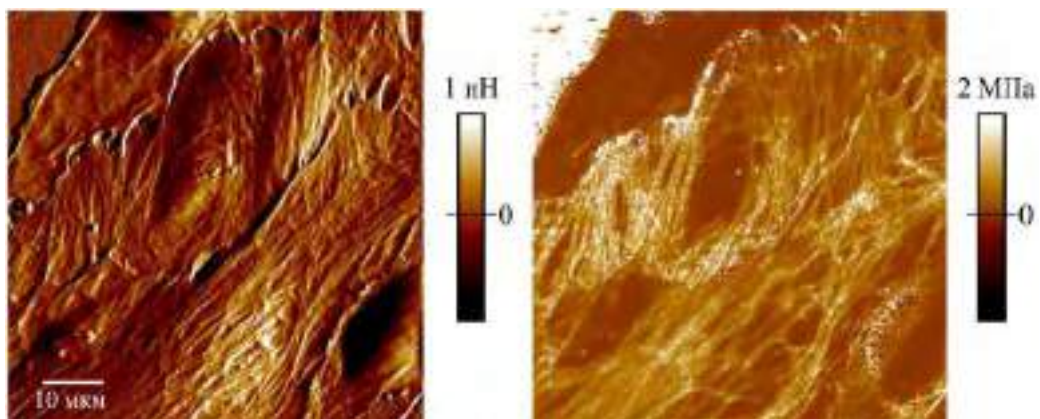


Рисунок 5.4 - АСМ изображения а) сигнала ошибки обратной связи б) эффективного модуля Юнга скопления нативных ЭК (разрешение АСМ кадра 256×256 точек).

На рисунке 5.5 а,б приведен типичный набор данных АСМ, использовавшийся для характеристики эндотелиоцитов. АСМ топография позволяет оценить соотношение высот ядерной и дистальной областей ЭК: объект в районе ядра приблизительно на порядок выше, чем на периферии. При сопоставлении изображений топографии и эффективного модуля Юнга оказывается, что эффективный модуль упругости клетки над ядром ниже, чем на удалении от центра эндотелиоцита. Также, несмотря на относительно низкое разрешение изображения, на АСМ карте эффективного модуля Юнга приведенной клетки можно заметить, что отдельные компоненты жесткого цитоскелета преимущественно ориентированы вдоль длинной оси центральной выпуклой области клетки.

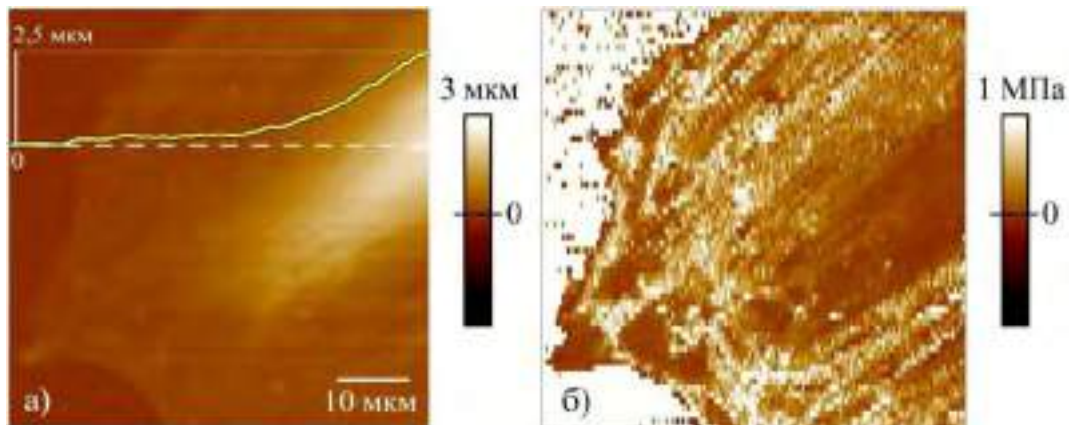


Рисунок 5.5 - АСМ а) топография и б) карта эффективного модуля Юнга нативной ЭК на желатиновой подложке.

Каждый эндотелиоцит характеризовался двумя значениями эффективного модуля Юнга. Для этого в области максимальной высоты (над ядром) и на участке между ядром и краем клетки с помощью маски выделялись соответствующие области АСМ изображений (рисунок 5.6 а,б). При наложении масок избегались склоны в районе высокого ядра, а также области артефактов АСМ изображений, связанных с магнитными шариками (при их присутствии в кадре).

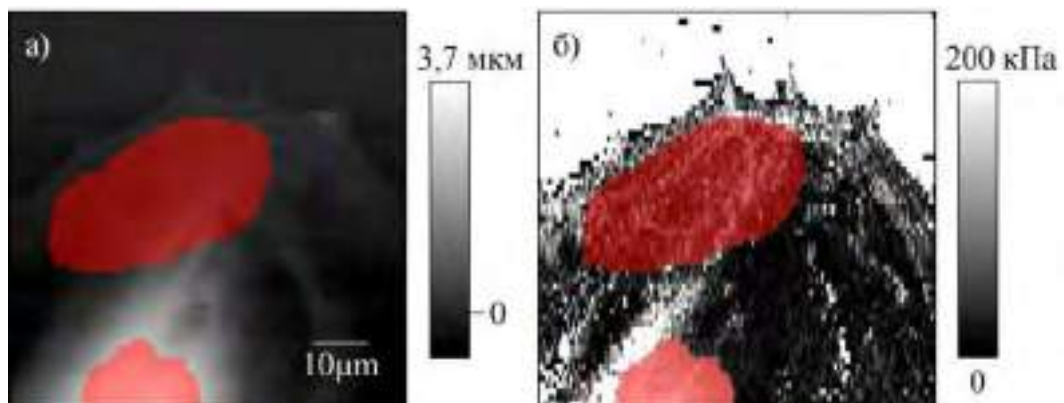


Рисунок 5.6 - АСМ изображение а) топографии б) эффективного модуля Юнга с выделенными маской ядерной и периферийной областями ЭК.

Численные значения эффективного модуля Юнга подвергались анализу на наличие выбросов. Выбросы отфильтровывались, после чего отдельно для ядерной и дистальной областей ЭК строились гистограммы эффективного модуля упругости (рисунок 5.7 а,б). Формы распределений и над ядром, и на периферии отличались от нормальной: в большинстве экспериментов гистограммы лучше аппроксимировались логнормальным распределением. Для статистического анализа величин эффективного модуля Юнга использовались медианные значения данного параметра для каждой ЭК. Затем проводилось усреднение в разных группах ЭК. Вычисленные таким образом средние значения медианных величин для контрольных и обработанных ингибиторами эндотелиоцитов сравнивались между собой.

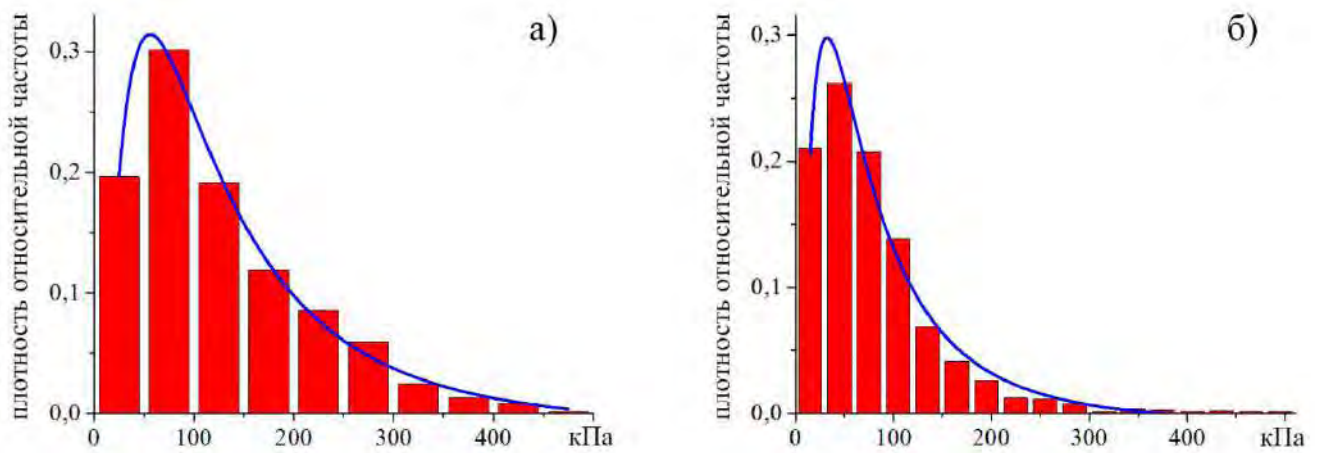


Рисунок 5.7 - Гистограммы значений эффективного модуля Юнга а) ядерной области б) периферии ЭК на рисунке 5.6.

В результате, средние медианные значения эффективного модуля упругости контрольных ЭК составили 60 ± 40 кПа ($n = 28$) и 140 ± 110 кПа ($n = 26$) над ядром и на периферии соответственно. Действие латрункулина В, ингибирующего полимеризацию актиновых микрофиламентов, привело к размягчению дистальной области эндотелиоцитов – эффективный модуль Юнга стал равен 60 ± 60 кПа ($n = 8$). Неудачный выбор областей АСМ визуализации клеток, а также артефакты сканирования на зарегистрированных кадрах привели к сильному падению объема статистики измерения эффективного модуля Юнга в центральном регионе ЭК, поэтому из-за недостаточности данных значение параметра над ядром при добавлении латрункулина В достоверно определить не удалось. Ингибирование немышечного миозина II типа блеббистатином вызвало снижение эффективного модуля упругости ядерной и дистальной областей до 50 ± 30 кПа ($n = 9$) и 90 ± 70 кПа ($n = 8$) соответственно. А вот провоцирующий деполимеризацию тубулиновых микротрубочек нокодазол привел к уменьшению эффективного модуля упругости периферии до 70 ± 60 кПа ($n = 25$), но увеличил его значение над ядром до 100 ± 70 кПа ($n = 22$).

Оценка значимости различий значений эффективного модуля Юнга контрольных и обработанных веществами-ингибиторами ЭК производилась с помощью U-критерия Манна-Уитни [209, 210]. Согласно данному критерию, значимые различия по сравнению с контрольными ЭК наблюдались на периферии эндотелиоцитов при добавлении латрункулина В ($p = 0,017$) и нокодазола ($p = 0,003$). Напротив, обработка блеббистатином не приводила к статистически значимому изменению эффективного модуля Юнга периферии ЭК ($p = 0,188$). В ядерной области эндотелиоцитов ингибиторы тубулина и немышечного миозина II типа не вызывали статистически значимых изменений величин эффективного модуля упругости ($p = 0,081$ и $p = 0,230$ для нокодазола и блеббистатина соответственно).

Для анализа распределений эффективного модуля Юнга были построены усредненные гистограммы ядерной и периферийной областей ЭК (рисунок 5.8 а,б). Гистограммы были получены путем разбиения всего диапазона значений эффективного модуля упругости клеток на отдельные интервалы и подсчета по выборкам клеток средних относительных частот попадания результатов измерения в каждый интервал. На рисунке 5.8 а положения максимумов распределения значений эффективного модуля Юнга в ядерном регионе эндотелиоцитов близки. Однако пик гистограммы для клеток после воздействия нокодазола ниже максимума в распределении контрольных объектов, что свидетельствует в пользу упрочнения эндотелиоцитов над ядром. Пик в распределении для обработанных блеббистатином ЭК, наоборот, немного выше максимума в распределении контрольных клеток. Таким образом, можно предположить, что проявляется тренд к размягчению ядерной области эндотелиоцитов при добавлении блеббистатина.

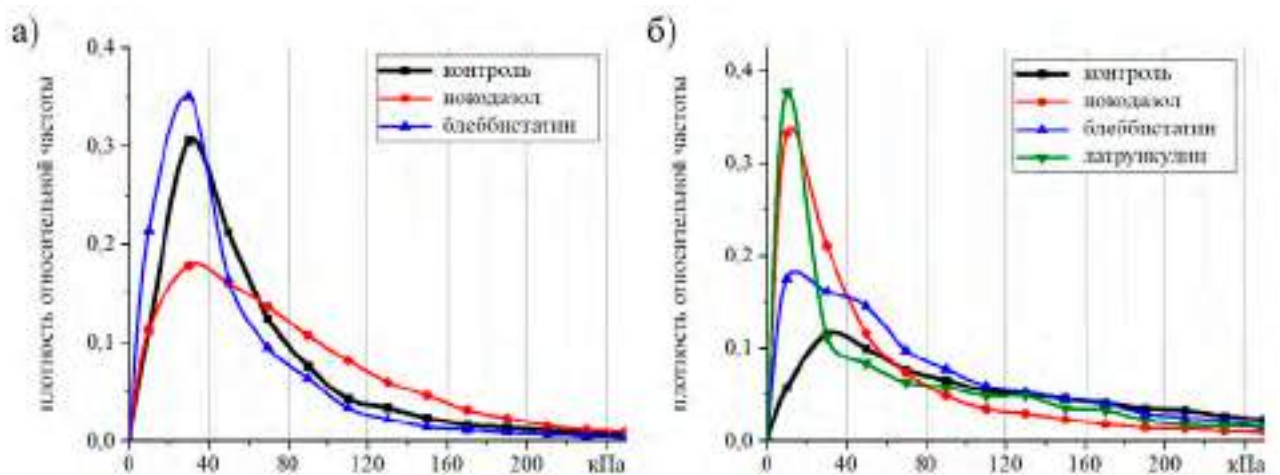


Рисунок 5.8 - Гистограммы эффективного модуля Юнга по а) ядерной и б) дистальной областям ЭК при добавлении агентов-ингибиторов компонентов цитоскелета.

Эффективный модуль Юнга на периферии у ЭК без воздействия сильно гетерогенен. Максимум распределения соответствует ≈ 30 кПа и сопровождается плавным склоном в

сторону возрастания значений эффективного модуля упругости. Неоднородность эффективного модуля Юнга периферии может быть связана, например, с особенностями архитектуры цитоскелета, влиянием твердой подложки, соскальзыванием острия зонда с цитоскелетных фибрилл при индентировании клетки.

Пик в распределении эффективного модуля упругости дистальных областей эндотелиоцитов, подвергнутых действию латрункулина В, имеет бóльшую амплитуду и смещен в сторону меньших значений (≈ 13 кПа) по сравнению с максимумом контрольных клеток. При добавлении нокодазола максимум гистограммы для периферии ЭК соответствует ≈ 15 кПа. Блеббистатин также показывает тенденцию к размягчению дистальных областей ЭК, хотя и не такому существенному, как латрункулин В и нокодазол. Распределение характеризуется максимумом эффективного модуля Юнга ≈ 16 кПа.

Следует обратить внимание на несогласованность медианных значений эффективного модуля Юнга и гистограмм распределения данного параметра. Графический анализ гистограмм позволяет сделать вывод о том, что приведенные ранее медианные значения завышены. Поскольку объем выборок клеток был не очень большой, при вычислении усредненных медианных значений вес каждого результата измерения эффективного модуля Юнга довольно велик, поэтому вклад от самых больших измеренных величин, действительно, мог привести к получению завышенных средних значений эффективного модуля упругости. Также важно учитывать, что распределения, показанные на рисунке 5.8, на самом деле представлены в усеченном виде, и значительная часть данных из области больших значений эффективного модуля Юнга просто не показана. Этим и объясняется разница между медианными значениями, вычисленными с помощью усреднения медиан отдельных клеток, и средними гистограммами, полученными описанным выше способом.

5.4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОГО МОДУЛЯ ЮНГА НАТИВНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Неоднородность высотного распределения микрососудистых эндотелиоцитов мышечных легких и, в особенности, тонкая периферия этих клеток осложняет измерение их механических характеристик с помощью АСМ. В наших экспериментах по определению эффективного модуля Юнга дистальных областей ЭК за счет индентирования эндотелиоцитов острым зондом нарушалось условие максимально допустимого соотношения величины деформации и толщины объекта исследования на уровне 10% [68]. В связи с этим, полученные численные значения эффективного модуля упругости периферии ЭК нельзя считать точными, они завышены.

На рисунке 5.9 а,б приведены АСМ топография и изображение деформации ЭК. Рассмотрение профилей высоты и деформации, отмеченных пунктирными линиями, показывает, что за исключением локальных увеличений до ≈ 250 нм, значения глубины индентирования колеблются на уровне ≈ 100 нм. Очевидно, что резкое возрастание высоты клетки в районе ядра эндотелиоцита не приводит к существенному изменению амплитуды деформации. При анализе АСМ карты распределения эффективного модуля Юнга (не показана) становится ясно, что в области индентирования АСМ зонд практически на всей поверхности клетки, включая ядерную область, взаимодействует с жесткими нитями цитоскелета. А в месте максимальной деформации жесткие цитоскелетные фибриллы отсутствуют. Таким образом, величина деформации скорее зависит не от высоты клетки, а от наличия цитоскелета в индентируемой области.

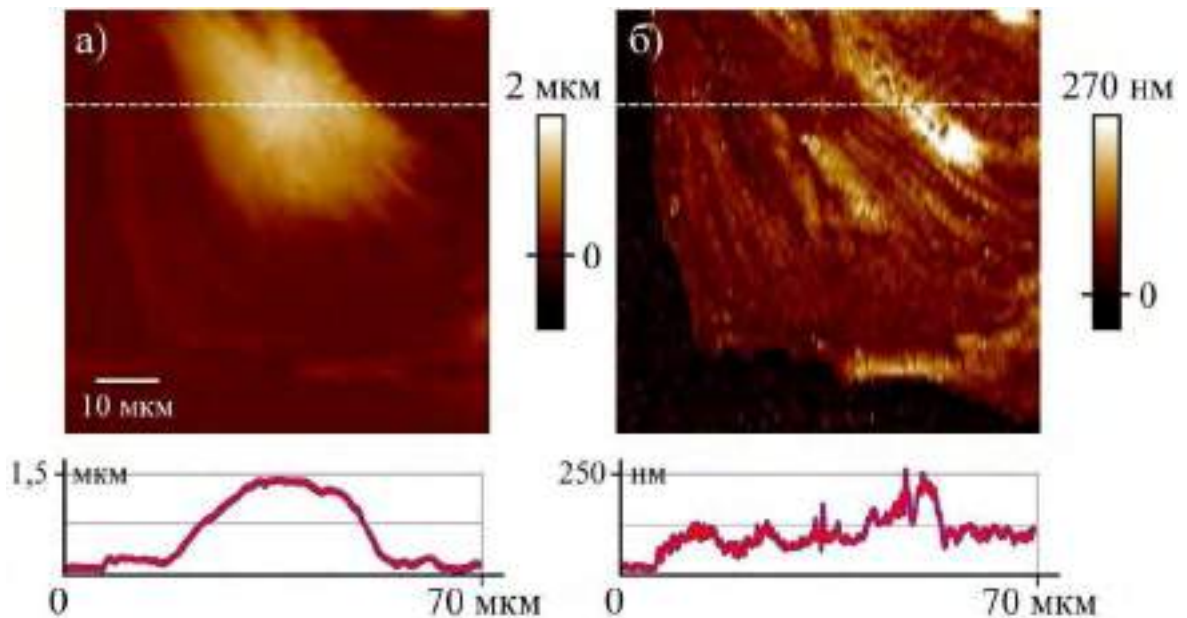


Рисунок 5.9 - АСМ изображения ЭК а) топография и профиль высоты вдоль пунктирной линии б) карта локальных деформаций и профиль деформации вдоль пунктирной линии.

Специфика ЭК не давала проводить коррекцию значений эффективного модуля Юнга, позволяющую учесть малую толщину образца, при зондировании острым индентором [151]. Т.к. эндотелиоциты в наших экспериментах имели протяженные латеральные размеры, зачастую объединялись между собой, образуя плотные контакты – подавляющую часть АСМ кадров занимали клетки, а подложка, как правило, находилась лишь в углу или с одной стороны области сканирования. Это не давало возможности при постобработке надежно выравнивать АСМ топографии клеток относительно плоскости подложки, что, в свою очередь, мешало точному установлению локальных высот объекта исследования, необходимых для применения процедуры коррекции.

Если стоит качественная задача сравнить характеристики клеток до и после какого-либо воздействия, точность измерений не всегда принципиально важна. В частности, установлению роли КЛЦМ210 в механических характеристиках эндотелия может способствовать сопоставление эффективных модулей Юнга обработанных ингибиторами данного белка ЭК и нокаутированных по КЛЦМ210 объектов с контрольными эндотелиоцитами. Для реализации данной задачи важно проверить, препятствует ли твердая подложка, на которой находятся эндотелиоциты, выявлению разницы в эффективном модуле Юнга тонких областей нативных клеток при изменении ригидности ЭК. Такая проверка заключалась в изучении влияния на эффективный модуль Юнга периферии эндотелиоцитов субстанций, ингибирующих отдельные составляющие цитоскелета: актиновые микрофиламенты, тубулиновые микротрубочки, а также основной моторный белок – немышечный миозин II типа.

При зондировании контрольных ЭК (без воздействия ингибиторов) измерения эффективного модуля Юнга показали значения параметра на периферии в 2 с лишним раза большие, чем над ядром. В принципе, такое соотношение может являться результатом вклада твердой подложки в результат измерения эффективного модуля упругости тонких дистальных областей эндотелиоцитов. Содержащаяся в литературных источниках информация о соотношении ригидностей ядерной и периферийной областей ЭК отличается противоречивостью. Например, в [200, 211] выводы совпадают с нашими: ядерный регион менее твердый по сравнению с дистальными областями эндотелиоцитов. В работах [88, 212], наоборот, указывается, что более сильную реакцию на сдавливание АСМ зондом демонстрирует центральная область клетки. В действительности, как отмечалось при анализе данных рисунка 5.9, ригидности над ядром и на периферии ЭК могут быть схожими, и их соотношение, видимо, зависит от индивидуальных особенностей клетки.

Полученные нами при сканировании в режиме PeakForce QNM значения эффективного модуля Юнга ЭК больше тех, которые имеются в литературе. Модуль упругости эндотелиоцитов в статьях других авторов оценивается в несколько килопаскалей [88, 90, 211]. У нас же он в среднем равен нескольким десяткам килопаскалей. Мы связываем такое расхождение между нашими и литературными данными с более высокой скоростью индентирования в режиме PeakForce QNM (~1 мм/с), чем в традиционных режимах силовой спектроскопии и Force Volume (~10 мкм/с). Ранее уже сообщалось о зависимости механических характеристик клеток от скорости деформации АСМ зондом: клетки при более высокой скорости индентирования кажутся тверже [98, 208]. В работе [213] было показано, что жесткость клетки возрастает на порядок при изменении скорости воздействия примерно на два порядка. Близкое соотношение наблюдается и при сравнении наших данных с литературными.

Актин-деполимеризующий латрункулин В вызвал уменьшение усредненного медианного эффективного модуля Юнга дистальных областей ЭК в $\approx 2,4$ раза. Актин является основным компонентом кортикального слоя эндотелиоцитов, и разборка микрофиламентов ожидаемо приводит к размягчению клетки. Несмотря на малую толщину периферии объекта исследования ~ 100 нм, близость твердой подложки не мешала регистрировать снижение эффективного модуля Юнга при ингибировании актиновой составляющей цитоскелета ЭК. Инактивация немышечного миозина II типа с помощью блеббистатина влечет за собой уменьшение эффективного модуля упругости эндотелиоцитов: ядерной (в $\approx 1,3$ раза) и дистальной областей (в $\approx 1,6$ раза). Таким образом, получилось, что хоть блеббистатин и вызывает размягчение удаленной от центра области ЭК, тем не менее, эффект выражен слабее, чем при применении латрункулина В. Такой результат представляется закономерным, потому что данный ингибитор непосредственно влияет не на актиновые микрофиламенты, а на моторный белок, связывающий отдельные нити актина между собой. Неожиданной оказалась реакция нативных эндотелиоцитов на обработку нокодазолом – веществом, способствующим деполимеризации тубулиновых микротрубочек. Если по сравнению с контрольными клетками эффективный модуль Юнга периферии обработанных нокодазолом эндотелиоцитов уменьшился в $\approx 2,0$ раза, то его величина над ядром не только не уменьшилась, но даже выросла в $\approx 1,5$ раза. В [208] на основании того, что разница между модулями Юнга контрольных и обработанных нокодазолом HUVEC не была статистически значимой, делается вывод, что тубулиновые микротрубочки мало влияют на модуль упругости клеток. Однако следует отметить, что при измерении модуля Юнга HUVEC клетки без воздействия имели медианный модуль Юнга 1,37 кПа, а добавление нокодазола привело к возрастанию значения параметра до 1,75 кПа. Т.е., как и в наших экспериментах, наблюдалась тенденция к увеличению модуля Юнга центральной области ЭК. Такой эффект нокодазола можно объяснить тем, что, согласно [207], он стимулирует полимеризацию актина.

Следует отметить, что гетерогенность эффективного модуля Юнга микрососудистых эндотелиоцитов приводит к большой дисперсии результатов измерения. Существенный разброс значений эффективного модуля упругости наблюдается и в области ядра, и на периферии клеток. В целом, большая дисперсия осложняет проявление различий в эффективном модуле упругости ЭК при добавлении веществ-ингибиторов.

Гистограммы эффективного модуля Юнга ядра и периферии эндотелиоцитов имеют близкие к логнормальному распределению. Ранее другие авторы также отмечали, что при измерении с помощью АСМ модуль упругости различных типов животных клеток подчиняется логнормальному закону распределения [106, 214, 208]. Можно связать это, например, с сильной гетерогенностью клеток: даже в среднем в очень мягких клетках часто присутствуют жесткие цитоскелетные структуры.

Если анализировать средние гистограммы эффективного модуля Юнга центральной и периферийной областей мышинных ЭК, то значения, соответствующие пикам распределений, оказываются меньше, чем средние медианные эффективные модули упругости. Для всех гистограмм рисунка 5.8 а,б координаты максимумов распределений не превышают 40 кПа. Положения максимумов гистограмм над ядром и на периферии в контроле близки. Однако высота пика периферийной области существенно меньше, что указывает на бóльшую гетерогенность эффективного модуля упругости. У ЭК, обработанных нокодазолом, пик распределения эффективного модуля Юнга периферии расположен левее пика, характеризующего центральную область эндотелиоцитов, что свидетельствует в пользу более твердой ядерной области и более податливой периферии. Стоит отдельно рассмотреть случай с блеббистатином. Среднее медианное значение эффективного модуля Юнга на ядре больше, чем на периферии, а пик в гистограмме на ядре оказывается правее, чем пик на гистограмме периферии. Мы связываем это расхождение с проявлением существенно большей гетерогенности дистальных регионов ЭК по сравнению с ядром, т.к. распределение на периферии характеризуется искаженной формой и относительно небольшой амплитудой максимума с плавным убыванием в сторону больших значений. Добавление ингибиторов мало влияет на положения максимумов распределений ядерной области ЭК относительно контрольных эндотелиоцитов, однако, амплитуда пиков изменяется – существенно уменьшается в экспериментах с нокодазолом и немного увеличивается у клеток с блеббистатином.

На удалении от центра ЭК эффект ингибиторов выражен ярче, чем над ядром: действие веществ сопровождается смещением максимумов в сторону меньших значений эффективного модуля упругости, а также значительным увеличением амплитуды пиков гистограмм. Наиболее явное смягчение дистальных областей эндотелиоцитов наблюдается при обработке клеток латрункулином В и нокодазолом.

Если предположить, что в измеренный эффективный модуль Юнга периферии контрольных ЭК определяющий вклад вносит твердая подложка, то дезинтеграция жестких цитоскелетных структур – актиновых микрофиламентов и тубулиновых микротрубочек (с помощью латрункулина В и нокодазола соответственно) – либо не должна существенно сказываться на эффективном модуле упругости дистальных областей эндотелиоцитов, либо должна привести к его увеличению за счет более глубокого проникновения острого зонда в клетку и, следовательно, сокращения расстояния между индентором и подложкой. Мы же, наоборот, при добавлении ингибиторов компонентов цитоскелета наблюдали размягчение удаленных от центра районов ЭК. Это доказывает, что твердая подложка не играет ключевой роли при определении эффективного модуля Юнга периферии эндотелиоцитов и не скрывает уменьшение эффективного модуля упругости под действием специфических ингибиторов

цитоскелета. Следует отметить, что помимо микрофиламентов и микротрубочек одной из составляющих цитоскелета также являются состоящие из белка виментина промежуточные филаменты, вклад которых в измеряемый эффективный модуль Юнга при ингибировании полимеризации актина или тубулина может возрастать.

Таким образом, наши исследования показали, что АСМ в режиме PeakForce QNM позволяет достоверно регистрировать изменения механических характеристик (эффективного модуля Юнга) нативных микрососудистых ЭК мышечных легких в ответ на обработку эндотелиоцитов различными ингибиторами даже на периферии клеток с толщиной ~ 100 нм.

Измерения, однако, осложняются большой дисперсией значений при детектировании эффективного модуля упругости ЭК. Статистически значимые (по U-критерию Манна-Уитни) различия в эффективном модуле Юнга периферии ЭК наблюдались при обработке клеток латрункулином В и нокодазолом. На блеббистатин эндотелиоциты отреагировали слабее: уменьшение медианного значения эффективного модуля упругости дистальных областей клеток в присутствии блеббистатина по сравнению с контрольными объектами не было статистически значимым. Это приводит к выводу, что компоненты цитоскелета (актиновые микрофиламенты и тубулиновые микротрубочки) имеют большее влияние на эффективный модуль Юнга периферийной области ЭК, нежели моторный белок немышечный миозин II типа.

Согласно полученным результатам, самый весомый вклад в эффективный модуль упругости дистальных регионов клеток вносит актин, поскольку ингибирование его полимеризации приводит к наиболее выраженному размягчению. Выявленное сильное влияние фибриллярного актина на модуль Юнга клеток согласуется с современными представлениями [215–217].

Наконец, подчеркнем, что показанная возможность детектирования изменений эффективного модуля Юнга тонких удаленных от центра областей эндотелиоцитов, открывает доступ к изучению роли отдельных типов белковых молекул в регуляции механических характеристик этих клеток. С учетом этого, мы провели эксперименты по выявлению влияния КЛЦМ210 и альтернативного активирующего миозин фермента ROCK на механические характеристики эндотелиоцитов. Для этого, во-первых, к клеткам мышей породы C57BL применялись вещества, специфически подавляющие активность данных белков, а, во-вторых, исследовались эндотелиоциты нокаутного типа, выделенные из мышей, не экспрессирующих КЛЦМ210 [218]. Полученные результаты будут представлены в диссертации на соискание научной степени кандидата биологических наук Самсонова М.В. «Исследование роли каталитического и некаталитического доменов 210 кДа киназы легких цепей миозина в регуляции проницаемости эндотелия сосудов».

6. АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ НА НАТИВНЫЕ СЕНСОРНЫЕ НЕЙРОНЫ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИМ ЭФФЕКТОМ

6.1 ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОБЪЕКТОВ КЛЕТОЧНОЙ НЕЙРОБИОЛОГИИ

Одним из динамично развивающихся направлений АСМ является тестирование реакции клеток на химические вещества [219, 220], в том числе на фармакологические препараты [221, 222] в физиологически адекватных условиях. Изучение отклика индивидуальных клеток в ответ на лекарственные субстанции перспективно не только с точки зрения проявления механизмов взаимодействия вещества с клеткой, но и полезно для оценки эффективности, а также проверки безопасности тестируемой субстанции для нативного объекта. Предоставляемые АСМ данные о морфологии и механических характеристиках клеток позволяют судить о влиянии того или иного агента как на поверхность (мембрану) клеток, так и на их нижележащие внутренние слои.

АСМ сейчас широко используется для изучения объектов клеточной нейробиологии (cellular neuroscience) [223] – науки, занимающейся исследованием клеток нервной системы – нейронов. С нарушениями в работе нервной системы связано множество тяжелых заболеваний, в числе прочих болезней Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсия и другие. Изучение единичной составляющей нервной системы, нейрона, представляет большой интерес, т.к. позволяет разобраться на клеточном уровне в причинах возникновения и путях развития нервных патологий. АСМ, как один из методов исследования клетки, способствует пониманию процессов в индивидуальных нейронах, поэтому его все чаще применяют для изучения свойств нервных клеток в здоровом и патологическом состояниях. Обзоры по АСМ изучению нейронов представлены в [224, 225]. Кроме нейронов с помощью АСМ также исследуют вспомогательные клетки нервной ткани – глию [226–228].

В работе [100] исследованию подверглись нативные нейроны трех типов: кортикальные эмбрионов крысы, спинномозговых (спинальных) ганглиев куриных эмбрионов, а также линии Р-19 (клетки эмбриональной карциномы мыши). Картирование модуля Юнга этих клеток острым зондом показало, что кортикальные и Р-19 нейроны демонстрируют сходный диапазон значений модуля Юнга – 0,1–2,0 кПа со средними величинами 0,2 кПа и 0,4 кПа соответственно. Нейроны спинальных ганглиев имели как больший средний модуль упругости – 0,9 кПа, так и более широкое распределение данного параметра – 0,1–8,0 кПа. В экспериментах по АСМ исследованию кортикальных нейронов было обнаружено, что при удлинении отростков нейрона (нейритов) тело клетки локально упрочняется в местах,

непосредственно примыкающих к отросткам. Путем сопоставления АСМ карт распределения модуля Юнга нейронов и данных флуоресцентной микроскопии установлено, что наблюдаемое упрочнение связано с динамическими перестройками тубулиновых микротрубочек.

Нативные нейроны спинальных ганглиев и симпатические нейроны куриных эмбрионов стали объектами исследования работы [96]. С помощью острых АСМ зондов визуализировалась топография и измерялся модуль Юнга сомы нативных нейронов, а также клеток, подвергнутых действию нейротоксина акролеина, который образуется при травмах головного мозга [224]. В результате, средний модуль Юнга сомы нейронов без воздействия составил ≈ 60 кПа, а клетки после действия акролеина, в отличие от контрольных клеток, постепенно размягчались (модуль упругости снижался) и откреплялись от подложки.

Изучению морфологии и механических свойств конусов роста (структур на конце нейритов) мышечных сенсорных нейронов спинальных ганглиев после повреждения седалищного нерва *in vivo* посвящено исследование [133]. Для АСМ зондирования нативных нейронов использовались острые инденторы. Распределения значений модуля Юнга аппроксимировались двумя Гауссианами. АСМ данные показали уменьшение модуля упругости конусов роста сенсорных нейронов после травматического воздействия ($2,9 \pm 0,3$ кПа; $13,0 \pm 1,5$ кПа) по сравнению с контрольными измерениями образцов со здоровыми клетками ($16,5 \pm 0,4$ кПа; $33,5 \pm 0,8$ кПа). Размягчение конусов роста после повреждения связано с изменениями архитектуры цитоскелета из-за модификации его микротрубочечной компоненты.

В работе [229] АСМ зонд использовался не только для визуализации нейронов спинальных ганглиев куриных эмбрионов, но и как инструмент для механического повреждения клеток с целью последующей оценки их состояния. Было обнаружено, что, при нарушении целостности плазматической мембраны тела клетки, нейрон в течение короткого времени погибал. Тогда как, прокол зондом конечной части нейрита, не приводил к необратимым фатальным изменениям.

В [125] с помощью АСМ и флуоресцентной микроскопии исследовалась реакция индивидуальных нативных нейронов спинальных ганглиев на механическую стимуляцию сомы клеток и окончаний их нейритов. Отклик нейронов на индентирование АСМ зондом со сферической частицей диаметром 10 мкм оценивался по возрастанию внутриклеточной концентрации ионов кальция. Для визуализации ионов Ca^{2+} в нативных клетках использовался флуоресцентный индикатор кальция Fluor. Нейроны деформировались АСМ зондом и, одновременно, посредством флуоресцентного микроскопа регистрировались изменения концентрации свободного кальция в клетках. Исследования показали, что механочувствительностью обладают и сома, и нейриты нервной клетки: приложение к соме и

нейритам силы $\approx 200\text{--}300$ пН приводит к притоку ионов кальция внутрь нейрона. Интересно, что аналогичная реакция повышения концентрации кальция наблюдается не только в зондируемой клетке, но и в соседних нейронах, что указывает на то, что культивированные нервные клетки связаны между собой. Отмечается также, что уровень повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} зависел от величины приложенной силы.

Высокоскоростная АСМ была применена для визуализации дендритов нативных нейронов гиппокампа [230]. Благодаря высокому временному разрешению использованного метода (несколько секунд на кадр) в данной работе была зарегистрирована динамика морфологических изменений дендритов: образование и обратное втягивание филоподий, формирование мембранных везикул при эндоцитозе, процесс развития дендритного шипика.

Таким образом, АСМ доказала свою полезность и высокую информативность в клеточной нейробиологии, благодаря чему сейчас активно используется для визуализации морфологии и измерения ригидности сомы индивидуальных нейронов и их конусов роста. Интересной задачей для АСМ может стать исследование действия на нативные нейроны веществ с анальгетическими свойствами.

Одной из функций нейронов является передача болевых сигналов. Если острая боль несет пользу, помогая избегать различных повреждающих воздействий, то хроническая боль влияет на организм в большинстве случаев негативно. Хроническая боль высокой интенсивности может сопровождать онкологические заболевания, травмы, абстинентные синдромы. Хроническую боль часто купируют с помощью обезболивающих препаратов. Как правило, высокоэффективные болеутоляющие средства – это опиоиды, наркотические вещества, применение которых влечет серьезные негативные последствия. Отметим, что на вершине, так называемой лестницы обезболивания (pain ladder) Всемирной организации здравоохранения для снятия наиболее сильной боли в терапию добавляются такие сильнодействующие опиоиды как морфин, диаморфин (героин), фентанил, оксиморфон и др. [231]. Актуальной проблемой современной науки является создание принципиально новых обезболивающих веществ, характеризующихся одновременно высокой эффективностью и минимальными побочными эффектами.

За передачу болевых импульсов в организме ответственны сенсорные (афферентные) нейроны, тела которых находятся в спинальных ганглиях (нервных узлах) спинного мозга. Сенсорные нейроны принимают сигнал от периферических рецепторов – дендритных окончаний и передают его в центральную нервную систему. Как следствие, эти нервные клетки являются основным объектом изучения при разработке и тестировании обезболивающих препаратов [232, 233]. Недавно было показано, что такое вещество как коленовая кислота обладает анальгетическим действием и позволяет эффективно купировать хроническую боль

[234]. На основе данной субстанции был создан синтетический ненаркотический анальгетик «Аноцептин», который в настоящее время находится на стадии клинических испытаний [235]. Еще одним перспективным веществом для анальгезии может являться убаин в низкой (наномолярной) концентрации: ранее было показано, что данная субстанция в низких концентрациях снижает потенциалочувствительность (возбудимость) медленных натриевых каналов, ответственных за кодирование болевых сигналов у теплокровных животных [236]. Действие на клетку коеновой кислоты и убаина происходит через активацию внутриклеточных каскадных процессов и приводит к экспрессии ряда генов [234, 237, 238]. В связи с этим, данные вещества могут влиять на рост, развитие и пролиферацию клеток различных тканей [238, 239, 240]. Эффективность данных веществ при снижении потенциалочувствительности сенсорных нейронов считается доказанной, однако механизмы влияния коеновой кислоты и убаина на клетки до конца не ясны. АСМ является одним из методов, способных помочь в оценке действия этих субстанций на морфологию и механические характеристики сенсорных нейронов в физиологически адекватных условиях.

Режим АСМ PeakForce QNM может предоставить возможность изучения действия веществ с анальгетическими свойствами на механические характеристики нативных сенсорных нейронов с более высоким разрешением, чем силовая спектроскопия и Force Volume. Однако неизвестно, как гораздо более быстрое индентирование в PeakForce QNM скажется на измерении эффективного модуля Юнга нервных клеток и позволит ли выявить эффект применения исследуемых веществ (при его наличии). Учитывая результаты по исследованию других типов клеток, можно предположить, что определение эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов в режиме PeakForce QNM приведет к получению больших значений по сравнению с измерениями в режимах медленного АСМ индентирования (силовая спектроскопия, Force Volume). Тем не менее, для подтверждения или опровержения этой гипотезы необходимо провести ее проверку.

В данной работе была предпринята попытка оценить эффективность применения АСМ в режиме PeakForce QNM для изучения влияния веществ, обладающих анальгетическим действием – коеновой кислоты и убаина – на морфологию и механические свойства нативных сенсорных нейронов куриных эмбрионов.

6.2 МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ЗОНДИРОВАНИЮ НАТИВНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ

Для АСМ исследования сенсорные нейроны спинальных ганглиев выделяли из 10–12-дневных куриных эмбрионов породы Белый Леггорн. Ганглии извлекали из областей L5-S1

пояснично-крестцового отдела спинного мозга куриных эмбрионов и помещали в раствор Хенкса. Затем производилась диссоциация ганглиев путем их пипетирования при 4°C. Полученная клеточная суспензия помещалась в питательную среду, содержащую раствор Хенкса (45%), среду Игла (40%), фетальную бычью сыворотку (15%), а также инсулин (0,5 ЕД/мл), глюкозу (0,6%), глютамин (2 мМ), гентамицин (100 ЕД/мл) и фактор роста нервов 7S (10 нг/мл) (Sigma, США). Нейрональные клетки удаляли, позволяя им оседать на поверхности пластика 90-мм чашки Петри в течение 25 минут при 37°C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония). Суспензию нейронов высевали на 40-мм чашки Петри с модифицированным дном, клетки помещали в инкубатор и в течение 3-х суток культивировали при 37°C и 5% CO₂). В результате, 40-мм чашки Петри помещались в атомно-силовой микроскоп, где полученные описанным способом образцы с клетками подвергались исследованию.

Для лучшей адгезии нейронов дно 40-мм чашек Петри было покрыто коллагеном с фибронектином или поли-L-лизинном. В первом случае, дно чашек сначала обрабатывали 7 мкг/мл раствором коллагена. Через час сформированную коллагеновую пленку покрывали фибронектином (10 мкг/мл) (Биолот, Россия). Второй тип подложки получали путем обработки чашек Петри 0,01% раствором поли-L-лизина (Sigma, США).

В части экспериментов в культуральную среду добавлялась коленовая кислота в концентрации 10⁻⁸ М или убаин (Sigma, США) в концентрации 10⁻¹⁰ М. Контрольные нейроны культивировали в условиях питательной среды стандартного содержания.

Для АСМ визуализации топографии нейронов, а также измерения механических характеристик клеток использовались острые зонды с низкой жесткостью: Bruker SNL-(C) и -(D), DNP-(C), а также AppNano Nitro-Tall-V-G-(A) с номинальными коэффициентами жесткости 0,24; 0,06; 0,24 и 0,16 Н/м соответственно. Перед проведением АСМ экспериментов с клетками константа жесткости каждого зондового датчика калибровалась методом тепловых шумов. Т.к. для индентирования сенсорных нейронов использовались острые зонды, эффективный модуль упругости вычислялся в соответствии с моделью Снедонна для упругого контакта конус-плоскость.

АСМ эксперименты с сенсорными нейронами проводились в культуральной среде с постоянным термостатированием образца при 37°C. Клетки сканировались в режиме PeakForce QNM с пиковой силой 1–2 нН. Снижение действия гидродинамических сил со стороны жидкой среды на колеблющийся зонд достигалось за счет выбора минимальной частоты вертикального движения кантилевера 250 Гц. Частота построчного сканирования устанавливалась на уровне 0,1 Гц. Разрешение АСМ скана нейронов составляло не менее 128×128 точек. В результате, сканирование одной клетки занимало около 20 минут.

Анализировались карты эффективного модуля Юнга нейронов, которые имели размер от $20 \times 20 \text{ мкм}^2$ и больше; области АСМ визуализации старались выбирать таким образом, чтобы сома нейрона попадала в АСМ кадр целиком.

Выбор сенсорных нейронов для изучения с помощью АСМ, а также позиционирование кантилевера относительно клеток производились в режимах светлого поля и фазового контраста световой микроскопии. Кроме того, оптический микроскоп также позволял контролировать состояние нейронов в процессе проведения АСМ экспериментов. Для АСМ сканирования выбирались как индивидуальные сенсорные нейроны, так и клетки, имеющие контакт с другими нейронами. АСМ исследование проводилось преимущественно на небольших по размеру сенсорных нейронах, т.к. крупные клетки могли превышать длину иглы зондового датчика, что привело бы к нежелательной дополнительной стимуляции объектов исследования консолью зонда. Следует отметить разницу, как в размере, так и в форме сомы нейронов: у разных клеток сома варьировалась по длине и максимальному диаметру, соответствующему центральной области тела клетки. Длина нейритов от нейрона к нейрону также различалась.

Каждый нейрон характеризовался средним значением эффективного модуля упругости, а также распределением данного параметра по соме клетки. При статистическом анализе средних значений эффективного модуля Юнга для оценки различий между группами нейронов применялся U-критерий Манна-Уитни.

Ранее было показано, что нейроны спинальных ганглиев куриных эмбрионов при комнатной температуре начинают демонстрировать заметные отклонения от исходных свойств спустя 4 часа после старта экспериментов [96]. В связи с этим, в нашем исследовании АСМ эксперименты с нативными сенсорными нейронами продолжались не более 2–3 часов.

За подготовку образцов нативных сенсорных нейронов автор выражает благодарность сотруднице лаборатории физиологии возбудимых мембран ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН с.н.с., к.б.н. Валентине Альбертовне Пеннийнен.

6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ НАТИВНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

Сенсорный нейрон – объект веретенообразной формы. Такая нервная клетка относится к типу псевдоуниполярных нейронов, т.е. от тела клетки (сомы) отходят два отростка – нейрита (аксон и дендрит) (рисунок 6.1).

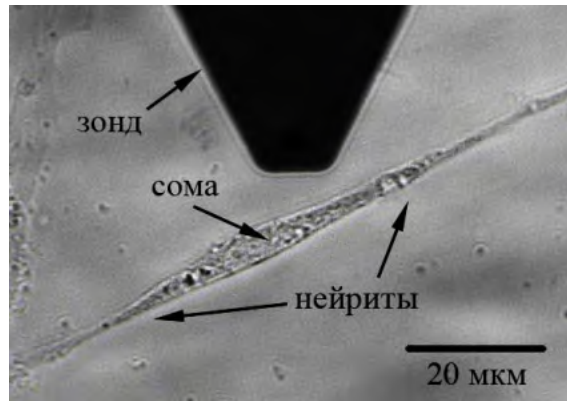


Рисунок 6.1 - Фотография нативного сенсорного нейрона.

Анализ экспериментальных АСМ данных показал, что в большинстве случаев распределения эффективного модуля Юнга по поверхности сомы нейронов были близки к нормальному (рисунок 6.2 а,б). Для характеристики клеток использовались средние значения эффективного модуля упругости по телу нейронов.

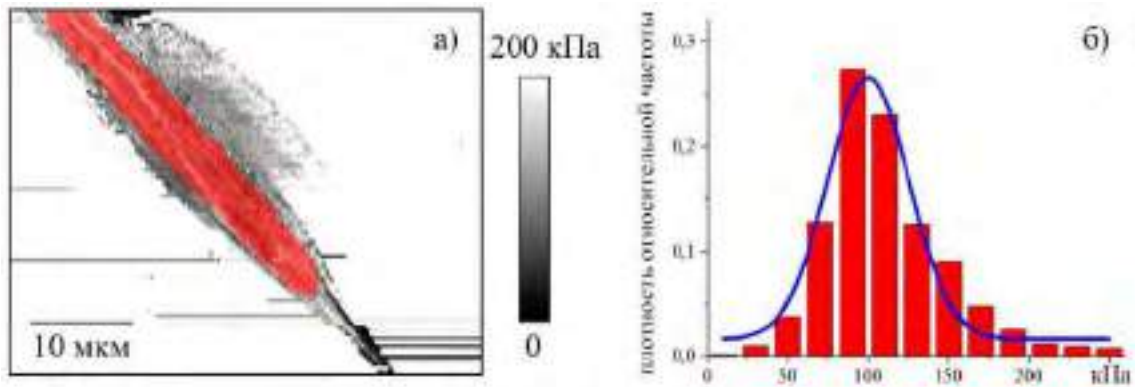


Рисунок 6.2 - а) АСМ карта эффективного модуля Юнга нативного сенсорного нейрона б) гистограмма распределения эффективного модуля Юнга по области, обозначенной маской на а.

В первой серии экспериментов для иммобилизации сенсорных нейронов использовалась подложка из коллагена и фибронектина. Из-за характерной для нейронов формы с резким перепадом высот, а также недостаточно надежного закрепления на подложке, при попытке АСМ сканирования полного тела клетки многие нейроны откреплялись от дна чашки Петри в результате взаимодействия с зондом. В связи с этим, для снижения вероятности отрыва нейрона от фибронектина область сканирования уменьшалась таким образом, чтобы захватить лишь часть сомы клетки.

В АСМ экспериментах на коллагене с фибронектином исследовались две группы нейронов: контрольные клетки без воздействия и нейроны после культивирования с убаином (10^{-10} М). В каждой экспериментальной группе было исследовано по 15 сенсорных нейронов. Анализ АСМ топографий не выявил существенных различий между контрольными клетками и нейронами после воздействия убаина. Рассмотрение АСМ карт распределения эффективного

модуля Юнга обнаружило сильную неоднородность распределения значений данного параметра по поверхности нейронов. Сравнение средних эффективных модулей упругости сенсорных нейронов, культивированных с убаином в концентрации 10^{-10} М, показало тенденцию к упрочнению по отношению к контролю. Средние значения эффективного модуля Юнга были равны соответственно 41 ± 34 кПа и 31 ± 23 кПа. Такая разница, согласно U-критерию Манна-Уитни, не является статистически значимой ($p = 0,25$). При построении усредненных распределений параметра тренд упрочнения также наблюдали по уменьшению высоты максимума эффективного модуля упругости сенсорных нейронов с $\approx 0,32$ в контроле до $\approx 0,24$ после воздействия убаина (рисунок 6.3).

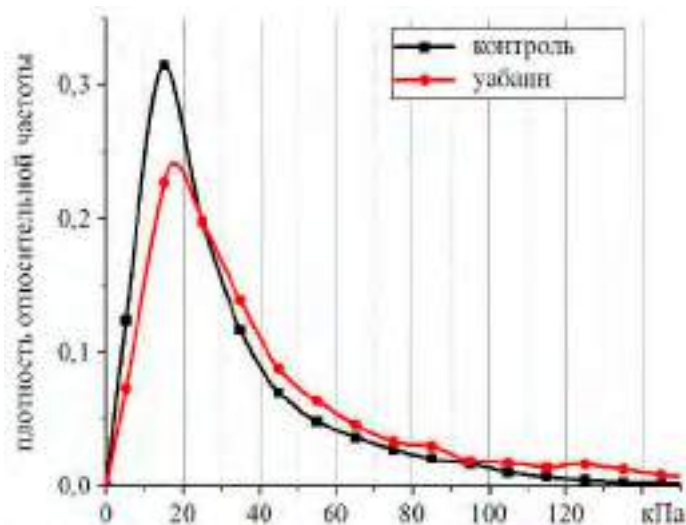


Рисунок 6.3 - Средние распределения эффективного модуля Юнга по соматическим сенсорным нейронам, иммобилизованных на подложке из коллагена с фибронектином в контроле и после воздействия убаина (10^{-10} М).

Учитывая небольшое количество клеток в выборке, малую величину разницы средних эффективных модулей упругости сенсорных нейронов, контрольных и после действия убаина, а также принимая во внимание недостаточную надежность прикрепления клеток к подложке, мешающую АСМ визуализации сомы клеток, была предпринята попытка верифицировать полученный результат по упрочнению сенсорных нейронов после воздействия убаина. Для этого была поставлена серия экспериментов с клетками на другом типе подложки – поли-L-лизине.

Сравнивали характеристики контрольных и подвергнутых действию убаина (10^{-10} М) или коеновой кислоты (10^{-8} М) сенсорных нейронов, культивированных на полилизининовом покрытии. По сравнению с подложкой из коллагена с фибронектином покрытие дна чашки Петри поли-L-лизинином обеспечивало более эффективную адгезию сенсорных нейронов. Клетки не отделялись от дна чашки во время АСМ зондирования и стабильно выдерживали сканирование полной сомы.

Как правило, в наших экспериментах ось быстрого АСМ сканирования выбиралась перпендикулярной оси сомы сенсорных нейронов. Из-за выпуклой формы, характеризующейся сильным перепадом высоты, визуализация нейронов часто сопровождалась артефактами на АСМ изображениях. В частности, вследствие неравномерности деформации клетки вдоль строки сканирования (завышения глубины индентирования на подъеме и занижения на спуске), эффективный модуль Юнга на краях сомы мог определяться неверно. Поэтому при обработке АСМ данных анализировалась лишь приосевая область нейрона.

Типичный набор данных, который использовался для характеристики нервных клеток, представлен на рисунке 6.4. Измерялись такие геометрические характеристики сомы клеток как длина и максимальная высота, а также механические характеристики тела нейрона – распределение эффективного модуля упругости и среднее значение данного параметра.

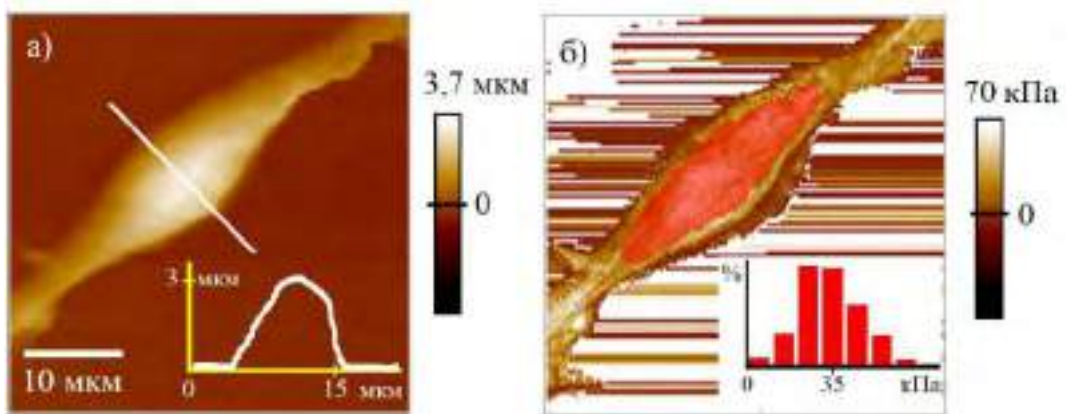


Рисунок 6.4 - АСМ изображения нативного сенсорного нейрона: а) топография (во вставке показан профиль высоты клетки) б) распределение эффективного модуля Юнга (во вставке – распределение значений эффективного модуля Юнга по выделенной области клетки).

Анализ оптических изображений, а также АСМ топографий сенсорных нейронов не выявил явных различий в морфологии между исследованными группами клеток. Так, средняя длина сомы контрольных нервных клеток составила 29 ± 7 мкм ($n = 40$), после воздействия убаина (10^{-10} М) – 30 ± 6 мкм ($n = 19$) и коеновой кислоты (10^{-8} М) – 28 ± 5 мкм ($n = 31$). Аналогично, практически не было различий и в максимальной высоте сомы измеренных клеток: $3,1 \pm 0,9$ мкм ($n = 30$), $3,2 \pm 0,6$ мкм ($n = 14$) и $3,1 \pm 0,6$ мкм ($n = 19$) соответственно.

Рассмотрение АСМ данных об эффективном модуле Юнга показало, что нейроны в контрольной группе и клетки, культивированные в присутствии коеновой кислоты (10^{-8} М), демонстрируют очень близкие средние значения данного параметра: 115 ± 90 кПа ($n = 30$) и 120 ± 97 кПа ($n = 21$). Однако убаин оказывал на сому сенсорных нейронов упрочняющее действие. Средний эффективный модуль упругости клеток после воздействия убаина вырос до 172 ± 109 кПа ($n = 15$). Следует отметить, что ни после действия коеновой кислоты, ни

уабаина по U-критерию Манна-Уитни эффективные модули Юнга сенсорных нейронов статистически значимо не отличались от значений данного параметра у контрольных клеток ($p = 0,95$ и $p = 0,08$ соответственно).

Усредненные распределения значений эффективного модуля упругости сомы сенсорных нейронов представлены на рисунке 6.5. Амплитуды пиков контрольных клеток и нейронов, культивированных в присутствии коеновой кислоты (10^{-8} М), практически не различаются. А максимум распределения нервных клеток после воздействия уабаина (10^{-10} М), существенно ниже, что свидетельствует об увеличении среднего эффективного модуля Юнга. Таким образом, данные об упрочнении сомы клеток, полученные на подложке из полилизина, подтверждают результат, который мы обнаружили ранее на альтернативном покрытии дна чашки Петри. Следует отметить, что, как и в случае измерений на бислое из коллагена с фибронектином, наблюдалась большая дисперсия значений эффективного модуля упругости по поверхности сомы сенсорных нейронов.

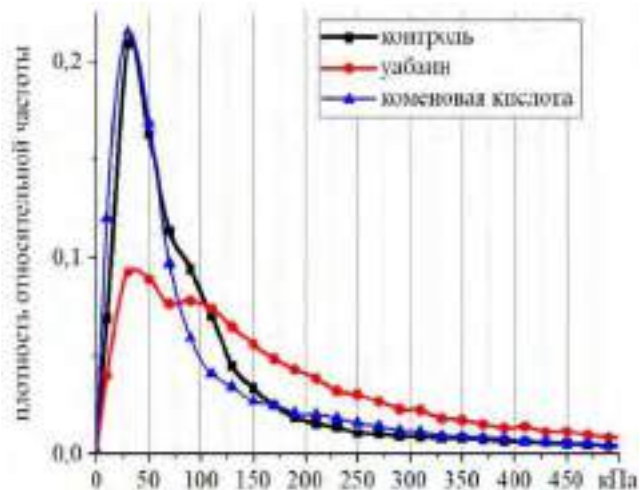


Рисунок 6.5 - Средние распределения эффективного модуля Юнга по соме сенсорных нейронов на полилизинной подложке в контроле ($n = 30$), после воздействия уабаина (10^{-10} М, $n = 13$) или коеновой кислоты (10^{-8} М, $n = 23$).

Интересно, что распределения и средние значения эффективного модуля Юнга по поверхности сомы сенсорных нейронов в экспериментах с коллаген-фибронектиновым и полилизинным покрытием значительно различались. Если сравнивать положения пиков распределения контрольных клеток на двух типах подложки, оказывается, что у нейронов на полилизине максимум распределения смещен в сторону больших значений: ≈ 30 кПа против ≈ 15 кПа у клеток на фибронектине. Поскольку модели зондов в экспериментах были неодинаковыми (SNL-(C) на слое из коллагена и фибронектина, а SNL-(D) на полилизине), полученная разница в значениях эффективного модуля упругости клеток могла быть также связана с характеристиками применяемых кантилеверов. Поэтому было решено проверить

зависимость эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов от модели используемого зондового датчика. Для этого, клетки на полилизине подвергли АСМ сканированию тремя типами зондов с консолями треугольной формы: Bruker SNL-(D), Bruker DNP-(C) и AppNano Nitra-Tall-V-G-(A) (таблица 2).

Таблица 2 Паспортные характеристики использованных типов зондов

Модель зонда	Bruker SNL-(D)	Bruker DNP-(C)	AppNano Nitra-Tall-V-G-(A)
Коэффициент жесткости, Н/м	0,06	0,24	0,16
Длина кантилевера, мкм	205	120	105
Длина иглы, мкм	2,5–8,0	2,5–8,0	14–16
Радиус кончика, нм	2	20	< 30

На рисунке 6.6 а представлены распределения эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов, полученные в результате индентирования клеток зондами разных моделей. Согласно полученным данным, использование кантилеверов с отличающимися характеристиками приводит как к различию в положении пиков, так и неодинаковой дисперсии эффективного модуля Юнга. Максимальными пиковым значением и дисперсией характеризуется зонд Bruker SNL-(D), который среди всех тестируемых зондовых датчиков имеет самые низкие жесткость и номинальный радиус закругления кончика, а также самые большие габариты. Напротив, зондовый датчик AppNano Nitra-Tall-V-G-(A) продемонстрировал наименьшее пиковое значение эффективного модуля Юнга сомы сенсорных нейронов и минимальную ширину пика. Следует отметить, что помимо того, что данный зонд имеет большую жесткость, он также обладает удлиненной иглой, что позволяет свести вероятность контактного взаимодействия между консолью зонда и клеткой к минимуму. Таким образом, проведенное сравнение показывает, что эффективный модуль Юнга сенсорных нейронов напрямую зависит от характеристик применяемого зондового датчика.

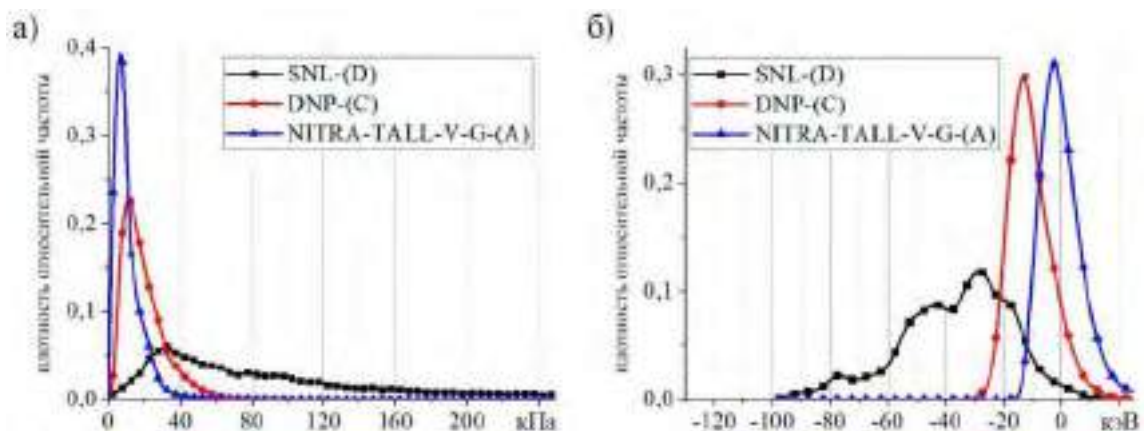


Рисунок 6.6 - а) Средние распределения эффективного модуля Юнга по соме сенсорных нейронов на полилизинной подложке при зондировании клеток разными типами зондов б) гистограммы диссипации энергии ($n_{\text{SNL-D}} = 30$, $n_{\text{DNP-C}} = 18$, $n_{\text{NITRA}} = 21$).

Полученный результат можно объяснить, если рассмотреть диссипацию энергии при взаимодействии зонд-клетка. На рисунке 6.6 б видно, что зонды SNL-(D); DNP-(C) и NITRA-TALL-V-G-(A) демонстрируют различную среднюю диссипацию энергии. Следует отметить, что из всех зондов SNL-(D) сопровождается наибольшая по модулю диссипация. Кроме того, если гистограммы для DNP-(C) и NITRA-TALL-V-G-(A) имеют форму, близкую к нормальному распределению, то распределение для SNL-(D) асимметрично и характеризуется несколькими пиками.

6.4 АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ О ДЕТЕКТИРОВАНИИ ВЛИЯНИЯ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ, НА НАТИВНЫЕ СЕНСОРНЫЕ НЕЙРОНЫ

Картирование эффективного модуля Юнга сомы сенсорных нейронов показало, что клетки существенно различаются между собой по поверхностному распределению данного параметра (рисунок 6.7 а-г). Некоторые нейроны имеют локальные упрочнения, другие более однородны по эффективному модулю Юнга сомы. У отдельных нервных клеток обнаруживались параллельные оси сомы жесткие волокна цитоскелета. Как правило, вытянутые на подложке нейроны с малым отношением высоты (толщины) к длине сомы были тверже, чем более округлые клетки. В целом, несмотря на сравнительно высокое разрешение АСМ карт эффективного модуля Юнга в режиме PeakForce QNM, закономерностей между морфологией и распределением эффективного модуля упругости сенсорных нейронов выявить не удалось.

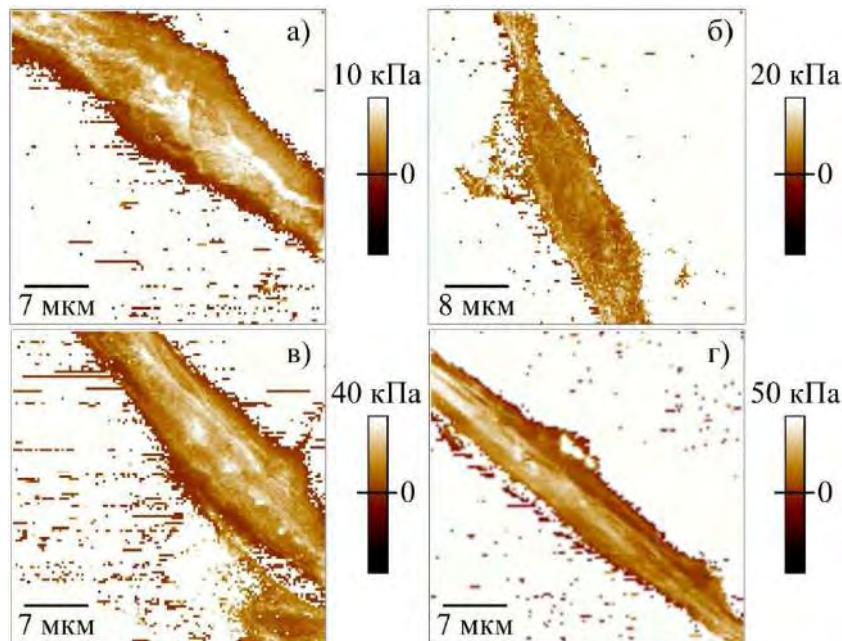


Рисунок 6.7 - а-г) АСМ карты эффективного модуля Юнга нативных сенсорных нейронов (сканирование осуществлялось с помощью зонда Nitra-Tall-V-G-(A)).

Максимальная высота сенсорных нейронов согласно АСМ изображениям приходится на середину сомы и составляет несколько микрон (рисунок 6.4 а), а нейриты по мере удаления от тела клетки становятся тоньше и оканчиваются конусами роста. Из-за такой морфологии, отличающейся резким перепадом высоты на соме, особенно важно, чтобы нейрон был надежно закреплен на подложке. При сканировании клетки в режиме PeakForce QNM амплитуда вертикального движения зонда была выбрана равной 1 мкм. Хотя технически допустима установка и большей амплитуды, на практике превышение указанного значения часто вело к потере стабильности силовых кривых. Если величина перепада высоты сомы нейрона превышает амплитуду отведения кантилевера после индентирования, то при отслеживании зондом возрастающей стороны клетки контакт не прерывается даже при отведении индентора от образца на 2 мкм (удвоенная амплитуда). В этом случае перемещение зонда в следующую точку измерения приведет к сдвигу образца в латеральном направлении. При недостаточно сильной адгезии между клеткой и подложкой это может привести к откреплению объекта исследования. Действительно, мы часто наблюдали отрыв нейронов от дна чашки Петри, покрытой коллагеном с фибронектином, во время сканирования.

Анализ экспериментальных данных показал, что культивированные на коллаген-фибронектиновой подложке в присутствии уабаина (10^{-10} М) нативные нервные клетки характеризуются немного бóльшим эффективным модулем упругости, чем контрольные нейроны. Аналогичный тренд упрочнения сомы наблюдался и при анализе гистограмм эффективного модуля Юнга – амплитуда максимума клеток, культивированных с уабаином, была ниже высоты пика контрольных нейронов. Следует отметить, что в отличие от клеток, исследованных нами ранее, большая высота сомы сенсорных нейронов позволяла рассчитывать на минимальное влияние подложки при АСМ индентировании мягкого объекта, и, следовательно, отсутствие вклада твердого дна чашки Петри в измеренный эффективный модуль Юнга сенсорного нейрона.

Полученные нами средние значения эффективного модуля Юнга сомы нейронов не расходятся с литературными данными – они совпадают по порядку величины со значением ≈ 60 кПа, приведенным в работе [96]. В [100] сообщалось о меньших значениях модуля упругости нативных сенсорных нейронов спинальных ганглиев куриных эмбрионов – 0,9 кПа. Авторы в [133] показали бимодальное распределение модуля Юнга сенсорных нейронов спинальных ганглиев мышцы с максимумами $2,9 \pm 0,3$ кПа и $13,0 \pm 1,5$ кПа. Таким образом, несмотря на то, что во всех перечисленных работах модуль Юнга измерялся с помощью острого индентора, значения параметра, описывающего механические свойства сенсорных нейронов, сильно варьировались. Разброс значений модуля упругости нативных нейронов в литературе

может быть связан с особенностями подготовки образцов с клетками, хотя нельзя исключать и влияния других факторов.

Благодаря более эффективному сцеплению сенсорных нейронов с полилизинным покрытием, клетки на этом типе подложки не отрывались из-за воздействия АСМ зонда при сканировании в режиме PeakForce QNM. В связи с этим, по записанным АСМ кадрам можно было проанализировать геометрические характеристики полной сомы нервных клеток. Определенные габариты тел клеток после воздействия уабаина или коеновой кислоты и контрольных нейронов практически не различались ни по длине, ни по максимальной высоте. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые вещества не влияют на размеры нейронов.

Эффективные модули Юнга сенсорных нейронов на полилизине были очень близки в контроле и после воздействия коеновой кислотой (10^{-8} М): 120 ± 97 кПа и 115 ± 90 кПа соответственно. Тогда как, нервные клетки культивированные в присутствии уабаина (10^{-10} М) демонстрировали более высокий средний эффективный модуль упругости – 172 ± 109 кПа. Хотя тест по U-критерию Манна-Уитни не подтвердил статистическую значимость различий между контрольными нейронами и клетками после воздействия уабаином, тенденция к упрочнению клеток наблюдалась в двух независимых сериях экспериментов на разных типах подложки – коллаген-фибронектиновой и полилизинной. В первом случае, отношение средних значений эффективного модуля Юнга нейронов культивируемых в присутствие уабаина и контроле равнялось $\approx 1,3$, а во втором – $\approx 1,5$. Меньшая разница в соотношении на подложке из коллагена с фибронектином может быть связана с откреплением многих клеток от подложки при АСМ сканировании.

Данные, представленные на рисунке 6.5, подтверждают результаты анализа средних значений эффективного модуля Юнга. Сенсорные нейроны, культивированные с коеновой кислотой (10^{-8} М) имеют близкое по форме распределение в сравнении с контрольными нейронами. Распределение значений эффективного модуля упругости клеток после воздействия уабаина (10^{-10} М) характеризуется существенно более низкой высотой максимума, тогда так, необходимо отметить, что положение пика не меняется.

Несмотря на то, что отдельные сенсорные нейроны чаще всего демонстрировали распределение эффективного модуля Юнга, близкое к нормальному, формы усредненных гистограмм отклоняются от Гауссовой и характеризуются плавным спаданием в сторону больших значений относительно максимума распределений. Это можно связать с тем, что исследованные нейроны в выборке сильно различаются между собой по распределениям эффективного модуля Юнга, и есть нейроны, центр распределения которых смещен в сторону больших значений параметра.

Средние эффективные модули упругости нейронов на двух типах подложки – коллаген-фибронектиновой и полилизиновой – различались в несколько раз. Эффективные модули Юнга контрольных нейронов составили 31 ± 23 кПа и 115 ± 90 кПа на покрытиях из коллагена с фибронектином и полилизине соответственно. Помимо разных типов подложки в экспериментах использовались неодинаковые модели зондовых датчиков. В связи с этим, была осуществлена проверка зависимости измеренного эффективного модуля Юнга от модели зонда. Для этого нейроны, культивированные на полилизиновой подложке, сканировались кантилеверами Bruker SNL-(D), Bruker DNP-(C) и AppNano Nitra-Tall-V-G-(A). Полученные экспериментальные данные показали, что эффективный модуль упругости клеток существенно зависит от типа зонда (рисунок 6.6 а). Наименьшее значение параметра наблюдалось при индентировании зондом, в соответствии с паспортными данными, имеющим самую короткую консоль, самую длинную иглу, максимальную жесткость и тупой кончик. Напротив, наибольший эффективный модуль Юнга, а также самое широкое его распределение были при измерении острым зондом с длинной консолью и самой маленькой константой жесткости. На разный характер взаимодействия зондов с нейронами указывают распределения средней диссипации энергии (рисунок 6.6 б). Самое большое несовпадение индентационных кривых подвода и отвода у зондов SNL-(D), наименьшее – у Nitra-Tall-V-G-(A). Т.к. минимальной диссипацией энергии обладают измерения с помощью кантилевера фирмы AppNano, то из тестированных моделей этот тип зондов предпочтителен для измерения эффективного модуля Юнга нативных сенсорных нейронов. Отметим, что для прояснения конкретного параметра кантилевера, который сильнее всего влияет на измерения модуля Юнга, необходимы дополнительные исследования.

Важно подчеркнуть также, что и тип покрытия дна чашки Петри может оказывать влияние на измеренный модуль Юнга клеток. В литературе есть данные, как свидетельствующие в пользу того, что тип адгезивного слоя влияет на упругое сопротивление клетки сдавливанию АСМ зондом [99, 241], так и противоречащие этому утверждению экспериментальные результаты [100].

Из полученных нами результатов следует, что для повышения достоверности измерения эффективного модуля Юнга клеток следует использовать зонды одного типа. В наших экспериментах сравнение значений эффективного модуля упругости групп нейронов после воздействия убаином (10^{-10} М) или коеновой кислотой (10^{-8} М) с контрольными клетками осуществлялось только с помощью кантилеверов одной модели, т.е. зондами с приблизительно одинаковыми характеристиками. В связи с этим, мы считаем сопоставление эффективных модулей Юнга сенсорных нейронов после воздействия исследуемых веществ с анальгетическим эффектом и контрольных клеток корректным.

Мишенью (рецептором) убаина в клетке является Na^+, K^+ -АТФаза – трансмембранный белок, который осуществляет поддержание градиента концентрации ионов натрия и калия между клеткой и окружающей средой за счет АТФ-зависимой транспортировки соответствующих ионов через мембрану клетки [242–244]. Однако в последнее время накопилось немало данных о том, что эта мембранная структура задействуется во внутриклеточных сигнальных каскадах, регулирующих рост и пролиферацию клеток разных типов [233, 236, 239, 240, 245, 246]. В сенсорных нейронах млекопитающих Na^+, K^+ -АТФаза участвует в передаче сигналов от опиоидоподобных рецепторов к медленным натриевым каналам $\text{Na}_v 1.8$ [233, 236].

На рисунке 6.8 показана схема действия коеновой кислоты и убаина на сенсорный нейрон.

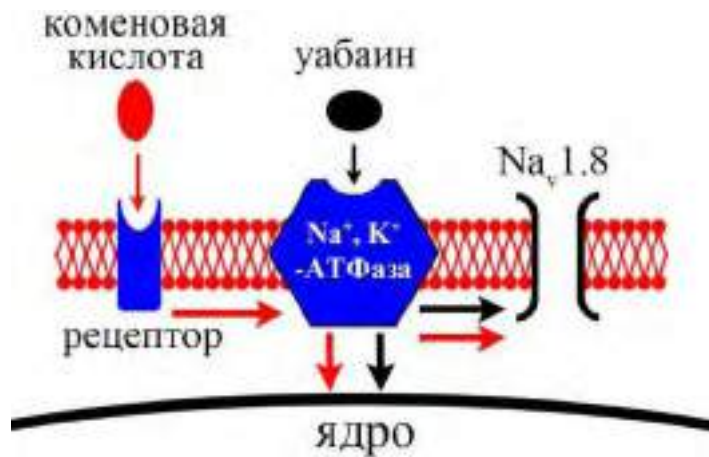


Рисунок 6.8 - Действие убаина и коеновой кислоты на сенсорный нейрон.

Упрочнение сомы нативных сенсорных нейронов под действием убаина и отсутствие сходного эффекта со стороны коеновой кислоты указывает на то, что рецептор-опосредованная передача сигнала на геном клетки, запускаемая коеновой кислотой осуществляется с помощью механизмов, отличающихся от трансдуктор-опосредованных сигнальных путей, активируемых убаином [232].

В заключение сформулируем выводы. Была предпринята попытка применить АСМ в режиме PeakForce QNM для изучения действия веществ, обладающих анальгетическим эффектом, на нативные сенсорные нейроны куриных эмбрионов. Для выявления потенциальных изменений геометрических и механических характеристик сомы нейронов в ответ на обработку веществами, анализировались АСМ топографии и карты эффективного модуля Юнга клеток. Согласно полученным АСМ данным, обработка обоими веществами не привела к явным изменениям морфологии нейронов. Сравнение же средних эффективных модулей Юнга показало, что убаин (10^{-10} М) вызывает небольшое упрочнение сомы нейронов

(увеличение среднего эффективного модуля Юнга в $\approx 1,3-1,5$ раз), в то время как коленовая кислота (10^{-8} М) такового влияния не оказывает. Обнаруженный рост ригидности тела нейронов после воздействия убаина наблюдали на двух типах подложки – коллаген-фибронектиновой и полилизинной. Стоит подчеркнуть, однако, что по причине большой дисперсии значений эффективного модуля упругости статистический анализ не показал значимой разницы между средними значениями данного параметра ни на одной из подложек. Как мы предполагаем, упрочнение сомы сенсорных нейронов при действии убаина и нечувствительность эффективного модуля Юнга сомы нейрона к присутствию коленовой кислоты свидетельствуют об активации специфических внутриклеточных сигнальных процессов, отличающихся от каскадов, которые запускает убаин.

Таким образом, АСМ позволяет при миллисекундных временах индентирования (частота пульса – 250 Гц, что соответствует 4 мс на полный цикл колебания, а само индентирование обычно занимает в разы меньшее время) отслеживать вызванные убаином вариации эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов, контактирующих как с полилизином, так и с фибронектином. Вместе с тем, выявлена зависимость измеряемого эффективного модуля Юнга от типа используемого зондового датчика, что осложняет количественное определение параметра при его измерении в PeakForce QNM.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформулируем основные выводы работы. Проведены методические исследования, направленные на углубление понимания вклада различных факторов, потенциально влияющих на результаты АСМ измерений нативных клеток. В работе применялся перспективный для рутинных исследований клеток высокоинформативный квазистатический режим АСМ PeakForce QNM. Индентирование клеток в этом режиме с частотой 250 Гц позволило исследовать геометрические и механические параметры нативных объектов. На животных клетках с существенно различающимися свойствами – нативных фибробластах, эритроцитах, микрососудистых эндотелиальных клетках, сенсорных нейронах – посредством АСМ изучались различные внешние воздействия (зондирование инденторами с различной формой кончика; сильная адгезия с подложкой; селективные ингибиторы компонентов цитоскелета; вещества с анальгетическим эффектом). В результате проведенных экспериментов удалось разработать методики АСМ, которые повышают достоверность детектирования механических и геометрических характеристик нативных клеток и обеспечивают возможность использования этих характеристик в качестве индикаторов внешних воздействий на такие объекты.

Основные результаты работы

1. Показано, что измеряемые в режиме PeakForce QNM значения контактной жесткости более точно характеризуют механические свойства нативных фибробластов сердечной ткани куриных эмбрионов, чем величины эффективного модуля Юнга, определенные по моделям Снеддона и ДМТ для стандартных острых и субмикронных сферических зондов соответственно.
2. Разработана АСМ методика, позволяющая обнаруживать неоднородности механических свойств наружных слоев клеток. Она заключается в зондировании нативных объектов двумя типами зондов с субмикронным кончиком (пирамидальным и сферическим) и использовании значений контактной жесткости для количественной характеристики механических свойств клеток. Применение этой методики для исследования фибробластов сердечной ткани показало, что внешние слои этих клеток ведут себя как жесткая по отношению к цитоплазме оболочка.
3. С помощью АСМ в режиме количественной наномеханики обнаружено, что у нефиксированных крысиных эритроцитов на полилизинной подложке дополнительное натяжение плазматической мембраны, вызванное продолжительным по времени контактом с подложкой, не нарушая целостности объектов, приводит к набуханию клеток и, как минимум, к 3-х кратному увеличению их эффективного модуля Юнга.

4. Доказано, что близость твердой подложки не препятствует АСМ детектированию в квазистатическом режиме изменений эффективного модуля Юнга цитоскелета дистальных областей микрососудистого эндотелия мышечных легких толщиной ~100 нм (сопоставимой с глубиной индентирования), возникающих под действием специфических ингибиторов основных компонентов цитоскелета (тубулина, актина). Обработка ингибиторами проявлялась в достоверно зарегистрированном размягчении тонкой периферии клеток.
5. Адаптированная АСМ методика измерений эффективного модуля Юнга позволила при миллисекундных временах индентирования детектировать отклик нативных сенсорных нейронов при контакте с полилизин или фибронектином на вещество с анальгетическим эффектом – убаин: добавление субстанции привело к увеличению твердости сомы этих клеток в 1,3–1,5 раза. Показано также, что другое вещество с анальгетическим действием – коленовая кислота не меняет твердости сенсорных нейронов.
6. Обнаружено существенное расхождение средних значений эффективного модуля Юнга сенсорных нейронов куриных эмбрионов при измерении в квазистатическом режиме АСМ стандартными кантилеверами различных типов. Результат наглядно проявляет важность сохранения неизменной геометрии кантилевера при накоплении статистических данных измерений эффективного модуля Юнга клеток выбранного типа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю д.ф.-м.н. Александру Витальевичу Анкудинову за помощь в постановке задач, обсуждении результатов работы, совершенствовании формулировок диссертации; плодотворное научное общение; ценные советы, способствовавшие профессиональному развитию автора.

Также автор признателен В.А. Пеннийнен, Б.В. Крылову, С.А. Подзоровой и другим сотрудницам и сотрудникам лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, а также сотрудникам Института экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения РФ М.В. Самсонову и В.П. Ширинскому.

Еще автор благодарен А.О. Голубку, П.А. Белову и сотрудникам кафедры нанофотоники и метаматериалов Университета ИТМО, Б.О. Щербину, И.А. Няпшаеву, П.А. Алексееву, Т.Е. Тимошенко, А. Дулебо, Н.А. Есиковой, А.В. Стовпяге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ченцов Ю.С. Цитология с элементами целлюлярной патологии: учебное пособие для университетов и медицинских вузов. М.: Медицинское информационное агентство, 2010. 368 с.
2. Ефремов Ю. Биомеханика живой клетки // Биомолекула. 30.09.2013 URL: <https://biomolecula.ru/articles/biomekhanika-zhivoi-kletki> (дата обращения: 26.09.2017).
3. Addae-Mensah K.A., Wikswo J.P. Measurement techniques for cellular biomechanics in vitro // *Exp. Biol. Med.* 2008. V. 233(7). P. 792–809.
4. Ethier C.R., Simmons C.A. *Introductory Biomechanics: From Cells to Organisms*. USA NY: Cambridge University Press, 2007. 511 p.
5. Калягина Н.В. Математическая модель осморегуляции объема эритроцита с учетом механических характеристик мембраны: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 03.01.02 – Биофизика / Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН. М., 2015. 151 с.
6. Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран: Пер. с англ. – М.: Мир, 1982. 352 с.
7. Shao J.Y., Hochmuth R.M. Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes // *Biophys. J.* 1996. V. 71(5). P. 2892–2901.
8. Hategan A., Law R., Kahn S., Discher D.E. Adhesively-Tensed Cell Membranes: Lysis Kinetics and Atomic Force Microscopy Probing // *Biophys. J.* 2003. V. 85(4). P. 2746–2759.
9. Trickey W.R., Baaijens F.P.T., Laursen T.A., Alexopoulos L.G., Guilak F. Determination of the Poisson's ratio of the cell: recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration // *J. Biomech.* 2006. V. 39. P. 78–87.
10. Thoumine O., Cardoso O., Meister J.J. Changes in the mechanical properties of fibroblasts during spreading: a micromanipulation study // *Eur. Biophys. J.* 1999. V. 28 P. 222–234.
11. Sato M., Ohshima N., Nerem R.M. Viscoelastic properties of cultured porcine aortic endothelial cells exposed to shear stress // *J. Biomech.* 1996. V. 29. P. 461–467.
12. Yu H., Tay C.Y., Leong W.S., Tan S.C., Liao K., Tan L.P. Mechanical behavior of human mesenchymal stem cells during adipogenic and osteogenic differentiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 393(1). P.1550–1555.
13. Chivukula V.K., Krog B.L., Nauseef J.T., Henry M.D., Vigmostad S.C. Alterations in cancer cell mechanical properties after fluid shear stress exposure: a micropipette aspiration study // *Cell Health Cytoskelet.* 2015. V. 7. P. 25–35.

14. Brugués J., Maugis B., Casademunt J., Nassoy P., Amblard F., Sensa P. Dynamical organization of the cytoskeletal cortex probed by micropipette aspiration // *PNAS*. 2010. V. 107(35). P. 15415–15420.
15. Hochmuth R.M. Micropipette aspiration of living cells // *J. Biomech.* 2000. V. 33(1). P. 15–22.
16. Dholakia K., MacDonald M., Spalding G. Optical tweezers: the next generation // *Physics World*. 2002. V. 15(10). P. 31–35.
17. Морозова Н.Е., Ведяйкин А.Д., Сабанцев А.В., Побегалов Г.Е., Мурашов С.В., Ходорковский М.А. Формирование мембранных тубулярных структур из гепатоцитов человека // *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки* № 3(177). 2013. С. 167–176.
18. Lenormand G., Hkenon S., Richert A., SimKeon S., Gallet F. Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton // *Biophys. J.* 2001. V. 81(1). P. 43–56.
19. Dao M., Limb C.T., Suresh S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers // *J. Mech. Phys. Solids*. 2005. V. 53 (2). P. 493–494.
20. Li Y., Wen C., Xie H., Ye A., Yin Y. Mechanical property analysis of stored red blood cell using optical tweezers // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009. V. 70(2). P. 169–173.
21. Li Z., Anvari B., Takashima M., Brecht P., Torres J.H., Brownell W.E. Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers // *Biophys. J.* 2002. V. 82(3). P. 1386–1395.
22. Tan Y., Kong C.W., Chen S., Cheng S.H., Li R.A., Sun D. Probing the mechanobiological properties of human embryonic stem cells in cardiac differentiation by optical tweezers // *J. Biomech.* 2012. V. 45(1). P. 123–128.
23. Walker L.M., Holm A., Cooling L., Maxwell L., Oberg A., Sundqvist T., El Haj A.J. Mechanical manipulation of bone and cartilage cells with 'optical tweezers' // *FEBS Lett.* 1999. V. 459(1). P. 39–42.
24. Wu Y., Sun D., Huang W. Mechanical force characterization in manipulating live cells with optical tweezers // *J. Biomech.* 2011. V. 44(4). P. 741–746.
25. Righini M., Volpe G., Girard C., Petrov D., Quidant R. Surface plasmon optical tweezers: tunable optical manipulation in the femtonewton range // *Phys. Rev. Lett.* 2008. V. 100(18). P. 186804-1–4.
26. Zhou M., Yang H., Di J., Zhao E. Manipulation on human red blood cells with femtosecond optical tweezers // *Chin. Opt. Lett.* 2008. V. 6. P. 919–921.
27. Ran L., Guo Z., Qu S. Rotation of optically trapped microscopic particles by vortex femtosecond laser // *Chin. Phys. B*. 2012. V. 21. P. 104206-1–4.

28. Li Y., Guo Zh., Qu Sh. Living cell manipulation in a microfluidic device by femtosecond optical tweezers // *Optics and Lasers in Engineering*. 2014. V. 55. P. 150–154.
29. Sheetz M.P. *Laser Tweezers in Cell Biology. Methods in Cell Biology* Vol. 55. USA: Academic Press, 1997. 228 p.
30. Sarshar M., Wong W.T., Anvari B. Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers // *J. Biomed. Opt.* 2014. V. 19(11). 115001-1–13.
31. Хохлова М.Д. Метод оптического пинцета для определения сил взаимодействия и микромеханических характеристик клеток: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 01.04.05 – Оптика / Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. М., 2014. 148 с.
32. Neuman K.C., Block S.M. Optical trapping // *Rev. Sci. Instrum.* 2004. V. 75(9). P. 2787–2809.
33. Harris A.K., Wild P., Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion // *Science*. 1980. V. 208(4440). P. 177–179.
34. Galbraith C.G., Sheetz M.P. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94(17). P. 9114–9118.
35. Tan J.L., Tien J., Pirone D.M., Gray D.S., Bhadriraju K., Chen C.S. Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100(4). P. 1484–1489.
36. Friedbacher G., Fuchs H. *Classification Of Scanning Probe Microscopies (Technical Report)* // *Pure Appl. Chem.* 1999. V. 71(7). P. 1337–1357.
37. Meyer E. *Scanning probe microscopy and related methods* // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2010. V. 1. P. 155–157.
38. Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., Weibel E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy // *Phys. Rev. Lett.* 1982. V. 49(1). P. 57–61.
39. Binnig G., Quate C.F., Gerber. Ch. Atomic force microscope // *Phys. Rev. Lett.* 1986. V. 56(9). P. 930–933.
40. Butt H.J., Cappella B., Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications // *Surface Science Reports*. 2005. V. 59(1–6). P. 1–152.
41. Xie X.N., Chung H.J., Sow C.H., Wee A.T.S. Nanoscale materials patterning and engineering by atomic force microscopy nanolithography // *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2006. V. 54(1–2). P. 1–48.
42. Dufrêne Y.F., Martínez-Martín D., Medalsy I., Alsteens D., Müller D. J. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM // *Nature Methods*. 2013. V. 10(9). P. 847–854.

43. Lee G.U., Kidwell D.A., Colton R.J. Sensing discrete streptavidin biotin interactions with atomic force microscopy // *Langmuir*. 1994. V. 10. P. 354–357.
44. Radmacher M., Cleveland J.P., Fritz M., Hansma H.G., Hansma P.K. Mapping interaction forces with the atomic force microscope // *Biophys. J.* 1994. V. 66. P. 2159-2165.
45. Toward Quantitative Nanomechanical Measurements on Live Cells with PeakForce QNM // Bruker Application Note #141. 2013. P. 1–10.
46. Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM // Bruker Application Note #128. 2012. P. 1–12.
47. Jumping probe microscope: patent US5266801 A USA US 08/009,076 ; subm. 26.01.1993 ; publ. 30.11.1993.
48. Магонов С. Расширение возможностей атомно-силовой микроскопии с помощью метода Hybrid – NT-MDT, Примеры применений 087
49. Rosa-Zeiser A., Weilandt E., Hild S., Marti O. The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: Pulsed-Force mode operation // *Meas. Sci. Technol.* 1997. V. 8. P. 1333–1338.
50. Introduction to Bruker's ScanAsyst and PeakForce Tapping AFM Technology // Bruker Application Note #133. 2011. P. 1–12.
51. JPK Instruments Technical Note “QI mode – Quantitative Imaging with the Nanowizard 3 AFM”, P. 1-7
52. WITec's Atomic Force Microscope // Witec [сайт] URL: <http://www.witec.de/techniques/afm/> (дата обращения: 28.02.2017).
53. Adamcik J., Berquand A., Mezzenga R. Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by Peak Force quantitative nanomechanical atomic force microscopy // *Appl. Phys. Lett.* 2011. V. 98. P. 193701–193703.
54. Young T.J., Monclus M.A., Burnett T.L., Broughton W.R., Ogin S.L., Smith P.A. The use of the PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping AFM-based method for high-resolution Young's modulus measurement of polymers // *Meas. Sci. Technol.* 2011. V. 22(12). P. 1–6.
55. Quantitative Imaging of Living Biological Samples by PeakForce QNM Atomic Force Microscopy // Bruker Application Note #135. 2011. P. 1–10.
56. Tittmann B.R., Xi X. Imaging and quantitative data acquisition of biological cell walls with Atomic Force Microscopy and Scanning Acoustic Microscopy // *Microscopy: advances in scientific research and education FORMATEX Microscopy Series*. 2014. V. 1. P. 161–172.
57. Ďurkovič J., Čaňová I., Lagaňa R., Kučerová V., Moravčík M., Priwitzer T., Urban J., Dvořák M., Krajňáková J. Leaf trait dissimilarities between Dutch elm hybrids with a contrasting tolerance to Dutch elm disease // *Ann. Bot.* 2013. V. 111(2). P. 215–227.

58. Slade A., Pittenger B., Milani P., Boudaoud A., Hamant O., Kioschis P., Ponce L.M., Hafner M. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy // *Microscopy and analysis – Scanning probe microscopy supplement*. 2014. P. 6–9.
59. Berquand A., Kuhn H.M., Holloschi A., Mollenhauer J., Kioschis P. Expression of tumor suppressors PTEN and TP53 in isogenic glioblastoma U-251MG cells affects cellular mechanical properties – An AFM-based quantitative investigation // *Proc. 20th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy*. 2013. V. 1. P. 011002-1–8.
60. Tomankova K., Kolar P., Malohlava J., Kolarova H. Mechanical Characterisation of HeLa Cells using Atomic Force Microscopy // *Current microscopy contributions to advances in science and technology FORMATEX Microscopy Series*. 2014. V. 1. P. 549–554.
61. Worcester D.L., Miller R.G., Bryant P.J. Atomic force microscopy of purple membranes // *J. Microsc.* 1988. V.152(3). P. 817–821.
62. Putman C.A., van der Werf K.O., de Groot B.G., van Hulst N.F., Greve J. Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy // *Biophys. J.* 1994. V.67(4). P. 1749–1753.
63. Hofmann U.G., Rotsch C., Parak W.J., Radmacher M. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope // *J. Struct. Biol.* 1997. V. 119(2). P. 84–91.
64. Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Y., Komizu H., Kusumi A. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy // *Biophys. J.* 1998. V. 74(5). P. 2171–2183.
65. Santos N.C., Castanho M.A. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy // *Biophys. Chem.* 2004. V. 107(2). P. 133–149.
66. Chang K.-Ch., Chiang Yu-W., Yang Ch.-H., Liou J.-W. Atomic force microscopy in biology and biomedicine // *Tzu Chi Medical Journal*. 2012. V. 24(4). P. 162–169.
67. Grant C.A., Twigg P.C., Tobin D.J. Static and dynamic nanomechanical properties of human skin tissue using atomic force microscopy: Effect of scarring in the upper dermis // *Acta Biomaterialia*. 2012. V. 8(11). P. 4123–4129.
68. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // *Micron*. 2007. V.38(8). P. 824–833.
69. Webb H.K., Truong V.K., Hasan J., Crawford R.J., Ivanova E.P. Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy - Current research and methodologies // *J. Microbiol. Methods*. 2011. V. 86(2). P. 131–139.
70. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Filonov A.S., Frolova O.Y., Lyubchenko Y.L., Yaminsky I.V. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes // *Ultramicroscopy*. 2001. V. 86(1-2). P. 121–128.

71. Doktycz M.J., Sullivan C.J., Hoyt P.R., Pelletier D.A., Wu S., Allison D.P. AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces // *Ultramicroscopy*. 2003. V. 97. P. 209–216.
72. Burgain J., Gaiani C., Francius G., Revol-Junelles A.M., Cailliez-Grimal C., Lebeer S., Tytgat H.L., Vanderleyden J., Scher J. In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2013. V. 104. P. 153–162.
73. Mateu M.G. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virological perspective // *Virus Res*. 2012. V. 168(1-2). P. 1–22.
74. Kurland N.E., Drira Z., Yadavalli V.K. Measurement of nanomechanical properties of biomolecules using atomic force microscopy // *Micron*. 2012. V. 43(2-3). P. 116–128.
75. Tseng Y.D., Ge H., Wang X., Edwardson J.M., Waring M.J., Fitzgerald W.J., Henderson R.M. Atomic force microscopy study of the structural effects induced by echinomycin binding to DNA // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 345(4). P. 745–758.
76. Davies E., Teng K.S., Conlan R.S., Wilks S.P. Ultra-high resolution imaging of DNA and nucleosomes using non-contact atomic force microscopy // *FEBS Lett*. 2005. V. 579(7). P. 1702–1706.
77. Pillet F., Chopinet L., Formosa C., Dague E. Atomic Force Microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1840(3). P. 1028–1050.
78. Schillers H., Wälte M., Urbanova K., Oberleithner H. Real-Time Monitoring of Cell Elasticity Reveals Oscillating Myosin Activity // *Biophys. J*. 2010. V. 99(11). P. 3639–3646.
79. Mozhanova A. A., Nurgazizov N. I., Bukharaev A. A. Local elastic properties of biological materials studied by SFM: SPM-2003. In: *Proceedings. Nizhni Novgorod, March 2–5. 2003*. P. 266-267.
80. Maciaszek J.L., Andemariam B., Lykotrafitis G. Microelasticity of red blood cells in sickle cell disease // *J. Strain Analysis*. 2011. V. 46. P. 368–379.
81. Rebelo L. M., de Sousa J. S., Santiago T. M., Mendes Filho J. Correlating cell morphology and viscoelasticity to investigate diseases with atomic force microscopy // *Microscopy: advances in scientific research and education*. 2014. - P. 141–152.
82. Radmacher M., Fritz M., Kacher C.M., Cleveland J.P., Hansma P.K. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope // *Biophys. J*. 1996. V. 70(1). P. 556–567.
83. Mahaffy R.E., Park S., Gerde E., Käs J., Shih C.K. Quantitative Analysis of the Viscoelastic Properties of Thin Regions of Fibroblasts Using Atomic Force Microscopy // *Biophys. J*. 2004. V. 86(3). P. 1777–1793.

84. Sit P.S., Kohn J. Interrelationship of micromechanics and morphology of fibroblasts adhered on different polymeric surfaces // *Acta Biomater.* 2009. V. 5(8). P. 2823–2831.
85. Plodinec M., Loparic M., Suetterlin R., Herrmann H., Aebi U., Schoenenberger C.A. The nanomechanical properties of rat fibroblasts are modulated by interfering with the vimentin intermediate filament system // *J. Struct. Biol.* 2011. V. 174(3). P. 476–484.
86. Codan B., Del Favero G., Martinelli V., Long C.S., Mestroni L., Sbaizero O. Exploring the elasticity and adhesion behavior of cardiac fibroblasts by atomic force microscopy indentation // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol.* 2014. V. 40. P. 427–434.
87. Alcaraz J., Buscemi L., Grabulosa M., Trepas X., Fabry B., Farré R., Navajas D. Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy // *Biophys J.* 2003 Mar; 84(3): 2071–2079.
88. Mathur A.B., Collinsworth A.M., Reichert W.M., Kraus W.E., Truskey G.A. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy // *J. Biomech.* 2001. V. 34. P. 1545–1553.
89. Sato H., Kataoka N., Kajiyama F., Katano M., Takigawa T., Masuda T. Kinetic study on the elastic change of vascular endothelial cells on collagen matrices by atomic force microscopy // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2004. V. 34(2). P. 141–146.
90. Vargas-Pinto R., Gong H., Vahabikashi A., Johnson M. The effect of the endothelial cell cortex on atomic force microscopy measurements // *Biophys. J.* 2013. V. 105(2). P. 300–309.
91. Domke J., Dannöhl S., Parak W.J., Müller O., Aicher W.K., Radmacher M. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. // *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2000. V. 19(4). P. 367–379.
92. Hansen J.C., Lim J.Y., Xu L.C., Siedlecki C.A., Mauger D.T., Donahue H.J. Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblastic cells as determined by atomic force microscopy // *J. Biomech.* 2007. V. 40(13). P. 2865–2871.
93. Kelly G.M., Kilpatrick J.I., van Es M.H., Weafer P.P., Prendergast P.J., Jarvis S.P. Bone cell elasticity and morphology changes during the cell cycle // *J. Biomech.* 2011. V. 44(8). P. 1484–1490.
94. Muthukumaran P., Lim C.T., Lee T. Estradiol influences the mechanical properties of human fetal osteoblasts through cytoskeletal changes // *Biochem Biophys Res Commun.* 2012. V. 423(3). P. 503–508.
95. Darling E.M., Zauscher S., Guilak F. Viscoelastic properties of zonal articular chondrocytes measured by atomic force microscopy // *Osteoarthritis Cartilage.* 2006. V. 14(6). P. 571–579.
96. Mustata M., Ritchie K., McNally H.A. Neuronal elasticity as measured by atomic force microscopy // *J. Neurosci. Methods.* 2010. V. 186(1). P. 35–41.

97. Au N.P., Fang Y., Xi N., Lai K.W., Ma C.H. Probing for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in live dorsal root ganglion neurons with atomic force microscopy // *Nanomedicine*. 2014. V. 10(6). P. 1323–1333.
98. Li Q.S., Lee G.Y., Ong C.N., Lim C.T. AFM indentation study of breast cancer cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 374(4). P. 609–613.
99. Takai E., Costa K.D., Shaheen A., Hung C.T., Guo X.E. Osteoblast elastic modulus measured by atomic force microscopy is substrate dependent // *Ann. Biomed. Eng.* 2005. V. 33(7). P. 963–71.
100. Spedden E., White J.D., Naumova E.N., Kaplan D.L., Staii C. Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy // *Biophys. J.* 2012. V. 103(5). P. 868–877.
101. Schillers H., Rianna C., Schäpe J., Luque T., Doschke H., Wälte M., Uriarte J.J., Campillo N., Michanetzis G.P.A., Bobrowska J., Dumitru A., Herruzo E.T., Bovio S., Parot P., Galluzzi M., Podestà A., Puricelli L., Scheuring S., Missirlis Y., Garcia R., Odorico M., Teulon J.M., Lafont F., Lekka M., Rico F., Rigato A., Pellequer J.L., Oberleithner H., Navajas D., Radmacher M. Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples // *Sci. Rep.* 2017. V. 7(1). P. 1–9.
102. Ando T., Uchihashi T., Kodera N., Yamamoto D., Miyagi A., Taniguchi M., Yamashita H. High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes // *Pflugers Arch.* 2008. V. 456(1). P. 211–225.
103. Trickey W. R., G. M. Lee, F. Guilak. Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage // *J. Orthop. Res.* 2000. V. 18. P. 891–898.
104. Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościk G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Styczeń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope // *Biorheology*. 2005. V. 42(4). P. 307–317.
105. Dulinska I., Targosz M., Strojny W., Lekka M., Czuba P., Balwierz W., Szymonski M. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy // *J. Biochem. Biophys. Meth.* 2006. V. 66. P. 1–11.
106. Efremov Y.M., Lomakina M.E., Bagrov D.V., Makhnovskiy P.I., Alexandrova A.Y., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer transformation // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843(5). P. 1013–1019.
107. Lasalvia M., Castellani S., D'Antonio P., Perna G., Carbone A., Colia A.L., Maffione A.B., Capozzi V., Conese M. Human airway epithelial cells investigated by atomic force microscopy: A hint to cystic fibrosis epithelial pathology // *Exp Cell Res.* 2016. V. 348(1). P. 46–55.
108. Hertz H. Über die Berührung Fester Elastischer Körper (On the Contact of Elastic Solids) // *J. Reine Angew. Math.* 1881. V. 92. P. 156–171.

109. Roa J.J., Oncins G., Diaz J., Sanz F., Segarra M. Calculation of Young's modulus value by means of AFM // *Recent Pat Nanotechnol.* 2011. V. 5(1). P. 27–36.
110. Sneddon I. The Relation Between Load and Penetration in the Axi-Symmetric Boussinesq Problem for a Punch of Arbitrary Profile // *Int. J. Engng. Sci.* 1965. V. 3. P. 47–57.
111. Derjaguin B.V., Muller V.M., Toropov Yu.P. Effect of contact deformations on the adhesion of particles // *J. Colloid. Interface Sci.* 1975. V. 53(2). P. 314–326.
112. Johnson K.L., Kendall K., Roberts A.D. Surface energy and the contact of elastic solids // *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* 1971. V. 324(1558). P. 301–313.
113. Efremov Y.M., Bagrov D.V., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Application of the Johnson-Kendall-Roberts model in AFM-based mechanical measurements on cells and gel // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2015. V. 134. P. 131–139.
114. Bhushan B. (Ed.) *Nanotribology and Nanomechanics. An Introduction.* Germany Berlin: Springer, 2005. 1148 p.
115. Bilodeau G.G. Regular pyramid punch problem // *Journal of Applied Mechanics.* 1992. V. 59(3). P. 519–523.
116. The DMT model of solids adhesion // NT-MDT Spectrum Instruments. URL: <http://www.ntmdt-si.com/spm-basics/view/dmt-model> (Дата посещения: 26.09.2017).
117. The JKR model of solids adhesion // NT-MDT Spectrum Instruments. URL: <http://www.ntmdt-si.com/spm-basics/view/jkr-model> (Дата посещения: 26.09.2017).
118. Grierson D.S., Flater E.E., Carpick R.W. Accounting for the JKR–DMT transition in adhesion and friction measurements with atomic force microscopy // *J. Adhesion Sci. Technol.* 2005. V. 19(3–5). P. 291–311.
119. Kawakatsu H., Bleuler H., Saito T., Hiroshi K. Dual Optical Levers for Atomic Force Microscopy // *Jpn. J. Appl. Phys.* 1995. V. 34. P. 3400–3402.
120. Kawakatsu H., Saito T. Scanning force microscopy with two optical levers for detection of deformations of the cantilever // *J. Vac. Sci. Technol. B.* 1996. V. 14(2). P. 872–876.
121. Sri Muthu Mrinalini R., Sriramshankar R., Jayanth G.R. Direct Measurement of Three-Dimensional Forces in Atomic Force Microscopy // *IEEE/ASME Transactions On Mechatronics.* 2015. V. 20(5). P. 2184–2193.
122. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений. НН.: Институт физики микроструктур, 2004. 114 с.
123. BioScope Catalyst // Optec [сайт] URL: http://www.optecgroup.com/equipment/Atomno-silovye_mikroskopy_AFM/BioScope-Catalyst/ (дата обращения: 28.02.2017).

124. BioScope Catalyst Технические характеристики // Optec [сайт] URL: http://www.optecgroup.com/equipment/Atomno-silovye_mikroskopy_AFM/BioScope-Catalyst/?tab=tech_params (дата обращения: 28.02.2017).
125. Ponce L., Berquand A., Petersen M., Hafner M. Combining atomic force microscopy and live cell imaging to study calcium responses in dorsal root ganglion neurons to a locally applied mechanical stimulus // *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010. P. 530–536.
126. Model 335 Cryogenic Temperature Controller // LakeShore Cryotronics [сайт] URL: <http://www.lakeshore.com/products/cryogenic-temperature-controllers/model-335/Pages/Overview.aspx> (дата обращения: 28.02.2017).
127. PeakForce Tapping - How AFM Should Be // Bruker [сайт] URL: <https://www.bruker.com/ru/products/surface-and-dimensional-analysis/atomic-force-microscopes/modes/modes/imaging-modes/peakforce-tapping/technical-details.html> (дата обращения: 28.02.2017).
128. Gavara N. A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics // *Microsc. Res. Tech.* 2017. V. 80(1). P. 75–84.
129. Ohler B. Practical Advice on the Determination of Cantilever Spring Constants [Электронный ресурс] // Veeco Application Note 94. 2007. URL: <http://files.instrument.com.cn/FilesCenter/20080618/70387.pdf> (дата обращения: 28.02.2017).
130. Няпшаев И.А., Анкудинов А.В., Стовпяга А.В., Трофимова Е.Ю., Еропкин М.Ю. Диагностика живых клеток в атомно-силовом микроскопе, используя субмикронный сферический зонд калиброванного радиуса кривизны // *Журнал технической физики*. 2012. Т. 82 № 10. С. 109–116.
131. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций для студентов специальности G 31 01 01 «БИОЛОГИЯ» (направление «БИОТЕХНОЛОГИЯ» G 31 01 01-03). Мн.: БГУ, 2004. 78 с.
132. Haga H., Sasaki Sh., Kawabata K., Ito E., Ushiki T., Sambongi T. Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton // *Ultramicroscopy*. 2000. V. 82. P. 253–258.
133. Martin M., Benzina O., Szabo V., Végh A.-G., Lucas O., Cloitre T., Scamps F., Gergely C. Morphology and Nanomechanics of Sensory Neurons Growth Cones following Peripheral Nerve Injury // *PLoS One*. 2013. V. 8(2). P. 1–11.
134. Cartagena A., Raman A. Local Viscoelastic Properties of Live Cells Investigated Using Dynamic and Quasi-Static Atomic Force Microscopy Methods // *Biophys. J.* 2014. V. 106(5). P. 1033–1043.

135. Yokokawa M., Takeyasu K., Yoshimura S.H. Mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope measured by scanning probe microscope // *J. Microsc.* 2008. V. 232(1). P. 82–90.
136. Лебедев Д.В., Чукланов А.П., Бухараев А.А., Дружинина О.С. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа // *Письма в ЖТФ*, 2009, Т. 35. № 8. С. 54–51.
137. JPK Instruments Application Note “Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy”, P. 1–9.
138. Measuring Thermal Noise // К TH Royal Institute of Technology [сайт] URL: <http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/icon/bruker-help/Content/Probe%20and%20Sample%20Guide/ThermalTune/MeasuringThermalNoise.htm> (дата обращения: 28.02.2017).
139. Nečas D., Klapetek P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis // *Central European Journal of Physics*. 2012. V. 10(1). P. 181–188.
140. Frewin Ch.L. (Ed.) *Atomic Force Microscopy Investigations into Biology - From Cell to Protein* : InTech, 2012. P. 29.
141. Ohashi T., Ishii Y., Ishikawa Y., Matsumoto T., Sato M. Experimental and numerical analyses of local mechanical properties measured by atomic force microscopy for sheared endothelial cells // *Biomed. Mater. Eng.* 2002. V. 12(3). P. 319–327.
142. Guz N., Dokukin M., Kalaparthi V., Sokolov I. If Cell Mechanics Can Be Described by Elastic Modulus: Study of Different Models and Probes Used in Indentation Experiments // *Biophys J.* 2014. V. 107(3). P. 564–575.
143. Rotsch C., Radmacher M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study // *Biophys. J.*, 2000. V. 78(1). P. 520–535.
144. Sokolov I., Dokukin M.E., Guz N.V. Method for quantitative measurements of the elastic modulus of biological cells in AFM indentation experiments // *Methods*. 2013. V. 60(2). P. 202–213.
145. Souders C.A., Bowers S.L., Baudino T.A. Cardiac fibroblast: the renaissance cell // *Circ Res.* 2009. V. 105(12). P. 1164–1176.
146. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Часть 2. Цитоскелет, способный чувствовать и помнить // *Соросовский образовательный журнал*. 1996. № 4, С. 4–10.
147. Glaubitz M., Block S., Witte J., Empen K., Gross S., Schlicht R., Weitmann K., Klingel K., Kandolf R., Hoffmann W., Gottschalk K.E., Busch M., Dörr M., Helm C.A., Felix S.B., Riad A. Stiffness of left ventricular cardiac fibroblasts is associated with ventricular dilation in patients

- with recent-onset nonischemic and nonvalvular cardiomyopathy // *Circ. J.* 2014. V. 78(7). P. 1693–1700.
148. Nagayama M., Haga H., Kawabata K. Drastic change of local stiffness distribution correlating to cell migration in living fibroblasts // *Cell Motility and Cytoskeleton.* 2001. V. 50. P. 173–179.
 149. Raman A., Trigueros S., Cartagena A., Stevenson A.P.Z., Susilo M., Nauman E., Antoranz Contera S. Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy // *Nature Nanotechnology.* 2011. V. 6. P. 809–814.
 150. Dimitriadis E.K., Horkay F., Maresca J., Kachar B. and Chadwick R.S. Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope // *Biophysical Journal.* 2002. V. 82. P. 2798–2810.
 151. Gavara N., Chadwick R.S. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips // *Nature Nanotechnology.* 2012. V. 7(11). P. 733–736.
 152. Rico F., Roca-Cusachs P., Gavara N., Farré R., Rotger M., Navajas D. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips // *Phys. Rev. E.* 2005. V. 72. P. 1–10.
 153. Puricelli L., Galluzzi M., Schulte C., Podestà A., Milani P. Nanomechanical and topographical imaging of living cells by atomic force microscopy with colloidal probes // *Rev. Sci. Instrum.* 2015. V. 86(3). P. 1–17.
 154. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. Т. 7. Теория упругости. М.: Наука, 1987. С. 68.
 155. Salbreux G., Charras G., Paluch E. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis // *Trends in Cell Biology.* 2012. V. 22(10). P. 536–545.
 156. Kasas S., Wang X., Hirling H., Marsault R., huni B., Yersin A., Regazzi R., Grenningloh G., Riederer B., Forro L., Dietler G., Catsicas S Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly // *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 2005. V. 62. P. 124–132.
 157. Roduit Ch., S. Sekatski, Dietler G., Catsicas S., Lafont F., Kasas S. Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy // *Biophys. J.* 2009. V. 97. P. 674–677.
 158. Clark A.G., Dierkes K., Paluch E.K. Monitoring actin cortex thickness in live cells // *Biophys. J.* 2013. V. 105(3). P. 570–580.
 159. Лавриненко В.А., Бабина А.В. Физиология крови для студентов КРИ: Учебно-методическое пособие. Новосибирский государственный университет, 2015. 116 с.
 160. Nowakowski R., Luckham P., Winlove P. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1514(2). P. 170–176.

161. Sakaue M., Taniguchi K. Imaging of the Lectin-Labeled Cell Surface of Human Lymphocytes by the Use of Atomic Force Microscope // *J. Vet. Met. Sci.* 2001. V. 63(2). P. 223-225.
162. Скоркина М. Ю., Фёдорова М. З., Муравьёв А. В. Цитоархитектоника лимфоцитов здоровых доноров в условиях активации и блокады β -адренорецепторов // *Ярославский педагогический вестник*. 2011. № 3(3). С. 104-109.
163. Zheng Y., Wen J., Nguyen J., Cachia M.A., Wang Ch., Suna Yu Decreased deformability of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia // *Sci. Rep.* 2015. V. 5:7613. P. 1–5.
164. Walch M., Ziegler U., Groscurth P. Effect of streptolysin O on the microelasticity of human platelets analyzed by atomic force microscopy // *Ultramicroscopy*. 2000. V. 82. P. 259–267.
165. Higgins Ch. Hemoglobin and its measurement // *acutecaretesting.org* 07.2005 URL: <https://acutecaretesting.org/en/articles/hemoglobin-and-its-measurement> (Дата посещения: 26.09.2017).
166. Chen X., Feng L., Jin H., Feng S., Yu Y. Quantification of the erythrocyte deformability using atomic force microscopy: correlation study of the erythrocyte deformability with atomic force microscopy and hemorheology // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2009. V. 43(3). P. 243–251.
167. Trafton A. New model shows molecular mechanics of red blood cells // *MIT Tech Talk*. 2007. V. 51(20). P. 5.
168. Zhang Y., Zhang W., Wang S., Wang C., Xie J., Chen X., Xu Y., Mao P. Detection of human erythrocytes influenced by iron deficiency anemia and thalassemia using atomic force microscopy // *Micron*. 2012. V. 43(12). P. 1287–1292.
169. Lamzin I.M., Khayrullin R.M. The Quality Assessment of Stored Red Blood Cells Probed Using Atomic-Force Microscopy // *Anat. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 1–5.
170. Багаутдинов Ш.М., Вильянинов В.Н., Ващенко В.И., Попова Н.Н., Левичев В.В., Гайдаш А.А. Длияние глубокого замораживания на клеточную структуру эритроцитов человека // *Вестник международной академии холода*. 2014. № 2. С. 41-44.
171. Cui Y., Guo Z., Zhao Y., Zheng Y., Qiao Y., Cai J., Liu S. Reactive effect of low intensity He-Ne laser upon d amaged ultrastructure of human erythrocyte membrane in Fenton system by atomic force microscopy // *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)*. 2007. V. 39(7). P. 484-489.
172. Buys A.V., Van Rooy M.-J., Soma P., Van Papendorp D., Lipinski B., Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study // *Cardiovasc. Diabetol.* 2013. V. 12. P. 1–6.
173. Стародубцева М.Н., Кузнецова Т.Г., Егоренков Н.И., Черенкевич С.Н. Структурно-механические свойства мембран эритроцитов больных сахарным диабетом 2-го типа // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2008. Т. 145. №1. С. 106-110.

174. Kamruzzahan A.S., Kienberger F., Stroh C.M., Berg J., Huss R., Ebner A., Zhu R., Rankl C., Gruber H.J., Hinterdorfer P. Imaging morphological details and pathological differences of red blood cells using tapping-mode AFM // *Biol. Chem.* 2004. V. 385(10). P. 955–960.
175. Li A., Mansoor A.H., Tan K.S., Lim C.T. Observations on the internal and surface morphology of malaria infected blood cells using optical and atomic force microscopy // *J. Microbiol. Methods.* 2006. V. 66(3). P. 434–439.
176. Cooke B.M., Mohandas N., Coppel R.L. The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes // *Adv. Parasitol.* 2001. V. 50. P. 1–86.
177. Zuk A., Targosz-Korecka M., Szymonski M. Effect of selected drugs used in asthma treatment on morphology and elastic properties of red blood cells // *Int. J. Nanomedicine.* 2011. V. 6. P. 249–257.
178. Hekele O., Goesselsberger C.G., Gebeshuber I.C. Nanodiagnostics performed on human red blood cells with atomic force microscopy // *Materials Science and Technology.* 2008. V. 24(9). P. 1162-1165.
179. Mazia D., Schatten G. and Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to Electron Microscopy // *Journal of Cell Biology.* 1975. V. 66(9). P. 198–200.
180. Poly-L-lysine solution // Sigma-Aldrich URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p8920> (Дата посещения: 20.03.2017).
181. Tuvia S., Almagor A., Bitler A., Levin S., Korenstein R., Yedgar S. Cell membrane fluctuations are regulated by medium macroviscosity: Evidence for a metabolic driving force // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94(10). P. 5045–5049.
182. Thomas N.E., Coakley W.T., Winters C. Contact formation in polylysine-mediated membrane-glass interaction. // *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 1996. V. 6. P. 139–147.
183. PLL (Poly-L-lysine) coated glass slide // Matsunami Glass Ind, Ltd. URL: http://www.matsunami-glass.co.jp/english/life/clinical_g/data14.html (Дата посещения: 26.09.2017).
184. Sitterley G. Poly-lysine // Sigma-Aldrich URL: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/poly-lysine.html> (Дата посещения: 26.09.2017).
185. Mohanty J., Nagababu E., Rifkind J. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging // *Front. Physiol.* 2014. V. 5. P. 1–6.
186. Faucherre A., Kissa K., Nargeot J., Mangoni M., Jopling Ch. Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis // *Haematologica.* 2014. V. 99. N 1. P. 70–75.
187. Cahalan S., Lukacs V., Ranade S., Chien S., Bandell M., Patapoutian A. Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume // *eLIFE.* 2015. 4:e07370.DOI: 10.7554. P. 1–12.

188. Каде А.Х., Занин С.А., Губарева Е.А., Туровая А.Ю., Богданова Ю.А., Апсаямова С.О., Мерзлякова С.Н. Физиологические функции сосудистого эндотелия // *Фундаментальные исследования*. 2011. № 11(3). С. 611–617.
189. Michiels C. Endothelial cell functions // *J. Cell Physiol*. 2003. V. 196(3). P. 430–443.
190. Szymonski M., Targosz-Korecka M., Malek-Zietek K.E. Nano-mechanical model of endothelial dysfunction for AFM-based diagnostics at the cellular level // *Pharmacol. Rep*. 2015. V. 67(4). P. 728–735.
191. Fels J., Callies C., Kusche-Vihrog K., Oberleithner H. Nitric oxide release follows endothelial nanomechanics and not vice versa // *Pflugers Arch*. 2010. V. 460(5). P. 915–923.
192. Callies C., Schön P., Liashkovich I., Stock C., Kusche-Vihrog K., Fels J., Sträter A.S., Oberleithner H. Simultaneous mechanical stiffness and electrical potential measurements of living vascular endothelial cells using combined atomic force and epifluorescence microscopy // *Nanotechnology*. 2009. V. 20(17). P. 1–8.
193. Ju H., Zou R., Venema V.J., Venema R.C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity // *J Biol Chem*. 1997. V. 272(30). P. 18522–18525.
194. Fels J., Jeggle P., Kusche-Vihrog K., Oberleithner H. Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium // *PLoS One*. 2012. V. 7(7). P. 1–11.
195. Grimm K.B., Oberleithner H., Fels J. Fixed endothelial cells exhibit physiologically relevant nanomechanics of the cortical actin web // *Nanotechnology*. 2014. V. 25. P. 1–7.
196. Chavez A., Smith M., Mehta D. New insights into the regulation of vascular permeability // *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011. V. 290. P. 205–248.
197. Хапчаев А.Ю., Ширинский В.П., Воротников А.В. Структура, свойства и регуляция белковых продуктов генетического локуса киназы легких цепей миозина // *Успехи биологической химии*. Т. 43. 2003. С. 365–420.
198. Reynoso R., Perrin R.M., Breslin J.W., Daines D.A., Watson K.D., Watterson D.M., Wu M.H., Yuan S. A role for long chain myosin light chain kinase (MLCK-210) in microvascular hyperpermeability during severe burns // *Shock*. 2007. V. 28(5). P. 589–595.
199. Vilitkevich E.L., Khapchaev A.Y., Kudryashov D.S., Nikashin A.V., Schavocky J.P., Lukas T.J., Watterson D.M., Shirinsky V.P. Phosphorylation Regulates Interaction of 210-kDa Myosin Light Chain Kinase N-terminal Domain with Actin Cytoskeleton // *Biochemistry (Mosc)*. 2015. V. 80(10). P. 1288–1297.
200. Sato M., Nagayama K., Kataoka N., Sasaki M., Hane K. Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress // *J. Biomech*. 2000. V. 33(1). P. 127–135.

201. Oberleithner H. Aldosterone makes human endothelium stiff and vulnerable // *Kidney Int.* 2005. V. 67(5). P. 1680–1682.
202. Birukova A.A., Arce F.T., Moldobaeva N., Dudek S.M., Garcia J.G., Lal R., Birukov K.G. Endothelial permeability is controlled by spatially defined cytoskeletal mechanics: atomic force microscopy force mapping of pulmonary endothelial monolayer // *Nanomedicine.* 2009. V. 5(1). P. 30–41.
203. Galley H.F., Webster N.R. Physiology of the endothelium // *Br J Anaesth.* 2004. V. 93(1). P. 105-113.
204. Targosz-Korecka M., Malek-Zietek K.E., Brzezinka G.D., Jaglarz M. Morphological and nanomechanical changes in mechanosensitive endothelial cells induced by colloidal AFM probes // *Scanning.* 2016. V. 38(6). P. 654–664.
205. Arce F.T., Whitlock J.L., Birukova A.A., Birukov K.G., Arnsdorf M.F., Lal R., Garcia J.G., Dudek S.M. Regulation of the micromechanical properties of pulmonary endothelium by S1P and thrombin: role of cortactin // *Biophys. J.* 2008. V. 95(2). P. 886–894.
206. Martens J.C., Radmacher M. Softening of the actin cytoskeleton by inhibition of myosin II // *Pflugers Arch.* 2008. V. 456(1). P. 95–100.
207. Pesen D., Hoh J.H. Micromechanical Architecture of the Endothelial Cell Cortex // *Biophys J.* 2005. V. 88(1). P. 670–679.
208. Grady M.E., Composto R.J., Eckmann D.M. Cytoskeletal Perturbing Drugs and Their Effect on Cell Elasticity // *Mechanics of Biological Systems and Materials.* 2016. V. 6. P. 169-177.
209. Jalilian I., Heu C., Cheng H., Freitag H., Desouza M., Stehn J.R., Bryce N.S., Whan R.M., Hardeman E.C., Fath T., Schevzov G., Gunning P.W. Cell elasticity is regulated by the tropomyosin isoform composition of the actin cytoskeleton // *PLoS One.* 2015. V. 10(5). P. 1–23.
210. Rigato A., Rico F., Eghiaian F., Piel M., Scheuring S. Atomic Force Microscopy Mechanical Mapping of Micropatterned Cells Shows Adhesion Geometry-Dependent Mechanical Response on Local and Global Scales // *ACS Nano.* 2015. V. 9(6). P. 5846-5856.
211. Kataoka N., Iwaki K., Hashimoto K., Mochizuki S., Ogasawara Y., Sato M., Tsujioka K., Kajiya F. Measurements of endothelial cell-to-cell and cell-to-substrate gaps and micromechanical properties of endothelial cells during monocyte adhesion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99(24). P. 15638–15643.
212. Mathur A.B., Reichert W.M., Truskey G.A. Flow and high affinity binding affect the elastic modulus of the nucleus, cell body and the stress fibers of endothelial cells // *Ann. Biomed. Eng.* 2007. V. 35(7). P. 1120–1130.

213. Fabry B., Maksym G.N., Butler J.P., Glogauer M., Navajas D., Taback N.A., Millet E.J., Fredberg J.J. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells // *Phys. Rev. E*. 2003. V. 68 P. 041914-1–18.
214. Darling E.M., Topel M., Zauscher S., Vail T.P., Guilak F. Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes // *J. Biomech*. 2008. V. 41(2). P. 454–464.
215. Kirmizis D., Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics // *Int. J. Nanomedicine*. 2010. V. 5. P. 137–145.
216. Kronlage C., Schäfer-Herte M., Böning D., Oberleithner H., Fels J. Feeling for Filaments: Quantification of the Cortical Actin Web in Live Vascular Endothelium // *Biophys J*. 2015. V. 109(4). P. 687–698.
217. Haase K., Pelling, A.E. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy // *J. R. Soc. Interface*. 2015. V. 124. P. 1-16.
218. Wainwright M.S., Rossi J., Schavocky J., Crawford S., Steinhorn D., Velentza A.V., Zasadzki M., Shirinsky V., Jia Y., Haiech J., Van Eldik L.J., Watterson D.M. Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2003. V. 100(10). P. 6233–6238.
219. Cheng Y., Liu M., Li R., Wang C., Bai C., Wang K. Gadolinium induces domain and pore formation of human erythrocyte membrane: an atomic force microscopic study // *Biochim Biophys Acta*. 1999. V. 1421(2). P. 249–260.
220. Стародубцева, М.Н.; Кузнецова, Т.Г.; Кузнецова, Т.А.; Эллори, Дж.К.; Черенкевич, С.Н.; Абетковская, С.О. Особенности пойкилоцитоза, вызванного действием активных форм азота // *Проблемы здоровья и экологии*. 2006. №2(8). С. 117–121.
221. Li M., Liu L.Q., Xi N., Wang Y.C. Nanoscale monitoring of drug actions on cell membrane using atomic force microscopy // *Acta Pharmacol. Sin*. 2015. V. 36(7). P. 769–782.
222. Hung M.-Sh., Tsai M.-F. Investigating the Influence of Anti-Cancer Drugs on the Mechanics of Cells Using AFM // *BioNanoSci*. 2015. V. 5(3). P. 156–161.
223. Cellular neuroscience // Wikipedia: The free encyclopedia. 01.08.2017 URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Cellular_neuroscience (дата обращения: 27.09.2017).
224. Spedden E., Staii C. Neuron biomechanics probed by atomic force microscopy // *Int. Mol. J*. 2013. V. 14. P. 16124–16140.
225. Jembrek M.J., Šimić G., Hof P.R., Šegota S. Atomic force microscopy as an advanced tool in neuroscience // *Transl. Neurosci*. 2015. V. 6(1). P. 117–130.
226. Henderson E., Haydon P.G., Sakaguchi D.S. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy // *Science*. 1992. V. 257(5078). P. 1944–1946.

227. Ефремов Ю.М., Дзюбенко Е.В., Багров Д.В., Максимов Г.В., Шрам С.И., Шайтан К.В. Исследование распределения и механических свойств цитоскелета астроцитов в среде культивирования методом атомно-силовой микроскопии // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3. №3. С. 96–102.
228. Recek N., Cheng X., Keidar M., Cvelbar U., Vesel A., Mozetic M., Sherman J. Effect of cold plasma on glial cell morphology studied by atomic force microscopy // *PLoS One*. 2015. V. 10(3). P. 1–14.
229. McNally H.A., Borgens R.B. Three-dimensional imaging of living and dying neurons with atomic force microscopy // *J. Neurocytol.* 2004. V. 33(2). P. 251–258.
230. Shibata M., Uchihashi T., Ando T., Yasuda R. Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 1–7.
231. Pain ladder // Wikipedia: The free encyclopedia. 15.09.2017 URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Pain_ladder (дата обращения: 27.09.2017).
232. Халисов М.М., Пеннийнен В.А., Есикова Н.А., Анкудинов А.В., Крылов Б.В. Особенности рецептор- и трансдуктор-опосредованной активации внутриклеточных сигнальных каскадов в сенсорном нейроне, выявленные с помощью метода атомно-силовой микроскопии // *Письма в ЖТФ*, Т. 43(1). 2017. С. 89-94.
233. Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А., Людыно М.И., Кузьмин А.В., Изварина Н.Л. Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов // *Рос. Физиол. Журн.* 1999. Т. 85(2). С. 225–236.
234. Plakhova V., Rogachevsky I., Lopatina E., Shelykh T., Butkevich I., Mikhailenko V., Otellin V., Podzorova S., Krylov B. A novel mechanism of modulation of slow sodium channels: from ligand-receptor interaction to design of an analgesic medicine // *Activitas Nervosa Superior Rediviva*. 2014. V. 56(3-4). P. 55–64.
235. Анальгетическое средство и способ лечения болевого синдрома различной этиологии с помощью этого средства : пат. 2367432 Рос. Федерация. № 2007135968/15 ; заявл. 27.09.2007 ; опубл. 20.09.2009, Бюл. № 26. 26 с.
236. Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V. Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na⁺,K⁺-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief // *Med. Chem.* 2012. V. 8(1). P. 33–39.
237. Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and a signal transducer // *Cel. Mol. Biol.* 2001. V. 47. P. 383–390.

238. Пеннийнен В.А., Кипенко А.В., Лопатина Е.В., Крылов Б.В. Участие р38 МАРК сенсорных нейронов в сигнальном каскаде, запускаемом убаином // Российский физиологический журнал им. Сеченова. 2016. Т. 102. №12. С. 80–86.
239. Лопатина Е.В., Пеннийнен В.А., Зайка А.А. Исследование участия Na^+ , K^+ -АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре // БЭБиМ. 2005. Т. 140(8). С. 150–153.
240. Лопатина Е.В., Карецкий А.В., Пеннийнен В.А., Виноградова Т.В. Участие сердечных гликозидов в регуляции роста эксплантатов ткани сетчатки. БЭБиМ. 2008. Т. 146(12). С. 651–653.
241. Chiou Y.W., Lin H.K., Tang M.J., Lin H.H., Yeh M.L. The influence of physical and physiological cues on atomic force microscopy-based cell stiffness assessment // PLoS One. 2013. V. 8(10). P. 1–12.
242. Skou J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves // Biochim. Biophys. Acta. 1957. V. 23. P. 394–401.
243. Mobasher A., Avila J., Cozar-Castellano I., Brownleader M.D., Trevan M., Francis M.J.O., Lamb J.F., Martin-Vassallo P. Na^+ , K^+ -ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions // Bioscience Reports. 2000. V. 20(2). P. 51–90.
244. Kaplan J.H. Biochemistry of Na^+ , K^+ -ATPase // Annu. Rev. Biochem. 2002. V. 71. P. 511–535.
245. Xie Z., Askari A. Na^+ / K^+ -ATPase as signal transducer // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269(10). P. 2434–2439.
246. Schoner W., Scheiner-Bobis G. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer // Semin. Nephrol. 2005. V. 25(5). P. 343–351.