



УДК 57.085.23 + 577.353.2 + 577.29

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-58-68>

## Применение методов атомно-силовой микроскопии и органотипической культуры ткани для исследования действия на мембрану сенсорного нейрона аргининсодержащего короткого пептида, претендующего на роль анальгетической лекарственной субстанции

М. М. Халисов<sup>✉1</sup>, В. А. Пеннийнен<sup>1</sup>, А. В. Анкудинов<sup>2</sup>, С. А. Подзорова<sup>1</sup>, Б. В. Крылов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

<sup>2</sup> Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, 194021, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 26

### Сведения об авторах

Максим Миндигалеевич Халисов, SPIN-код: [5815-3655](#), Scopus AuthorID: [56771519000](#), Researcher ID: [G-2826-2015](#), e-mail: [hamax@list.ru](mailto:hamax@list.ru)

Валентина Альбертовна Пеннийнен, SPIN-код: [6610-3718](#), Scopus AuthorID: [6603501257](#), Researcher ID: [Q-3979-2016](#), e-mail: [pvalentina2@yandex.ru](mailto:pvalentina2@yandex.ru)

Александр Витальевич Анкудинов, SPIN-код: [5410-9240](#), Scopus AuthorID: [7005323821](#), Researcher ID: [C-1478-2014](#), e-mail: [alexander.ankudinov@mail.ioffe.ru](mailto:alexander.ankudinov@mail.ioffe.ru)

Светлана Александровна Подзорова, SPIN-код: [3974-3430](#), Scopus AuthorID: [6602224180](#), Researcher ID: [ABB-8808-2020](#), e-mail: [sveap@yandex.ru](mailto:sveap@yandex.ru)

Борис Владимирович Крылов, SPIN-код: [3946-6408](#), Scopus AuthorID: [7004655760](#), Researcher ID: [ABD-5044-2020](#), e-mail: [krylov@infran.ru](mailto:krylov@infran.ru)

**Для цитирования:** Халисов, М. М., Пеннийнен, В. А., Анкудинов, А. В., Подзорова, С. А., Крылов, Б. В. (2022) Применение методов атомно-силовой микроскопии и органотипической культуры ткани для исследования действия на мембрану сенсорного нейрона аргининсодержащего короткого пептида, претендующего на роль анальгетической лекарственной субстанции. *Интегративная физиология*, т. 3, № 1, с. 58–68. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-58-68>

**Получена** 6 февраля 2022; прошла рецензирование 24 февраля 2022; принята 1 марта 2022.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке Госпрограммы ГП-47 «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

**Права:** © М. М. Халисов, В. А. Пеннийнен, А. В. Анкудинов, С. А. Подзорова, Б. В. Крылов (2022).

Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Известно, что применение опиатов для лечения хронической боли связано с возникновением негативных побочных эффектов. В связи с этим разработка новых безопасных и эффективных неопиоидных анальгетиков — актуальная задача современной науки. Ранее мы обнаружили, что на роль анальгетической лекарственной субстанции может претендовать тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, поскольку он способен снижать возбудимость ноцицептивных нейронов, ответственных за кодирование ноцицептивных сигналов. В настоящей работе приведены данные о действии субнаномолярной концентрации тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> на эмбриональные сенсорные нейроны, полученные методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) и органотипической культуры ткани. Применяли квазистатический режим АСМ PeakForce QNM, позволяющий проводить картирование локальных механических свойств клеток. Под действием исследуемого агента сенсорные нейроны демонстрировали тенденцию к уменьшению своей жесткости. Этот результат основывается на анализе данных о величинах кажущегося модуля Юнга сенсорных нейронов и их деформации, определенной с учетом проскальзывания острия зонда по изучаемой поверхности. Использование критерия индекса площади (ИП) показало, что исследуемый тетрапептид обладает выраженными нейрит-стимулирующими свойствами. Полученные данные позволяют предположить, что Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, действующий в очень низких концентрациях, способен запускать пока не идентифицированный внутриклеточный каскад, регулирующий рост нейритов сенсорных нейронов.

**Ключевые слова:** сенсорные нейроны, короткие пептиды, Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, атомно-силовая микроскопия, метод органотипической культуры ткани

# The use of atomic force microscopy and organotypic tissue culture to study the effect of a short arginine-containing peptide with analgesic potential on the sensory neuron membrane

M. M. Khalisov<sup>✉</sup><sup>1</sup>, V. A. Penniyaynen<sup>1</sup>, A. V. Ankudinov<sup>2</sup>, S. A. Podzorova<sup>1</sup>, B. V. Krylov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

<sup>2</sup> Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, 26 Politekhnikeskaya Str., Saint Petersburg 194021, Russia

## Authors

Maksim M. Khalisov, SPIN: [5815-3655](#), Scopus AuthorID: [56771519000](#), Researcher ID: [G-2826-2015](#), e-mail: [hamax@list.ru](mailto:hamax@list.ru)

Valentina A. Penniyaynen, SPIN: [6610-3718](#), Scopus AuthorID: [6603501257](#), Researcher ID: [Q-3979-2016](#), e-mail: [pvalentina2@yandex.ru](mailto:pvalentina2@yandex.ru)

Alexander V. Ankudinov, SPIN: [5410-9240](#), Scopus AuthorID: [7005323821](#), Researcher ID: [C-1478-2014](#), e-mail: [alexander.ankudinov@mail.ioffe.ru](mailto:alexander.ankudinov@mail.ioffe.ru)

Svetlana A. Podzorova, SPIN: [3974-3430](#), Scopus AuthorID: [6602224180](#), Researcher ID: [ABB-8808-2020](#), e-mail: [sveap@yandex.ru](mailto:sveap@yandex.ru)

Boris V. Krylov, SPIN: [3946-6408](#), Scopus AuthorID: [7004655760](#), Researcher ID: [ABD-5044-2020](#), e-mail: [krylov@infran.ru](mailto:krylov@infran.ru)

**For citation:** Khalisov, M. M., Penniyaynen, V. A., Ankudinov, A. V., Podzorova, S. A., Krylov, B. V. (2022) The use of atomic force microscopy and organotypic tissue culture to study the effect of a short arginine-containing peptide with analgesic potential on the sensory neuron membrane. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 1, pp. 58–68. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-58-68>

**Received** 6 February 2022; reviewed 24 February 2022; accepted 1 March 2022.

**Funding:** This study was supported by the State Program GP-47 “Scientific and Technological Development of the Russian Federation” (2019–2030), theme 0134-2019-0001.

**Copyright:** © M. M. Khalisov, V. A. Penniyaynen, A. V. Ankudinov, S. A. Podzorova, B. V. Krylov (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](#).

**Abstract.** Opiate use to treat chronic pain is known to be associated with negative side effects. Therefore, the development of new safe and effective non-opioid analgesics is both important and urgent goal of modern science. Previously, we showed that tetrapeptide Ac-RERR-NH<sub>2</sub> has potential as an analgesic drug substance, since it can reduce the excitability of nociceptive neurons responsible for encoding nociceptive signals. The effect of sub-nanomolar concentration of Ac-RERR-NH<sub>2</sub> tetrapeptide on embryonic sensory neurons was investigated with the use of atomic force microscopy (AFM) and organotypic tissue culture method. The quasi-static PeakForce QNM AFM mode was used, which allows mapping of local mechanical cell properties. Following administration of the substance, sensory neurons tended to decrease their stiffness. This result is based on the analysis of the values of the apparent Young’s modulus of sensory neurons and their deformation, controlled for the slipping of the tip of the probe over the surface under study. The area index (AI) criterion showed that the studied tetrapeptide has pronounced neurite-stimulating properties. The data obtained suggest that Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, acting at very low concentrations, is able to trigger an as yet unidentified intracellular cascade regulating the growth of neurites of sensory neurons.

**Keywords:** sensory neurons, short peptides, Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, atomic force microscopy, organotypic nerve culture method

## Введение

Ранее с помощью метода локальной фиксации потенциала было обнаружено, что субстанция эндогенной природы убаин в наномолярных концентрациях (ЭУ) является сильным анальгетиком (Plakhova et al. 2020). Помимо проявления анальгетических свойств, ЭУ вызывает увеличение жесткости сенсорных нейронов и ингибирование роста нейритов эмбриональных нервных клеток (Халисов и др. 2017; Plakhova

et al. 2020). Согласно нашей гипотезе, действие ЭУ объясняется активацией трансдукторной функции комплекса Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-аза/Src, ведущей к запуску MAP-киназного пути p38 и к снижению экспрессии каналов Na<sub>v</sub>1.8. В результате уменьшается плотность этих каналов в цитоплазматической мембране нейрона, что делает ее более гомогенной. По-видимому, именно этими эффектами объясняется увеличение жесткости ноцицептивного нейрона при воздействии очень низких (субнаномолярных) концентраций

исследуемого агента (Пенниайнен и др. 2020; Халисов и др. 2021; Plakhova et al. 2020). Действие ЭУ принципиально отличается от действия коеновой кислоты, также претендующей на роль анальгетической лекарственной субстанции. Коеновая кислота обладает нейростимулирующими свойствами, но не влияет на механические характеристики ноцицептивных нейронов. Активация MAPK-каскада ERK1/2 не вызывает изменения экспрессии генов *SCN10A*, продуцирующих каналы  $Na_v1.8$ , в отличие от ЭУ (Халисов и др. 2017; Rogachevskii et al. 2022).

Тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, фрагмент молекулы эндогенного антибиотика дефенсина NP-1, также может претендовать на роль анальгетической лекарственной субстанции — благодаря своей способности модулировать потенциалочувствительность медленных натриевых каналов ( $Na_v1.8$ ), участвующих в первичном сенсорном кодировании ноцицептивных сигналов. Действуя с наружной стороны мембраны в концентрации 100 нМ, данный агент снижал величину эффективного заряда активационного воротного устройства этих каналов (Рогачевский и др. 2021). Настоящая работа посвящена исследованию эффектов действия указанного агента, примененного в сниженной в тысячу раз концентрации. Для этого мы использовали высокочувствительные методы атомно-силовой микроскопии и органотипической культуры ткани, позволяющие проводить прижизненные исследования нервных клеток.

## Методы исследования

### Атомно-силовая микроскопия

В основе метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) (Binnig et al. 1986), позволяющего изучать поверхности широкого спектра материалов, лежит силовое взаимодействие между исследуемой поверхностью и зондовым датчиком (кантилевером). Последний представляет собой упругую консоль, на конце которой располагается острая игла (зонд). АСМ позволяет с высоким пространственным разрешением визуализировать топографию рельефа поверхности образца, а также количественно характеризовать различные поверхностные свойства, например механические. Благодаря прецизионному контролю силы взаимодействия между зондом и объектом с помощью АСМ можно изучать даже мягкие нативные клетки (Haase, Pelling 2015; Kuznetsova et al. 2007).

На рисунке 1А приведена схема, иллюстрирующая принцип работы атомно-силового микроскопа на примере сенсорного нейрона. Зонд атомно-силового микроскопа построено ска-

нирует участок дна чашки Петри с иммобилизованной клеткой, тем самым отслеживая ее рельеф. В результате формируется изображение топографии, представляющее собой карту распределения локальных высот поверхности сенсорного нейрона. Для получения количественной информации о механических свойствах клетки поверхность сенсорного нейрона подвергается индентированию (продавливанию) зондом атомно-силового микроскопа. Сила контактного взаимодействия «зонд — клетка» контролируется по величине изгиба кантилевера с помощью оптической системы детектирования, включающей в себя лазер и четырехсекционный фотодетектор. На удалении от исследуемой поверхности система детектирования юстируется таким образом, что отраженный от кантилевера свет попадает в центр фотодетектора и разностный сигнал между двумя нижними и двумя верхними сегментами равен нулю. При соприкосновении зонда с поверхностью разностный сигнал на фотодетекторе отклоняется от нуля, изменяясь пропорционально углу изгиба кантилевера и, как следствие, силе, действующей между зондом и исследуемой поверхностью. В процессе индентирования поверхности регистрируются силовые кривые, анализ которых и позволяет количественно характеризовать механические свойства клетки (Hu et al. 2020; Pittenger et al. 2014).

АСМ-эксперименты проводили с использованием сенсорных нейронов 10–12-дневных куриных эмбрионов по ранее описанному протоколу (Plakhova et al. 2020). Тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub> в концентрации 10<sup>-10</sup> М добавляли к эксплантатам в чашки Петри за 72 часа до исследования. Тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub> был получен методом классического пептидного синтеза (НПФ Верта, Россия). Контрольные эксплантаты культивировали в питательной среде без исследуемого агента.

Экспериментальная АСМ-установка включала в себя атомно-силовой микроскоп BioScope Catalyst (Bruker, США) и инвертированный оптический микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Световой микроскоп применяли для поиска сенсорных нейронов, подходящих для АСМ-индентирования, и позиционирования кантилевера относительно клетки до подведения зонда к поверхности дна чашки Петри (рис. 1В). АСМ-сканирование клеток осуществляли в физиологически адекватных условиях: в чашках Петри с питательной средой, при температуре ≈37 °С. Для усиления адгезии сенсорных нейронов к подложке дно чашек Петри предварительно обрабатывали

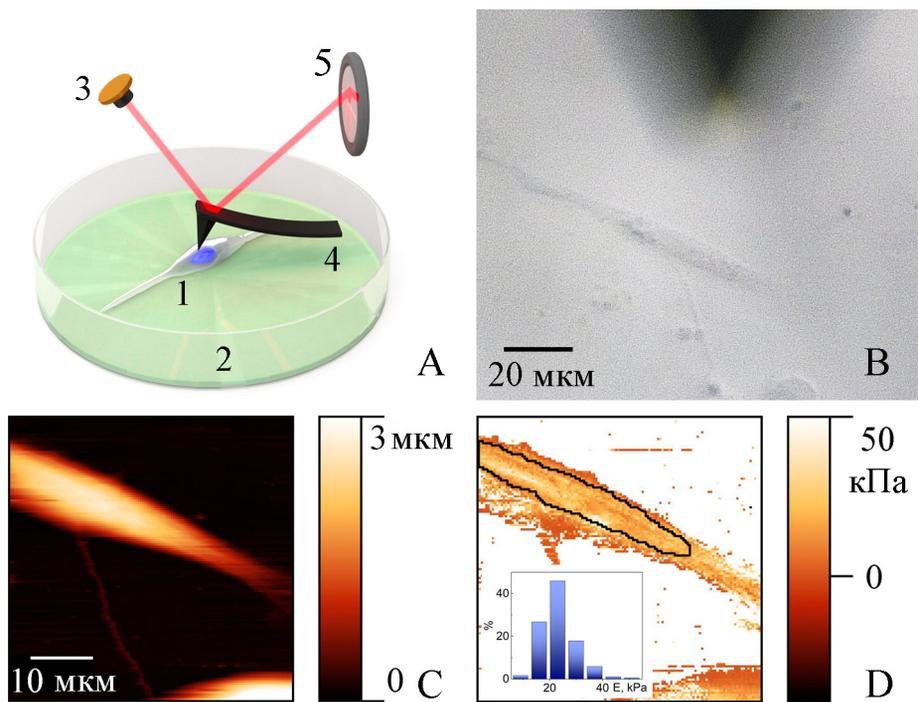


Рис. 1. (А) схематичное представление индентирования сенсорного нейрона зондом атомно-силового микроскопа (1 — сенсорный нейрон, 2 — чашка Петри, 3 — лазер, 4 — кантилевер, 5 — фотодетектор); (В) микрофотография (в верхней части — АСМ-кантилевер), (С) АСМ-изображение топографии поверхности и (D) карта кажущегося модуля Юнга сенсорного нейрона, подвергнутого действию тетрапептида Ас-RERR-NH<sub>2</sub> (10<sup>-10</sup> М). На (D) рамкой показана область анализа, во вставке приведена гистограмма значений кажущегося модуля Юнга в рамках выделенной области

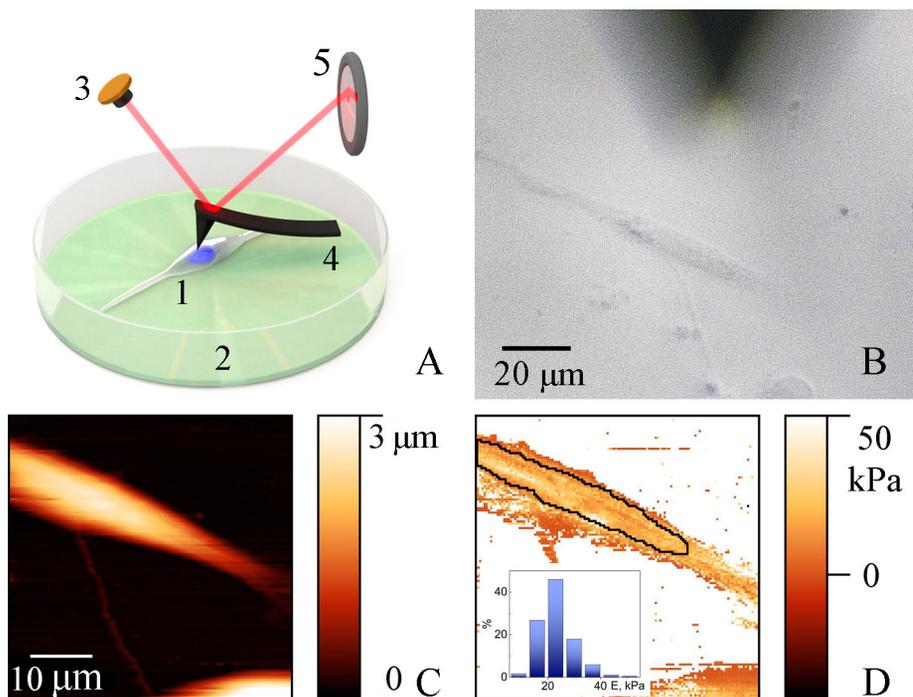


Fig. 1. (A) Schematic diagram of indentation of a sensory neuron with an atomic force microscope tip (1—sensory neuron, 2—Petri dish, 3—laser, 4—cantilever, 5—photodetector); (B) photomicrograph (AFM cantilever is visible in the upper part), (C) AFM surface topography image, and (D) apparent Young's modulus map of a sensory neuron exposed to Ac-RERR-NH<sub>2</sub> tetrapeptide (10<sup>-10</sup> M). In panel (D), the frame shows the area of analysis, the inset shows a histogram of the apparent Young's modulus values within the selected area

поли-L-лизином (Sigma, США). Термостатирование чашки Петри во время АСМ-эксперимента обеспечивалось температурным контроллером 335-й модели (Lake Shore Cryotronics, США). Для индентирования мембраны сенсорных нейронов в процессе сканирования применяли АСМ-кантилеверы SNL-C (Bruker). Коэффициент жесткости каждого кантилевера определяли методом тепловых шумов перед исследованием клеток (Hutter, Bechhoefer 1993). Сенсорные нейроны подвергали сканированию в квазистатическом режиме работы АСМ PeakForce QNM (Hu et al. 2020; Pittenger, Slade 2013; Pittenger et al. 2014), в котором можно одновременно получать информацию о рельефе поверхности (рис. 1С) и картировать такие механические характеристики, как кажущийся модуль Юнга ( $E$ ) (рис. 1D), амплитуда деформации ( $D_E$ ). Посредством атомно-силового микроскопа визуализировали квадратные области подложки со стороной 30–50 мкм, содержащие сому сенсорных нейронов. Разрешение АСМ-изображений составляло  $128 \times 128$  точек, частота сканирования — 0,15 Гц. Индентирование клеток осуществляли с заданным значением пиковой силы 1 нН, амплитудой и частотой вертикальных колебаний зонда соответственно 1000 нм и 0,25 кГц. Во время сканирования сенсорного нейрона его состояние контролировали по получаемым АСМ-сигналам, а также с помощью оптической микроскопии. В случае повреждения клетки АСМ-сканирование прекращалось, механические параметры такого сенсорного нейрона не учитывали в дальнейшем при статистической обработке данных.

Для изучения влияния тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> ( $10^{-10}$  М) на механические характеристики сенсорных нейронов анализировали АСМ-карты кажущегося модуля Юнга клеток, определенного в соответствии с моделью Снеддона (рис. 1D) (Sneddon 1965), а также АСМ-карты амплитуды деформации. Анализ АСМ-изображений осуществляли в программе Gwyddion 2.58 (Nečas, Klapeček 2012). Каждый сенсорный нейрон характеризовали средним значением кажущегося модуля Юнга (деформации), определенного по всей поверхности сомы, попавшей в АСМ-кадр. Эффект действия тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> ( $10^{-10}$  М) на сенсорные нейроны оценивали путем сравнения усредненных значений кажущегося модуля Юнга (деформации) клеток, культивированных в присутствии исследуемого вещества, и контрольных нейронов.

Эффект действия Ac-RERR-NH<sub>2</sub> был проанализирован также в рамках отдельных экспери-

ментов, т. е. между собой сравнивали значения  $E$  обработанных тетрапептидом Ac-RERR-NH<sub>2</sub> ( $E_{\text{peptide}}$ ) и контрольных клеток ( $E_{\text{control}}$ ), исследованных в один и тот же день. Данный подход позволяет, во-первых, свести к минимуму вклад в результаты от погрешностей калибровки применяемого кантилевера, т. к. в рамках эксперимента использовали один и тот же кантилевер, и определенные для него параметры оставались неизменными, а во-вторых, нивелировать возможные особенности сенсорных нейронов от разных эмбрионов, поскольку клетки, культивированные с исследуемым веществом и без него, выделяли из одних и тех же эмбрионов. Витог эффект действия тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> на механические свойства первичных сенсорных нейронов определялся по значению соотношения  $E_{\text{peptide}}/E_{\text{control}}$ , которое вычисляли для каждого отдельного эксперимента.

Далее нами был произведен анализ действия тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> на величины деформации сенсорных нейронов с учетом эффекта проскальзывания острия зонда по исследуемой поверхности при ее АСМ-индентировании. Ранее было показано, что проскальзывание острия зонда по поверхности образцов с развитым рельефом может привести к ошибочным измерениям величины локальной деформации (Тимошук и др. 2019). В работе (Анкудинов, Халисов 2020) был предложен способ решения данной проблемы, повышающий точность измерений амплитуды деформации образца для скользящего контакта «зонд — поверхность».

В данной работе учет вклада от проскальзывания АСМ-зонда в сигнал деформации осуществляли с помощью упрощенного варианта фильтра, предложенного ранее (Анкудинов, Халисов 2020), который сводится к умножению сигнала деформации на квадрат косинуса угла  $\theta$  между направлением нормали к поверхности в точке измерения и вертикалью. В итоге для коррекции экспериментальных АСМ-данных деформации было использовано выражение (1), позволяющее учесть недооценку амплитуды деформации по силовой кривой (изначально деформация определяется по 85% контактной части силовой кривой) и величину ошибки пиковой силы.

$$D_C = \frac{D_E}{0,85} \cdot \frac{F_{SP}}{F_{SP} + F_E} \cos^2 \theta \quad (1)$$

где  $D_C$  и  $D_E$  — скорректированное и экспериментальное локальные значения деформации соответственно,  $F_{SP}$  — заданное значение пико-

вой силы,  $F_E$  — локальная ошибка силы,  $\theta$  — полярный угол отклонения нормали к поверхности от вертикальной линии.

### Органотипическая культура нервной ткани

Метод, используемый в данном исследовании, подробно описан в наших предыдущих работах (Пенниайнен и др. 2020; Plakhova et al. 2019; 2020; Rogachevskii et al. 2022). Объектами исследования были эксплантаты спинальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов. Экспериментальные эксплантаты культивировали в присутствии Ac-RERR-NH<sub>2</sub> в концентрации 10<sup>-10</sup> М в течение трех суток. Контрольными служили эксплантаты, культивированные в стандартной питательной среде без добавления тестируемого вещества. Для определения роста эксплантатов использовали количественный метод оценки — морфометрический метод. Рассчитывали ИП как отношение площади зоны роста эксплантата к исходной площади (Plakhova et al. 2019; 2020). В контрольной группе значение ИП принимали за 100%. Для прижизненной визуализации эксплантатов был использован микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss). Анализ полученных изображений осуществляли с помощью программ ImageJ и ZEN\_2012. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

### Статистическая обработка

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием  $t$ -критерия Стьюдента при анализе роста эксплантатов по ИП. Для оценки значимости различий в значениях кажущегося модуля Юнга применяли статистический  $U$ -критерий Манна — Уитни. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия между опытом и контролем считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

С помощью АСМ было исследовано 47 сенсорных нейронов, подвергнутых действию тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, и 40 контрольных клеток. Результат статистической обработки данных по значениям кажущегося модуля Юнга приведен на рисунке 2А. Тетрапептид Ac-RERR-NH<sub>2</sub> по сравнению с контролем вызвал уменьшение кажущегося модуля Юнга культи-

вированных с исследуемым веществом клеток. Несмотря на снижение среднего модуля Юнга почти на 30% относительно контрольного вследствие существенного разброса значений, различие между величинами модуля Юнга подвергшихся действию тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и контрольных сенсорных нейронов не является статистически значимым ( $p = 0,08$ ). Для прояснения эффекта действия тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> на механические характеристики первичных сенсорных нейронов был применен альтернативный способ анализа экспериментальных данных, заключающийся в сравнении значений кажущегося модуля Юнга клеток с тетрапептидом Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и контрольных в рамках отдельных экспериментов.

Для выявления эффекта действия молекулы тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> на сенсорные нейроны определяли соотношения средних кажущихся модулей Юнга клеток после воздействия изучаемой субстанции и контрольных нейронов. Полученные значения  $E_{\text{peptide}}/E_{\text{control}}$  для семи экспериментов представлены в таблице 1.

В результате среднее значение соотношения  $E_{\text{peptide}}/E_{\text{control}}$  указывает на уменьшение жесткости индентлируемого поверхностного слоя сенсорных нейронов под действием исследуемого вещества. Анализ данных таблицы 1 показывает, что кажущийся модуль Юнга сенсорных нейронов преимущественно меняется однонаправленно. Лишь два эксперимента выпадают из общей тенденции. В эксперименте № 2 зарегистрирован небольшой рост кажущегося модуля Юнга по отношению к контрольному значению. Возможно, на такой результат оказало влияние сравнительно низкое число клеток в группе культивированных с Ac-RERR-NH<sub>2</sub> сенсорных нейронов. Наблюдаемый в эксперименте № 3 ярко выраженный противоположно направленный эффект действия тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> можно связать с тем, что средний кажущийся модуль Юнга контрольных сенсорных нейронов оказался экстремально низким, минимальным среди всех экспериментов. Противоположное действие исследуемой субстанции, отмеченное в двух отдельных экспериментах, не изменяет общей тенденции к уменьшению жесткости сенсорных нейронов, культивированных с тетрапептидом Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, по сравнению с контролем. Эта тенденция совпадает с приведенным выше результатом, полученным при обобщенном анализе данных.

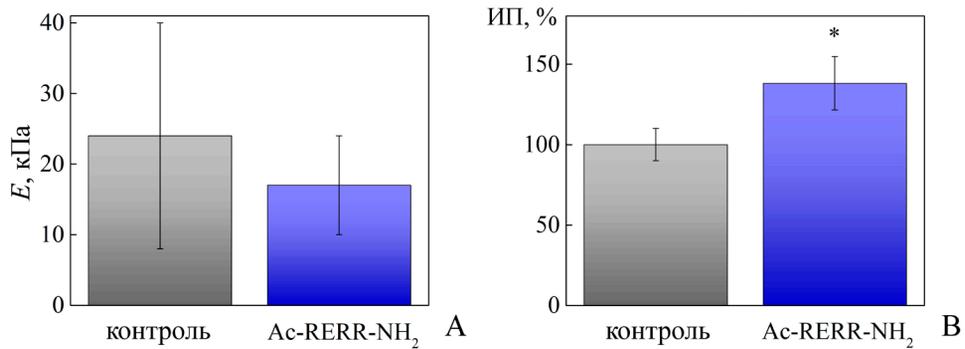


Рис. 2. (А) тенденция к уменьшению кажущегося модуля Юнга сенсорных нейронов под действием тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> и (Б) нейрит-стимулирующее действие тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> (10<sup>-10</sup> М) на рост нейритов сенсорных ганглиев (по оси ординат — индекс площади (ИП, %) эксплантатов); \* — p < 0,05

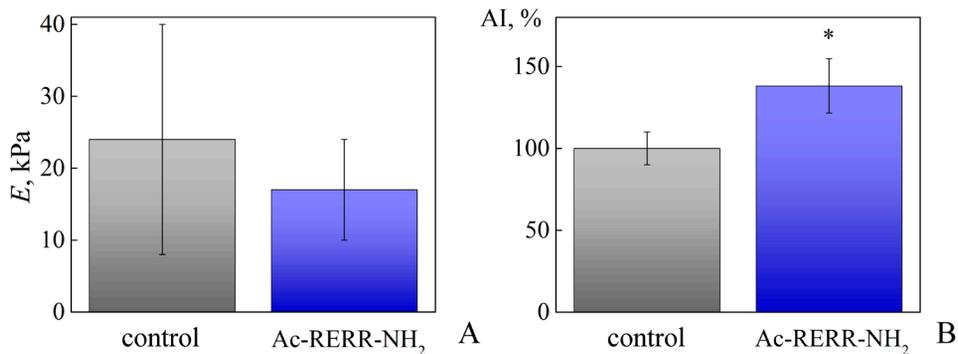


Fig. 2. (A) the tendency to decrease the apparent Young's modulus of the of sensory neuron surface under the action of Ac-RERR-NH<sub>2</sub> tetrapeptide and (B) the neurite-stimulating effect of Ac-RERR-NH<sub>2</sub> tetrapeptide (10<sup>-10</sup> M) on the growth of neurites of sensory ganglia (the ordinate shows the area index (AI, %) of explants); \* — p < 0.05

Табл. 1. Результаты сравнения значений кажущегося модуля Юнга сенсорных нейронов по отдельным экспериментам

№ эксперимента	$E_{control}$ , кПа	$E_{peptide}$ , кПа	$E_{peptide}/E_{control}$
1	21 (6)	13 (8)	0,62
2	16 (6)	17 (4)	1,06
3	12 (6)	18 (7)	1,50
4	46 (6)	18 (7)	0,39
5	16 (7)	13 (8)	0,81
6	30 (4)	22 (7)	0,73
7	31 (5)	19 (6)	0,61
Среднее значение		0,82	

Примечание: в скобках указано число изученных сенсорных нейронов.

Table 1. Results of comparing the values of the apparent Young's modulus of sensory neurons in individual experiments

Experiment number	$E_{control}$ , kPa	$E_{peptide}$ , kPa	$E_{peptide}/E_{control}$
1	21 (6)	13 (8)	0.62
2	16 (6)	17 (4)	1.06
3	12 (6)	18 (7)	1.50
4	46 (6)	18 (7)	0.39
5	16 (7)	13 (8)	0.81
6	30 (4)	22 (7)	0.73
7	31 (5)	19 (6)	0.61
Mean value		0.82	

Note: the number of sensory neurons studied is indicated in parentheses.

Также были проанализированы сигналы деформации сенсорных нейронов с учетом проскальзывания в контакте «зонд — клетка». В результате применения процедуры коррекции (Анкудинов, Халисов 2020) к сигналу экспериментальной деформации были получены следующие значения параметра у экспериментальных и контрольных клеток:  $333 \pm 108$  нм ( $n = 47$ ) и  $269 \pm 104$  нм ( $n = 40$ ) соответственно. Видно, что средняя скорректированная деформация сенсорных нейронов у культивированных в присутствии тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> чуть более чем на 20% выше, чем у контрольных клеток. Интересно, что без коррекции значения экспериментальной деформации составляли  $407 \pm 98$  нм в случае нейронов, культивированных в присутствии Ac-RERR-NH<sub>2</sub>, и  $342 \pm 124$  нм в контроле. Таким образом, проведенная коррекция изменила значения средней деформации нейронов, однако при этом соотношение средних деформаций экспериментальных и контрольных нейронов изменилось незначительно.

Полученный с помощью АСМ результат указывает на то, что действие тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> должно приводить к снижению жесткости тех нейронов, которые обладают специфическими молекулярными мишенями для восприятия этого воздействия. То, что подобные мишени существуют, подтверждают наши данные, полученные методом органотипической культуры ткани.

Методом органотипической культуры нервной ткани было исследовано влияние тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> на рост нейритов сенсорных ганглиев в концентрации  $10^{-10}$  М. При введении в питательную среду тетрапептида наблюдалась достоверная стимуляция роста нейритов сенсорных ганглиев, в среднем на 38% ( $n = 32$ ;  $p < 0,05$ ) по отношению к контрольным значениям ( $n = 25$ ) (рис. 2В). Полученные экспериментальные данные дают основание полагать, что связывание исследуемого тетрапептида со специфическими молекулярными мишенями запускает пока неизвестный сигнальный каскад, который регулирует рост нейритов.

Таким образом, с помощью методов АСМ и органотипической культуры ткани было исследовано действие тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> в субнанолярной концентрации на первичные сенсорные нейроны куриных эмбрионов. Было установлено, что под действием изучаемого агента при АСМ-индентировании поверхности

клеток нейроны демонстрируют тенденцию к уменьшению своей жесткости по сравнению с контролем, а метод органотипической культуры выявил выраженные нейрит-стимулирующие свойства молекулы Ac-RERR-NH<sub>2</sub>. Обнаруженный эффект действия тетрапептида Ac-RERR-NH<sub>2</sub> на механические свойства первичных сенсорных нейронов отличается от эффектов действия других веществ, способных снижать возбудимость ноцицептивных нейронов — ЭУ и коеновой кислоты (Халисов и др. 2017; Plakhova et al. 2020; Rogachevskii et al. 2022). ЭУ вызывает увеличение жесткости клеток, а коеновая кислота на нее не влияет. Вместе с тем первая субстанция активирует внутриклеточные процессы, которые приводят к снижению плотности каналов Na<sub>v</sub>1.8 в плазматической мембране сенсорного нейрона, делая мембрану более однородной, в то время как вторая субстанция не оказывает подобного воздействия на клетку. Вероятно, именно этим можно объяснить наблюдаемое изменение механических свойств сенсорных нейронов под действием ЭУ (Plakhova et al. 2020). Для идентификации запускаемого тетрапептидом Ac-RERR-NH<sub>2</sub> сигнального каскада, который вызывает уменьшение жесткости сенсорных нейронов и стимуляцию роста нейритов, необходимы дополнительные исследования.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

### Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

### Соответствие принципам этики

Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами Российской Федерации, и рекомендациям биоэтического комитета Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

### Ethics Approval

All procedures performed in the study complied with the ethical standards approved by the legal acts of the Russian Federation and the recommen-

dations of the Bioethical Committee of the Pavlov Institute of Physiology RAS.

### Вклад авторов

- а. Халисов Максим Миндигалеевич — планирование и проведение экспериментов, обработка результатов, подготовка рукописи;
- б. Пеннийянен Валентина Альбертовна — идея работы, планирование и проведение экспериментов, подготовка рукописи;
- с. Анкудинов Александр Витальевич — обработка результатов, подготовка рукописи;
- д. Подзорова Светлана Александровна — проведение экспериментов, обработка результатов, подготовка рукописи;

е. Крылов Борис Владимирович — постановка задачи, редактирование рукописи.

### Author Contributions

- a. Maksim M. Khalisov—planning and conducting the experiment, processing experimental data, manuscript preparation;
- b. Valentina A. Penniyaynen—study idea, planning and conducting the experiment, manuscript preparation;
- c. Alexander V. Ankudinov—processing experimental data, manuscript preparation;
- d. Svetlana A. Podzorova—processing experimental data, manuscript preparation;
- e. Boris V. Krylov—formulation of the problem, manuscript editing.

### Литература

- Анкудинов, А. В., Халисов, М. М. (2020) Измерения контактной жесткости в атомно-силовом микроскопе. *Журнал технической физики*, т. 90, № 11, с. 1951–1957. <https://doi.org/10.21883/JTF.2020.11.49989.117-20>
- Пеннийянен, В. А., Халисов, М. М., Подзорова, С. А. и др. (2020) Возможные антииоцицептивные механизмы, запускаемые наномолярными концентрациями уабаина в первичных сенсорных нейронах. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 106, № 10, с. 1289–1301. <https://doi.org/10.31857/S0869813920100088>
- Рогачевский, И. В., Калинина, А. Д., Пеннийянен, В. А. и др. (2021) Возможный механизм модуляции короткими пептидами медленных натриевых каналов мембраны сенсорного нейрона. *Биофизика*, т. 66, № 4, С. 684–695. <https://doi.org/10.31857/S0006302921040074>
- Тимощук, К. И., Халисов, М. М., Пеннийянен, В. А. и др. (2019) Исследование механических характеристик нативных фибробластов с помощью атомно-силового микроскопа. *Письма в журнал технической физики*, т. 45, № 18, с. 44–47. <https://doi.org/10.21883/PJTF.2019.18.48238.17878>
- Халисов, М. М., Пеннийянен, В. А., Есикова, Н. А. и др. (2017) Особенности рецептор- и трансдуктор-опосредованной активации внутриклеточных сигнальных каскадов в сенсорном нейроне, выявленные методом атомно-силовой микроскопии. *Письма в журнал технической физики*, т. 43, № 1, с. 89–94. <https://doi.org/10.21883/PJTF.2017.01.44094.16394>
- Халисов, М. М., Пеннийянен, В. А., Подзорова, С. А. и др. (2021) О молекулярной природе различий в реакции сенсорных нейронов и фибробластов на уабаин. *Журнал технической физики*, т. 91, № 5, с. 882–888. <https://doi.org/10.21883/JTF.2021.05.50704.272-20>
- Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, Ch. (1986) Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Haase, K, Pelling, A.E. (2015) Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 12, no. 104, article 20140970. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0970>
- Hu, J., Chen, S., Huang, D. et al. (2020) Global mapping of live cell mechanical features using PeakForce QNM AFM. *Biophysics Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 9–18. <https://doi.org/10.1007/s41048-019-00103-9>
- Hutter, J. L., Bechhoefer, J. (1993) Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, vol. 64, no. 7, pp. 1868–1873. <https://doi.org/10.1063/1.1143970>
- Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., et al. (2007) Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, vol. 38, no. 8, pp. 824–833. <https://doi.org/doi:10.1016/j.micron.2007.06.011>
- Nečas, D., Klapetek, P. (2012) Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. *Central European Journal of Physics*, vol. 10, no. 1, pp. 181–188. <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2>
- Pittenger, B., Slade, A. (2013) Performing quantitative nanomechanical AFM measurements on live cells. *Microscopy Today*, vol. 21, no. 6, pp. 12–17. <https://doi.org/10.1017/S1551929513001077>
- Pittenger, B., Erina, N., Su, C. (2014) Mechanical property mapping at the nanoscale using PeakForce QNM scanning probe technique. In: A. Tiwari (ed.). *Nanomechanical analysis of high performance materials*. Dordrecht: Springer Publ., pp. 31–51. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6919-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6919-9_2)

- Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A., Yachnev, I. L. et al. (2019) Src kinase controls signaling pathways in sensory neuron triggered by low-power infrared radiation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 97, no. 5, pp. 400–406. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0602>
- Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A., Rogachevskii, I. V. et al. (2020) Dual mechanism of modulation of  $\text{Na}_v1.8$  sodium channels by ouabain. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 98, no. 11, pp. 785–802. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0197>
- Rogachevskii, I. V., Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A. et al. (2022) New approaches to the design of analgesic medicinal substances. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 100, no. 1, pp. 43–52. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2021-0286>
- Sneddon, I. N. (1965) The relation between load and penetration in the axi-symmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, vol. 3, no. 1, pp. 47–57. [https://doi.org/10.1016/0020-7225\(65\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0020-7225(65)90019-4)

## References

- Ankudinov, A. V., Khalisov, M. M. (2020) Izmereniya kontaktnoj zhestkosti v atomno-silovom mikroskope [Measurements of contact stiffness in an atomic force microscope]. *Zhurnal tekhnicheskoy fiziki*, vol. 90, no. 11, pp. 1951–1957. <https://doi.org/10.21883/JTF.2020.11.49989.117-20> (In Russian)
- Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, Ch. (1986) Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930> (In English)
- Haase, K, Pelling, A.E. (2015) Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 12, no. 104, article 20140970. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0970> (In English)
- Hu, J., Chen, S., Huang, D. et al. (2020) Global mapping of live cell mechanical features using PeakForce QNM AFM. *Biophysics Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 9–18. <https://doi.org/10.1007/s41048-019-00103-9> (In English)
- Hutter, J. L., Bechhoefer, J. (1993) Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, vol. 64, no. 7, pp. 1868–1873. <https://doi.org/10.1063/1.1143970> (In English)
- Khalisov, M. M., Penniyaynen, V. A., Esikova, N. A. et al. (2017) Osobennosti retseptor- i transduktor-oposredovannoj aktivatsii vnutrikletochnykh signal'nykh kaskadov v sensornom nejrone, vyyavlyennye metodom atomno-silovoj mikroskopii [Features of receptor and transducer-mediated activation of intracellular signaling cascades in the sensory neuron detected by atomic force microscopy]. *Pis'ma v zhurnal tekhnicheskoy fiziki*, vol. 43, no. 1, pp. 89–94. <https://doi.org/10.21883/PJTF.2017.01.44094.16394> (In Russian)
- Khalisov, M. M., Penniyaynen, V. A., Podzorova, S. A. et al. (2021) O molekulyarnoj prirode razlichij v reaktsii sensornykh nejronov i fibroblastov na uabain [On the molecular nature of differences in the response of sensory neurons and fibroblasts to uabain]. *Zhurnal tekhnicheskoy fiziki*, vol. 91, no. 5, pp. 882–888. <https://doi.org/10.21883/JTF.2021.05.50704.272-20> (In Russian)
- Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., et al. (2007) Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, vol. 38, no. 8, pp. 824–833. <https://doi.org/doi:10.1016/j.micron.2007.06.011> (In English)
- Nečas, D., Klapeček, P. (2012) Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. *Central European Journal of Physics*, vol. 10, no. 1, pp. 181–188. <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2> (In English)
- Penniyaynen, V. A., Khalisov, M. M., Podzorova, S. A. et al. (2020) Vozmozhnye antinotsitseptivnye mekhanizmy, zapuskaemye nanomolyarnymi konsentratsiyami uabaina v pervichnykh sensornykh nejronakh [Possible antinociceptive mechanisms triggered by nanomolar concentrations of uabain in primary sensory neurons]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 106, no. 10, pp. 1289–1301. <https://doi.org/10.31857/S0869813920100088> (In Russian)
- Pittenger, B., Slade, A. (2013) Performing quantitative nanomechanical AFM measurements on live cells. *Microscopy Today*, vol. 21, no. 6, pp. 12–17. <https://doi.org/10.1017/S1551929513001077> (In English)
- Pittenger, B., Erina, N., Su, C. (2014) Mechanical property mapping at the nanoscale using PeakForce QNM scanning probe technique. In: A. Tiwari (ed.). *Nanomechanical analysis of high performance materials*. Dordrecht: Springer Publ., pp. 31–51. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6919-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6919-9_2) (In English)
- Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A., Yachnev, I. L. et al. (2019). Src kinase controls signaling pathways in sensory neuron triggered by low-power infrared radiation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 97, no. 5, pp. 400–406. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0602> (In English)
- Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A., Rogachevskii, I. V. et al. (2020) Dual mechanism of modulation of  $\text{Na}_v1.8$  sodium channels by ouabain. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 98, no. 11, pp. 785–802. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0197> (In English)
- Rogachevsky, I. V., Kalinina, A. D., Penniyaynen, V. A. et al. (2021) Vozmozhnyj mekhanizm modulyatsii korotkimi peptidami medlennykh natrievykh kanalov membrany sensornogo nejrona [A possible mechanism of modulation of slow sodium channels in the sensory neuron membrane by short peptides]. *Biofizika — Biophysics*, vol. 66, no. 4, pp. 684–695. <https://doi.org/10.31857/S0006302921040074> (In Russian)

- Rogachevskii, I. V., Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A. et al. (2022) New approaches to the design of analgesic medicinal substances. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 100, no. 1, pp. 43–52. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2021-0286> (In English)
- Timoshchuk, K. I., Khalisov, M. M., Penniyaynen, V. A. et al. (2019) Issledovanie mekhanicheskikh kharakteristik nativnykh fibroblastov s pomoshch'yu atomno-silovogo mikroskopa [Investigation of mechanical characteristics of native fibroblasts using an atomic force microscope]. *Pis'ma v zhurnal tekhnicheskoy fiziki*, vol. 45, no. 18, pp. 44–47. <https://doi.org/10.21883/PJTF.2019.18.48238.17878> (In Russian)
- Sneddon, I. N. (1965) The relation between load and penetration in the axi-symmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, vol. 3, no. 1, pp. 47–57. [https://doi.org/10.1016/0020-7225\(65\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0020-7225(65)90019-4) (In English)