



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 57.085.23 + 577.29 + 576.32/.36

EDN MJISJH

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-1-50-59>

## Применение метода атомно-силовой микроскопии для исследования ответов механочувствительных каналов Piezo1 фибробластов сердца

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

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

### Сведения об авторах

Максим Миндигаевич Халисов, SPIN-код: 5815-3655, Scopus AuthorID: 56771519000, ResearcherID: G-2826-2015, ORCID: 0000-0002-5171-4690, e-mail: [khalisovmm@infran.ru](mailto:khalisovmm@infran.ru)

Анна Владиславовна Беринцева, SPIN-код: 5790-1836, ResearcherID: JKR-7499-2023, ORCID: 0009-0003-3686-9699, e-mail: [berintsevaav@infran.ru](mailto:berintsevaav@infran.ru)

Светлана Александровна Подзорова, SPIN-код: 3974-3430, Scopus AuthorID: 6602224180, ResearcherID: ABB-8808-2020, e-mail: [podzorova@infran.ru](mailto:podzorova@infran.ru)

Борис Владимирович Крылов, SPIN-код: 3946-6408, Scopus AuthorID: 7004655760, ResearcherID: ABD-5044-2020, ORCID: 0000-0001-5258-1597, e-mail: [krylov@infran.ru](mailto:krylov@infran.ru)

Валентина Альбертовна Пеннийнен, SPIN-код: 6610-3718, Scopus AuthorID: 6603501257, ResearcherID: Q-3979-2016, ORCID: 0000-0003-3936-8681, e-mail: [penniyaynenv@infran.ru](mailto:penniyaynenv@infran.ru)

**Для цитирования:** Халисов, М. М., Беринцева, А. В., Подзорова, С. А., Крылов, Б. В., Пеннийнен, В. А. (2024) Применение метода атомно-силовой микроскопии для исследования ответов механочувствительных каналов Piezo1 фибробластов сердца. *Интегративная физиология*, т. 5, № 1, с. 50–59. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-1-50-59> EDN MJISJH

**Получена** 15 декабря 2023; прошла рецензирование 22 января 2024; принята 26 января 2024.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030).

**Права:** © М. М. Халисов, А. В. Беринцева, С. А. Подзорова, Б. В. Крылов, В. А. Пеннийнен (2024). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Установлено, что Jedi2, активатор механочувствительных каналов Piezo1, влияет на рост эксплантатов сердца эмбриональной ткани. Зависимость изменения индекса площади от концентрации действующего агента описывается уравнением Хилла ( $K_d \approx 20$  мкМ, коэффициент Хилла — 1,6). Концентрация Jedi2, равная 10 мкМ, была выбрана для химической активации механочувствительных каналов Piezo1 в исследовании с помощью метода атомно-силовой микроскопии, поскольку она не влияла на рост эксплантатов сердца. На основании полученной зависимости стимул–ответ для механического воздействия со стороны зонда атомно-силового микроскопа при исследовании влияния Jedi2 на фибробласты была выбрана сила 3 нН, не приводящая к изменению жесткости клеток в ответ на механическую стимуляцию. В отличие от малых сил (1–5 нН), при больших силах стимуляции (6–7 нН) наблюдалось резкое увеличение модуля Юнга фибробластов. Исследование с помощью атомно-силовой микроскопии показало, что Jedi2 вызывает увеличение жесткости фибробластов — модуль Юнга клеток после воздействия исследуемого вещества ( $68 \pm 7$  кПа,  $n = 33$ ) растет по сравнению с контролем ( $37 \pm 4$  кПа,  $n = 29$ ). Эффект воздействия Jedi2 усиливается со временем: в рамках рассмотренного периода максимальное влияние на механические характеристики фибробластов достигается спустя более двух часов воздействия вещества. Мы предполагаем, что наблюдаемый при воздействии Jedi2 и силе стимуляции 3 нН рост жесткости фибробластов связан с вызванным модуляцией работы каналов Piezo1 сдвигом порога запуска ответа клеток в сторону меньших сил.

**Ключевые слова:** фибробласты, органотипическая культура ткани, каналы Piezo1, Jedi2, атомно-силовая микроскопия

# Atomic force microscopy as a method to study the responses of mechanosensitive Piezo1 channels of cardiac fibroblasts

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

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

## Authors

Maksim M. Khalisov, SPIN: [5815-3655](#), Scopus AuthorID: [56771519000](#), ResearcherID: [G-2826-2015](#), ORCID: [0000-0002-5171-4690](#), e-mail: [khalisovmm@infran.ru](mailto:khalisovmm@infran.ru)

Anna V. Berintseva, SPIN: [5790-1836](#), ResearcherID: [JKR-7499-2023](#), ORCID: [0009-0003-3686-9699](#), e-mail: [berintsevaav@infran.ru](mailto:berintsevaav@infran.ru)

Svetlana A. Podzorova, SPIN: [3974-3430](#), Scopus AuthorID: [6602224180](#), ResearcherID: [ABB-8808-2020](#), e-mail: [podzorova@infran.ru](mailto:podzorova@infran.ru)

Boris V. Krylov, SPIN: [3946-6408](#), Scopus AuthorID: [7004655760](#), ResearcherID: [ABD-5044-2020](#), ORCID: [0000-0001-5258-1597](#), e-mail: [krylov@infran.ru](mailto:krylov@infran.ru)

Valentina A. Penniyaynen, SPIN: [6610-3718](#), Scopus AuthorID: [6603501257](#), ResearcherID: [Q-3979-2016](#), ORCID: [0000-0003-3936-8681](#), e-mail: [penniyaynenv@infran.ru](mailto:penniyaynenv@infran.ru)

**For citation:** Khalisov, M. M., Berintseva, A. V., Podzorova, S. A., Krylov, B. V., Penniyaynen, V. A. (2024) Atomic force microscopy as a method to study the responses of mechanosensitive Piezo1 channels of cardiac fibroblasts. *Integrative Physiology*, vol. 5, no. 1, pp. 50–59. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-1-50-59> EDN [MJISJH](#)

**Received** 15 December 2023; reviewed 22 January 2024; accepted 26 January 2024.

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

**Copyright:** © M. M. Khalisov, A. V. Berintseva, S. A. Podzorova, B. V. Krylov, V. A. Penniyaynen (2024). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](#).

**Abstract.** Jedi2, an activator of mechanosensitive Piezo1 channels, was found to affect the growth of embryonic heart tissue explants. The dependence of the change in the area index on the Jedi2 concentration is described by the Hill equation ( $K_d \approx 20 \mu\text{M}$ , Hill coefficient — 1.6). A concentration of  $10 \mu\text{M}$  was chosen to chemically activate mechanosensitive Piezo1 channels in the atomic force microscopy (AFM) study since it did not impact the growth of heart explants. Based on the obtained stimulus–response relationship, a force of 3 nN was chosen for mechanical action from the AFM probe when studying the effect of Jedi2 on fibroblasts, which does not lead to a change in cell stiffness in response to mechanical stimulation. In contrast to low forces (1–5 nN), high stimulation forces (6–7 nN) were associated with a sharp increase in the Young’s modulus of fibroblasts. An AFM study showed that Jedi2 augments fibroblast stiffness: the Young’s modulus of cells after exposure to the test substance ( $68 \pm 7 \text{ kPa}$ ,  $n = 33$ ) increases compared to the control ( $37 \pm 4 \text{ kPa}$ ,  $n = 29$ ). The effect of Jedi2 becomes stronger with time, with the maximum effect on fibroblast mechanical characteristics achieved after more than two hours of exposure to the substance. We assume that the increase in fibroblast stiffness observed under the influence of Jedi2 and at a stimulation force of 3 nN is associated with a shift in the threshold for triggering the cell response towards lower forces caused by the modulation of the Piezo1 channels.

**Keywords:** fibroblasts, organotypic tissue culture method, Piezo1 channels, Jedi2, atomic force microscopy

## Введение

Механотрансдукция представляет собой процесс, с помощью которого клетки преобразуют механические стимулы в биохимические сигналы. Такие сигналы могут привести к изменениям экспрессии генов, синтеза белков и, как следствие, фенотипа клетки (Goldmann 2014). У млекопитающих эмбриональное развитие, рост нейритов, гравитация, осязание, боль, проприоцепция, слух, регулировка тонуса сосудов и кровотока, рост и повреждение легких, гомеостаз костей и мышц, а также метастазирование

регулируются механотрансдукцией (Chalfie 2009; Coste et al. 2010; Franze 2013). Нарушение процессов механотрансдукции может привести к различным патологиям, таким как глухота (Vollrath et al. 2007), нейрональные и сердечно-сосудистые заболевания (Lyon et al. 2015; Ostrow, Sachs 2005), фиброз (Duscher et al. 2014), метастазирование рака (Broders-Bondon et al. 2018).

Механотрансдукция в клетках осуществляется за счет специальных белков (механотрансдукторов), которые представляют собой встроенные в плазматическую мембрану ионные каналы. Механотрансдукторы могут быстро

реагировать на изменения механической силы, приводя к возбуждению клеточных мембран и запуску внутриклеточных сигнальных путей (Chalfie 2009; Ranade et al. 2015; Wang et al. 2022). Ключевую роль в механотрансдукции клеток млекопитающих играют каналы семейства Piezo, состоящего всего из двух белков — Piezo1 и Piezo2 (Coste et al. 2010; 2012). Эти катионные каналы преимущественно проницаемы для ионов  $Ca^{2+}$ , приток которых в клетку лежит в основе значительной части процессов внутриклеточной и мембранной сигнализации (Coste et al. 2010; Vasileva, Chubinskiy-Nadezhdin 2023).

Piezo1 экспрессируется в электронеовозбудимых типах клеток и активируется различными формами механической стимуляции как внешней природы (растяжение, напряжение сдвига и прогиб субстрата), так и эндогенно возникающим локальным натяжением мембраны (Bavi et al. 2019; Coste et al. 2010; Jiang et al. 2021). Напротив, Piezo2 преимущественно экспрессируется в сенсорных нейронах, а также соматосенсорных ганглиях, наружных волосковых клетках, энтерохромаффинных клетках кишечника и клетках Меркеля (Anderson et al. 2017; Jiang et al. 2021; Qin et al. 2021). Piezo2 эффективно активируется при нажатии, но относительно слабо реагирует на растяжение (Jiang et al. 2021; Taberner et al. 2019). Кроме того, Piezo1 может активироваться синтетическими химическими веществами: Yoda1 (Syeda et al. 2015), а также Jedi1 и Jedi2 (Wang et al. 2018). Как Yoda1, так и Jedi1/2 могут связываться с каналом Piezo1, что приводит к повышению его механочувствительности и замедленной инактивации с помощью независимых механизмов действия (Botello-Smith et al. 2019; Syeda et al. 2015; Wang et al. 2018).

Данная работа посвящена исследованию механочувствительных каналов Piezo1. Несмотря на значительные успехи в исследовании белков Piezo1, достигнутые с момента их открытия в 2010 году (Coste et al. 2010), все еще остается немало нерешенных вопросов, связанных с функционированием этих каналов. В частности, в полной мере неизвестно, какие сигнальные пути могут запускаться в результате активации каналов Piezo1 и какие изменения свойств клеток при этом наблюдаются. Одним из неизученных является вопрос о влиянии активности канала Piezo1 на механические характеристики клеток. Эффективным инструментом для изучения механических свойств клеток является метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Мы применили АСМ для ис-

следования роли каналов Piezo1 в регуляции механических свойств клеток.

Важно отметить, что силовое взаимодействие зонда с клеткой в АСМ не только позволяет изучать механические свойства последней, но и само может явиться стимулом, запускающим процесс механотрансдукции. В данной работе была предпринята попытка выяснить, влияет ли механическая стимуляция клеток АСМ-зондом на их механические свойства. Для этого был проведен ряд экспериментов с варьируемой величиной силы взаимодействия зонд–клетка.

В качестве модели для АСМ-исследования были выбраны фибробласты сердца. Ранее было показано, что в фибробластах сердца (человека, мыши) экспрессируются каналы Piezo1 (Blythe et al. 2019). Эти клетки хорошо подходят для исследования с помощью АСМ, поскольку имеют удобную для АСМ-сканирования форму, а также, не повреждаясь, выдерживают механическое воздействие со стороны АСМ-зонда.

Метод органотипической культуры ткани широко используется в ходе фундаментальных и прикладных исследований в различных областях физиологии, фармакологии и практической медицины. Он представляет собой наиболее подходящую систему для изучения различных воздействий, новых фармакологических соединений, проведения тестов на токсичность (Habeler et al. 2009; Sundstrom et al. 2005; Watson et al. 2017). Метод органотипической культуры ткани был применен для изучения действия вещества Jedi2, специфического химического активатора механочувствительных каналов Piezo1, на рост эксплантатов сердца.

В данной работе получена зависимость стимул–ответ для фибробластов сердца, где стимул — сила механического воздействия со стороны зонда атомно-силового микроскопа на клетку, а ответ — ее механические свойства. Также с помощью метода АСМ показано влияние Jedi2, активирующего механочувствительные каналы Piezo1, на механические характеристики фибробластов сердца.

## Методы исследования

### Органотипическая культура ткани

Метод органотипической культуры ткани был использован для исследования влияния Jedi2, активатора каналов Piezo1, на рост эксплантатов сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов *White Leghorn* (Lopatina et al. 2015; Penniyaunen et al. 2015). Вкратце, эксплантаты сердца культивировали в течение трех суток

в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Контрольными считали эксплантаты, культивируемые только в питательной среде. Для количественной оценки роста эксплантатов применяли морфометрический метод. Рассчитывали индекс площади (ИП) как отношение площади зоны роста эксплантата к исходной центральной площади. Контрольное значение ИП принимали за 100% (Lopatina et al. 2015; Penniyaynen et al. 2015). Для прижизненной визуализации эксплантатов использовали микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). 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.

### *Атомно-силовая микроскопия*

Исследование механических характеристик фибробластов сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов осуществляли с помощью установки, состоящей из атомно-силового микроскопа BioScope Catalyst (Bruker, США) и инвертированного оптического микроскопа Axio Observer Z1. Оптическая визуализация позволяла находить клетки для АСМ-сканирования, точно позиционировать зонд перед его подводом к поверхности подложки и контролировать состояние фибробластов во время их АСМ-исследования. Эксперименты с использованием атомно-силового микроскопа проводили в 40 мм чашках Петри (Медполимер, Россия) с питательной средой при температуре ≈ 37°C. Термостатирование клеток обеспечивали нагревательным элементом под управлением термоконтроллера 335-й модели (Lake Shore, США). Дно чашек Петри предварительно покрывали коллагеном для лучшей адгезии фибробластов с подложкой.

В экспериментах по изучению влияния механической стимуляции зондом атомно-силового микроскопа на механические свойства клеток исследовали фибробласты, культивируемые только в питательной среде. В другой серии экспериментов к фибробластам непосредственно перед исследованием с помощью атомно-силового микроскопа добавляли Jedi2 в концентрации 10 мкМ. В дальнейшем механические свойства этих клеток сравнивали со свойствами контрольных фибробластов, культивируемых только в питательной среде.

Для изучения механических свойств фибробластов применяли кантилеверы Bruker SNL-C с коэффициентом жесткости, согласно паспорту, 0,24 Н/м. Более точное значение коэффици-

ента жесткости определяли для каждого кантилевера перед исследованием клеток с помощью метода, основанного на анализе тепловых шумов (Hutter, Bechhoefer 1993). АСМ-сканирование фибробластов осуществляли в режиме PeakForce QNM, позволяющем одновременно визуализировать топографию исследуемой поверхности (рис. 1А) и картировать локальные механические характеристики, такие как величина деформации или (кажущийся) модуль Юнга. Возможность картирования механических характеристик обусловлена анализом поточечно регистрируемых силовых кривых АСМ — зависимостей силы взаимодействия между зондом и клеткой от расстояния между ними. В данной работе для характеристики механических свойств фибробластов использовали значения модуля Юнга ( $E$ ). Их определяли по модели Снеддона, принимающей форму острия зонда конической (Sneddon 1965), на основании следующего выражения:

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \delta^2,$$

где  $F$  — сила взаимодействия между зондом и исследуемой поверхностью,  $\nu$  — коэффициент Пуассона (для клеток равен 0,5),  $\alpha$  — половинный угол раствора конуса (для используемых зондов приблизительно равен 18°),  $\delta$  — величина деформации.

АСМ-визуализацию осуществляли со следующими параметрами сканирования: АСМ-кадр 256 × 256 или 128 × 128 точек, частота строчной развертки — 0,15 Гц, амплитуда и частота вертикальных колебаний зонда — 1 мкм и 0,25 кГц соответственно. В экспериментах по изучению отклика клеток на механическую стимуляцию значение пиковой силы варьировали в диапазоне от 1 до 7 нН с шагом в 1 нН. При исследовании действия Jedi2 все фибробласты сканировали с одинаковой пиковой силой — 3 нН.

Поскольку фибробласты склонны к расплыванию по подложке, они могут испытывать значительную деформацию относительно толщины клетки под действием АСМ-зонда. Чтобы избежать возможного влияния близости твердой подложки на результаты измерений, был применен подход, предложенный в работе (Gavara, Chadwick 2012), который дает возможность учесть конечную толщину клеток при определении их модуля Юнга (рис. 1В).

По АСМ-картам скорректированного модуля Юнга для каждого фибробласта определяли среднее значение данного параметра (рис. 1С). Из анализа исключали граничные области, где острие зонда могло контактировать с клеткой

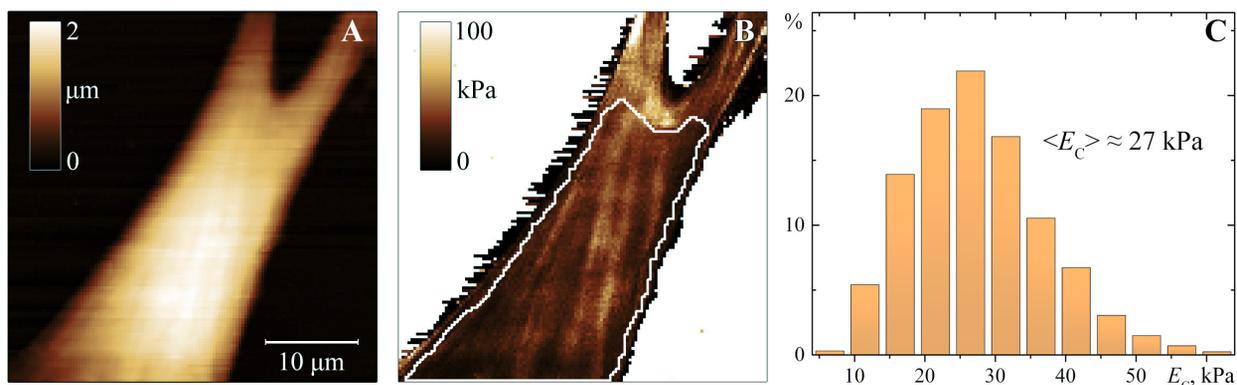


Рис. 1. АСМ-изображения контрольного фибробласта: (А) топография поверхности; (В) карта модуля Юнга с учетом коррекции (Gavara, Chadwick 2012), контуром белого цвета обозначена область анализа; (С) гистограмма распределения модуля Юнга в рамках выделенной области анализа на (В), показано среднее значение модуля Юнга  $\langle E_C \rangle$

Fig. 1. AFM images of a control fibroblast: (A) surface topography; (B) corrected Young's modulus map (Gavara, Chadwick 2012), a white contour indicates the area of analysis; (C) histogram of the Young's modulus distribution within the selected area of analysis in (B), the Young's modulus average value is shown as  $\langle E_C \rangle$

боковой гранью, и, кроме того, ошибка пиковой силы могла достигать максимальных по модулю значений. Также исключали такие локальные особенности, как места загрязнения мембраны фибробластов фрагментами клеток и резко отличающиеся по жесткости фибриллы цитоскелета.

Для изучения влияния Jedi2, активатора механочувствительных каналов Piezo1, на механические свойства фибробластов осуществляли сравнение средних значений модуля Юнга клеток, подвергшихся воздействию исследуемого вещества, и контрольных фибробластов. Кроме того, была предпринята попытка проанализировать динамику клеточного ответа на химическую активацию механочувствительных каналов Piezo1. Для этого клетки, культуральная среда которых содержала Jedi2, были разделены на три группы в зависимости от времени воздействия исследуемой субстанции: I — 0–1 ч, II — 1–2 ч, III — 2–3 ч. Средние значения модуля Юнга для каждой группы сравнивали с контрольным.

Для обработки АСМ-данных использовали программу Gwyddion 2.58.

### Статистическая обработка

Все данные представлены в виде среднего значения, плюс-минус стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с помощью пакета STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием  $t$ -критерия Стьюдента (метод органотипической культуры ткани) и  $U$ -критерия Манна — Уитни (АСМ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты изучения механических характеристик фибробластов при варьировании силы воздействия АСМ-зонда на клетку представлены на рисунке 2. Наблюдаемое резкое увеличение средних значений модуля Юнга при больших силах надавливания (6–7 нН) может быть связано с реакцией фибробластов на механический стимул со стороны зонда атомно-силового микроскопа, опосредованной активацией механочувствительных каналов Piezo1. При меньших силах механического воздействия на клетку (1–5 нН) такой реакции не отмечалось — значение  $E_C$  менялось относительно слабо, что, вероятно, свидетельствует о недостаточности стимула для запуска реакции фибробласта на механическое воздействие. В дальнейшем для исследования влияния активатора Jedi2 механочувствительных каналов Piezo1 на механические свойства фибробластов из диапазона сил, не вызывающих изменения механических свойств, было выбрано среднее значение силы — 3 нН.

Для оценки влияния специфического активатора Jedi2, действующего на каналы Piezo1, был применен высокочувствительный метод органотипической культуры ткани. Количественную оценку роста эксплантатов сердца проводили путем расчета изменения их индекса площади (ИП) в контрольных условиях и после воздействия Jedi2 в следующих концентрациях: 1 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ и 0,1 мМ (рис. 3). Jedi2 в концентрациях 50 мкМ ( $n = 28$ ) и 0,1 мМ ( $n = 25$ ) практически полностью блокировал рост

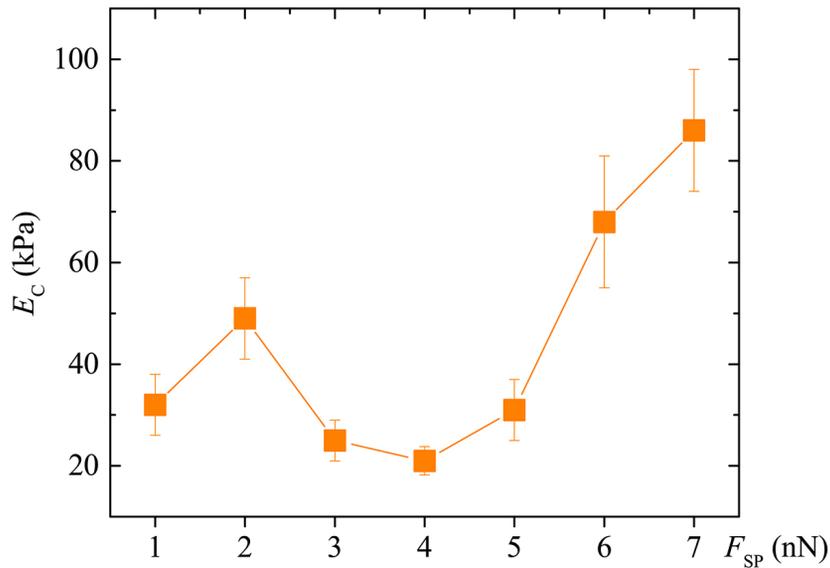


Рис. 2. Зависимость модуля Юнга с учетом коррекции,  $E_C$  (Gavara, Chadwick 2012) от заданной величины пиковой силы  $F_{sp}$ , число клеток  $n = 13, 22, 15, 12, 15, 23, 37$  для  $F_{sp} = 1...7$  нН соответственно

Fig. 2. Dependence of the Young's modulus taking into account the correction,  $E_C$  (Gavara, Chadwick 2012) on a value of the peak force setpoint  $F_{sp}$ , the number of cells  $n = 13, 22, 15, 12, 15, 23, 37$  for  $F_{sp} = 1...7$  nN, respectively

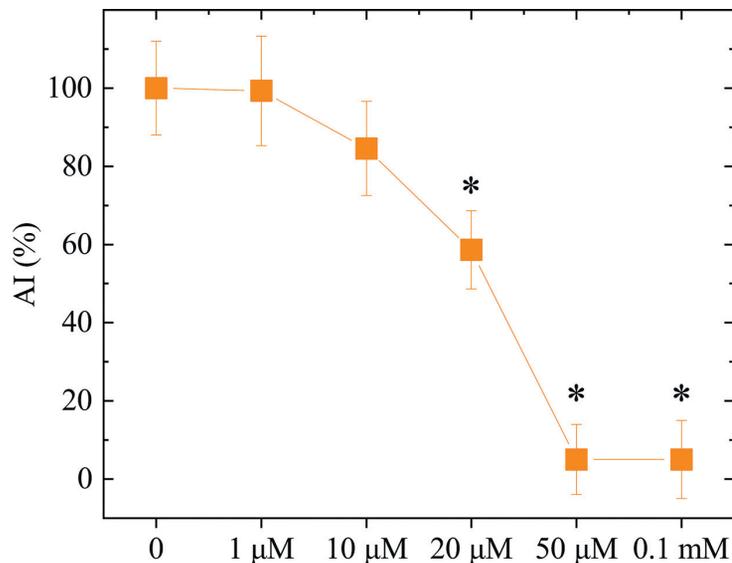


Рис. 3. Влияние Jedi2 на рост эксплантатов сердца. Нулевая концентрация соответствует контролю. Индекс площади в контроле принят за 100%; ось ординат — индекс площади (AI); \* — статистически значимое различие,  $p < 0,05$

Fig. 3. Effect of Jedi2 on the growth of heart explants. Zero concentration corresponds to the control. The area index in the control is assumed to be 100%; the ordinate axis is the area index (AI); \* — statistically significant difference,  $p < 0,05$

эксплантатов сердца. При введении в питательную среду исследуемого вещества в концентрации 20 мкМ наблюдали статистически значимое ингибирование роста эксплантатов. ИП экспериментальных эксплантатов был на  $41 \pm 5\%$  ( $n = 27, p < 0,05$ ) ниже контрольного значения ( $n = 22$ ). В более низких концентрациях (10 мкМ,

$n = 25$  и 1 мкМ,  $n = 29$ ) Jedi2 практически не влиял на рост эксплантатов исследуемой ткани и ИП практически не отличался от контрольного значения ( $n = 25$ ). Kd составил  $\approx 20$  мкМ, а коэффициент Хилла — 1,6. Ингибирующий эффект Jedi2, по-видимому, связан с  $Ca^{2+}$ -зависимой сигнализацией, опосредованной Piezo1. При

исследовании с помощью АСМ была выбрана концентрация 10 мкМ, которая практически не влияла на рост эксплантатов сердца.

АСМ — метод исследования поверхности, принцип действия которого основан на силовом взаимодействии между объектом и закрепленным на конце упругой консоли острием (зондом). АСМ, в частности, применяется для изучения механочувствительных каналов Piezo1. С помощью высокоскоростной АСМ были визуализированы отдельные каналы Piezo1, а также было продемонстрировано, что они способны обратимо менять свою изначальную искривленную форму, становясь плоскими, под действием острия зонда (Lin et al. 2019). В работе Думитру с соавторами (Dumitru et al. 2021) АСМ была задействована в исследовании распределения субмикронных кластеров каналов Piezo1 в плазматической мембране эритроцитов. Был отмечен рост присутствия этих каналов в области с более высоким натяжением мембраны при химической активации каналов Piezo1 посредством Yoda1. Также на основании полученных данных авторы выдвинули гипотезу о том, что каналы взаимодействуют с цитоскелетом, вероятно, способствуя снижению диффузии и стабилизации формирования кластеров Piezo1.

Одним из направлений применения АСМ является изучение механических характеристик индивидуальных клеток (Haase, Pelling 2015). Получать информацию о механических свойствах клеток в АСМ можно за счет индентирования, продавливания поверхности клетки зондом с заданной силой и одновременной регистрацией величины деформации; см. подробнее в работе Гавара (Gavara 2016). Механические характеристики клеток могут служить индикатором патологических состояний (Lekka 2016) или реакции клеток на внешние воздействия, включая различные химические соединения (Khalisov et al. 2020; Rotsch, Radmacher 2000). В данной работе исследуется влияние специфического активатора Jedi2 механочувствительных каналов Piezo1 на механические свойства фибробластов сердца.

В среднем фибробласты индентировались (продавливались) АСМ-зондом на глубину  $\approx 300$  нм, что составило около 20% толщины клетки. В зону деформации могли попадать разнообразные компоненты клетки: плазматическая мембрана, цитоскелет, ядро, вакуоли, различные органеллы. Считается, что в первую очередь определяемая с помощью АСМ жесткость клеток связана со свойствами актинового цитоскелета (Haase, Pelling 2015; Rotsch, Radmacher 2000). Действительно, на АСМ-картах механических

параметров многих фибробластов были отчетливо различимы нитевидные структуры разной толщины, имеющие повышенную жесткость. У некоторых фибробластов АСМ-изображения позволяли обнаружить ядра, однако области локализации ядер по жесткости выделялись слабо и не исключались из анализа. В редких случаях наблюдались локальные особенности с отклоняющимися механическими характеристиками, обычно круглой формы, которые, например, могли соответствовать вакуолям. Такие фрагменты не учитывали при определении среднего значения модуля Юнга клетки. Всего с помощью АСМ было исследовано 33 фибробласта, подвергшихся воздействию активатора механочувствительных каналов Piezo1, Jedi2, в концентрации 10 мкМ, и 29 контрольных клеток. Анализ данных показал, что применение исследуемого вещества вызывает увеличение жесткости фибробластов: наблюдался рост модуля Юнга по сравнению с контролем (рис. 4А).

При рассмотрении временной зависимости была обнаружена тенденция к увеличению модуля Юнга с повышением продолжительности воздействия Jedi2 (рис. 4В). Следует отметить, что статистически значимое отличие средних значений модуля Юнга от контрольного наблюдалось лишь в III группе клеток.

Таким образом, полученные АСМ-данные свидетельствуют о том, что в результате воздействия Jedi2, активатора механочувствительных каналов Piezo1, фибробласты становятся жестче. В рамках рассмотренного временного периода жесткость клеток постепенно растет, достигая максимума при времени воздействия исследуемой субстанции от двух до трех часов.

Вероятно, зарегистрированное в данной работе увеличение жесткости фибробластов в ответ на действие Jedi2, активатора механочувствительных каналов Piezo1, может быть связано с изменением организации актинового цитоскелета.

Есть данные о том, что существует (биохимическая и функциональная) связь между механочувствительными каналами Piezo1 и актиновым цитоскелетом (Wang et al. 2022). По-видимому, взаимодействие этих каналов с цитоскелетом участвует в регуляции активности Piezo1.

Косвенно на взаимосвязь механочувствительных каналов Piezo1 и актинового цитоскелета фибробластов указывают результаты работы Эмиг с соавторами (Emig et al. 2021). В ней было обнаружено, что сверхэкспрессия каналов Piezo1 в клеточной линии фибробластов предсердия человека приводила к значительному увеличению их жесткости, в то время как гене-

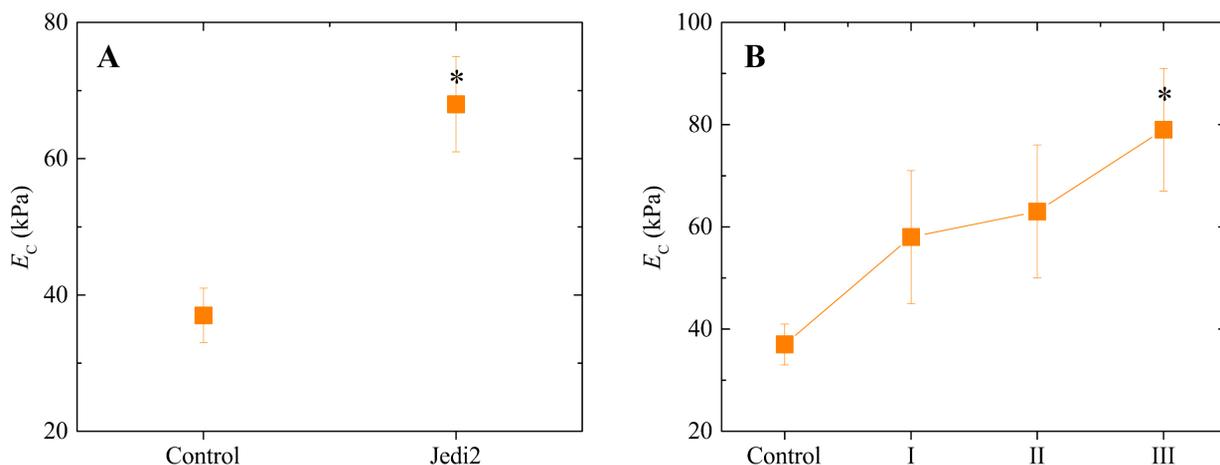


Рис. 4. Результаты определения модуля Юнга с учетом коррекции,  $E_C$ , (Gavara, Chadwick 2012) фибробластов сердца куриных эмбрионов с помощью АСМ (А), зависимость  $E_C$  от времени воздействия исследуемого вещества (В), количество исследованных клеток n: контроль — 29, группы I, II и III — 8, 12 и 13 соответственно; \* —  $p < 0,05$

Fig. 4. Results of the Young's modulus determination taking into account the correction,  $E_C$ , (Gavara, Chadwick 2012) of chicken embryo cardiac fibroblasts using AFM (A),  $E_C$  dependence on the exposure time of the test substance (B), the number of studied cells n: control — 29, groups I, II and III — 8, 12 and 13, correspondingly; \* —  $p < 0.05$

тический нокдаун Piezo1, наоборот, снижал жесткость клеток. Кроме этого, фибробласты со сверхэкспрессией Piezo1 демонстрировали существенно большее содержание F-актина по сравнению с контролем, а клетки с нокдауном — заметно меньшее. Также было показано, что экспрессирующие Piezo1 сверх нормы фибробласты имели более толстые пучки актиновых микрофиламентов, чем контрольные. В другой работе отмечалось, что увеличенный поток кальция, опосредованный Piezo1, может играть важную роль в реорганизации цитоскелета, поскольку он индуцирует образование актиновых стрессовых волокон (Braidotti et al. 2022).

В работе Чубинского-Надеждина и других авторов изучалось влияние вещества Yoda1, еще одного селективного активатора механочувствительных каналов Piezo1, на мышечные фибробласты 3T3B-SV40 (Chubinskiy-Nadezhdin et al. 2019). Было обнаружено, что химическая активация каналов Piezo1 сопровождается усилением полимеризации актиновых микрофиламентов и формированием стресс-фибрилл. Подобная реакция клеток в ответ на химическое воздействие способна отражаться на их механических свойствах, определяемых с помощью АСМ. В работе Халисова с соавторами (Khalisov et al. 2020) было показано, что колхицин провоцирует значительное увеличение внутриклеточного F-актина в фибробластах сердца новорожденных крысят, как следствие, вызывая регистрируемое посредством АСМ повышение жесткости клеток.

Связано ли зарегистрированное в данной работе увеличение жесткости фибробластов на действие Jedi2 с перестройкой актинового цитоскелета фибробластов, дадут ответ будущие 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 (разрешение № 12/09/2021).

### Ethics Approval

All the procedures performed in the study complied with the ethical standards approved by the regulations of the Russian Federation and the recommendations of the Bioethics Committee of the Pavlov Institute of Physiology, RAS (Permit No. 12/09/2021).

## Вклад авторов

а. Халисов Максим Миндигалеевич — планирование и проведение экспериментов, обработка результатов, подготовка рукописи;  
б. Беринцева Анна Владиславовна — обработка результатов, подготовка рукописи;  
в. Подзорова Светлана Александровна — обработка результатов, подготовка рукописи;  
г. Крылов Борис Владимирович — постановка задачи, редактирование рукописи;  
д. Пенниайнен Валентина Альбертовна — идея работы, планирование и проведение экспериментов, подготовка рукописи.

## Author Contributions

a. Maksim M. Khalisov — planning and conducting the experiments, processing the experimental data, drafting the manuscript;  
b. Anna V. Berintseva — processing the experimental data, drafting the manuscript;  
c. Svetlana A. Podzorova — processing the experimental data, drafting the manuscript;  
d. Boris V. Krylov — problem setting, manuscript editing;  
e. Valentina A. Penniyaynen — study concept, planning and conducting the experiments, drafting the manuscript.

## References

- Anderson, E. O., Schneider, E. R., Bagriantsev, S. N. (2017) Piezo2 in cutaneous and proprioceptive mechanotransduction in vertebrates. *Current Topics in Membranes*, vol. 79, pp. 197–217. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2016.11.002> (In English)
- Bavi, N., Richardson, J., Heu, C. et al. (2019) PIEZO1-mediated currents are modulated by substrate mechanics. *ACS Nano*, vol. 13, no. 11, pp. 13545–13559. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b07499> (In English)
- Blythe, N. M., Muraki, K., Ludlow, M. J. et al. (2019) Mechanically activated Piezo1 channels of cardiac fibroblasts stimulate p38 mitogen-activated protein kinase activity and interleukin-6 secretion. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, no. 46, pp. 17395–17408. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009167> (In English)
- Botello-Smith, W. M., Jiang, W., Zhang, H. et al. (2019) A mechanism for the activation of the mechanosensitive Piezo1 channel by the small molecule Yoda1. *Nature Communications*, vol. 10, no. 1, article 4503. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12501-1> (In English)
- Braidotti, N., Chen, S. N., Long, C. S. et al. (2022) Piezo1 channel as a potential target for hindering cardiac fibrotic remodeling. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 15, article 8065. <https://doi.org/10.3390/ijms23158065> (In English)
- Brodgers-Bondon, F., Nguyen Ho-Boulidoires, T. H., Fernandez-Sanchez, M.-E. et al. (2018) Mechanotransduction in tumor progression: The dark side of the force. *Journal of Cell Biology*, vol. 217, no. 5, pp. 1571–1587. <https://doi.org/10.1083/jcb.201701039> (In English)
- Chalfie, M. (2009) Neurosensory mechanotransduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, no. 1, pp. 44–52. <https://doi.org/10.1038/nrm2595> (In English)
- Chubinskiy-Nadezhdin, V. I., Vasileva, V. Y., Vassilieva, I. O. et al. (2019) Agonist-induced Piezo1 activation suppresses migration of transformed fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 514, no. 1, pp. 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.139> (In English)
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M. et al. (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, vol. 330, no. 6000, pp. 55–60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270> (In English)
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J. S. et al. (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*, vol. 483, no. 7388, pp. 176–181. <https://doi.org/10.1038/nature10812> (In English)
- Dumitru, A. C., Stommen, A., Koehler, M. et al. (2021) Probing PIEZO1 localization upon activation using high-resolution atomic force and confocal microscopy. *Nano Letters*, vol. 21, no. 12, pp. 4950–4958. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c00599> (In English)
- Duscher, D., Maan, Z. N., Wong, V. W. et al. (2014) Mechanotransduction and fibrosis. *Journal of Biomechanics*, vol. 47, no. 9, pp. 1997–2005. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.03.031> (In English)
- Emig, R., Knodt, W., Krussig, M. J. et al. (2021) Piezo1 channels contribute to the regulation of human atrial fibroblast mechanical properties and matrix stiffness sensing. *Cells*, vol. 10, no. 3, article 663. <https://doi.org/10.3390/cells10030663> (In English)
- Franze, K. (2013) The mechanical control of nervous system development. *Development*, vol. 140, no. 15, pp. 3069–3077. <https://doi.org/10.1242/dev.079145> (In English)
- Gavara, N. (2016) A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microscopy Research and Technique*, vol. 80, no. 1, pp. 75–84. <https://doi.org/10.1002/jemt.22776> (In English)
- Gavara, N., Chadwick, R. S. (2012) Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nature Nanotechnology*, vol. 7, no. 11, pp. 733–736. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.163> (In English)
- Goldmann, W. H. (2014) Mechanosensation: A basic cellular process. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 126, pp. 75–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00004-X> (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. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0970> (In English)
- Habeler, W., Peschanski, M., Monville, C. (2009) Organotypic heart slices for cell transplantation and physiological studies. *Organogenesis*, vol. 5, no. 2, pp. 62–66. <https://doi.org/10.4161/org.5.2.9091> (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)
- Jiang, Y., Yang, X., Jiang, J., Xiao, B. (2021) Structural designs and mechanogating mechanisms of the mechanosensitive Piezo channels. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 46, no. 6, pp. 472–488. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.008> (In English)
- Khalisov, M. M., Penniyaynen, V. A., Podzorova, S. A. et al. (2020) Kolkhitsin izmenyaet strukturu tsitoskeleta fibroblastov: kolichestvennoe issledovanie adaptivnoj kletочноj reaksii metodami atomno-silovoj i konfokal'noj lazernoj skaniruyushchej mikroskopii [The effect of colchicine on the structure of the fibroblast cytoskeleton: A quantitative study of an adaptive cell response by means of atomic force and confocal laser scanning microscopy methods]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 115–122. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122> (In Russian)
- Lekka, M. (2016) Discrimination between normal and cancerous cells using AFM. *BioNanoScience*, vol. 6, pp. 65–80. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0191-3> (In English)
- Lin, Y.-C., Guo, Y. R., Miyagi, A. et al. (2019) Force-induced conformational changes in Piezo1. *Nature*, vol. 573, no. 7773, pp. 230–234. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1499-2> (In English)
- Lopatina, E. V., Kipenko, A. V., Penniyaynen, V. A. et al. (2015) Organotypic tissue culture investigation of homocysteine thiolactone cardiotoxic effect. *Acta Physiologica Hungarica*, vol. 102, no. 2, pp. 137–142. <https://doi.org/10.1556/036.102.2015.2.4> (In English)
- Lyon, R. C., Zanella, F., Omens, J. H., Sheikh, F. (2015) Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circulation Research*, vol. 116, no. 8, pp. 1462–1476. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304937> (In English)
- Ostrow, L. W., Sachs, F. (2005) Mechanosensation and endothelin in astrocytes-hypothetical roles in CNS pathophysiology. *Brain Research Reviews*, vol. 48, no. 3, pp. 488–508. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.005> (In English)
- Penniyaynen, V. A., Kipenko, A. V., Lopatina, E. V. et al. (2015) The effect of marinobufagenin on the growth and proliferation of cells in the organotypic culture. *Doklady Biological Sciences*, vol. 462, pp. 164–166. <https://doi.org/10.1134/S0012496615030096> (In English)
- Qin, L., He, T., Chen, S. et al. (2021) Roles of mechanosensitive channel Piezo1/2 proteins in skeleton and other tissues. *Bone Research*, vol. 9, article 44. <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00168-8> (In English)
- Ranade, S. S., Syeda, R., Patapoutian, A. (2015) Mechanically activated ion channels. *Neuron*, vol. 87, no. 6, pp. 1162–1179. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.032> (In English)
- Rotsch, C., Radmacher, M. (2000) Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, vol. 78, no. 1, pp. 520–535. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76614-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76614-8) (In English)
- 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)
- Sundstrom, L., Pringle, A., Morrison, B. III., Bradley, M. (2005) Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug Discovery Today*, vol. 10, no. 14, pp. 993–1000. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03502-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03502-6) (In English)
- Syeda, R., Xu, J., Dubin, A. E. et al. (2015) Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *eLife*, vol. 4, article e07369. <https://doi.org/10.7554/eLife.07369> (In English)
- Taberner, F. J., Prato, V., Schaefer, I. et al. (2019) Structure-guided examination of the mechanogating mechanism of Piezo2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 28, pp. 14260–14269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905985116> (In English)
- Vasileva, V., Chubinskiy-Nadezhdin, V. (2023) Regulation of PIEZO1 channels by lipids and the structural components of extracellular matrix/cell cytoskeleton. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 238, no. 5, pp. 918–930. <https://doi.org/10.1002/jcp.31001> (In English)
- Vollrath, M. A., Kwan, K. Y., Corey, D. P. (2007) The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 30, pp. 339–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112917> (In English)
- Wang, J., Jiang, J., Yang, X. et al. (2022) Tethering Piezo channels to the actin cytoskeleton for mechanogating via the cadherin- $\beta$ -catenin mechanotransduction complex. *Cell Reports*, vol. 38, no. 6, article 110342. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110342> (In English)
- Wang, Y., Chi, S., Guo, H. et al. (2018) A lever-like transduction pathway for long-distance chemical-and mechanogating of the mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, article 1300. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03570-9> (In English)
- Watson, S. A., Scigliano, M., Bardi, I. et al. (2017) Preparation of viable adult ventricular myocardial slices from large and small mammals. *Nature Protocols*, vol. 12, no. 12, pp. 2623–2639. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.139> (In English)