



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 57.086.83 + 577.29 + 576.32/.36

EDN SROHRZ

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-4-336-344>

Фармакологический активатор механочувствительных каналов Piezo1 вызывает увеличение жесткости сенсорных нейронов

В. А. Пеннийнен¹, М. М. Халисов^{✉1}, А. В. Беринцева¹, С. А. Подзорова¹, Б. В. Крылов¹

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

Сведения об авторах

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

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

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

Светлана Александровна Подзорова, SPIN-код: 3974-3430, Scopus AuthorID: 6602224180, ResearcherID: ABB-8808-2020, e-mail: 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

Для цитирования: Пеннийнен, В. А., Халисов, М. М., Беринцева, А. В., Подзорова, С. А., Крылов, Б. В. (2024) Фармакологический активатор механочувствительных каналов Piezo1 вызывает увеличение жесткости сенсорных нейронов. *Интегративная физиология*, т. 5, № 4, с. 336–344. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-4-336-344> EDN SROHRZ

Получена 2 декабря 2024; прошла рецензирование 17 декабря 2024; принята 18 декабря 2024.

Финансирование: Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН (№ 1021062411787-0-3.1.).

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

Аннотация. Одними из важнейших участников механизмов внутриклеточной механотрансдукции являются открытые в 2010 году механочувствительные ионные каналы семейства Piezo. Эти каналы (Piezo1 и Piezo2) обнаружены во многих типах клеток, включая первичные сенсорные нейроны, причем их роль здесь пока неясна. Изучению механизмов функционирования каналов Piezo1 может способствовать применение специфических фармакологических активаторов этих каналов, например, Jedi2. В литературе отсутствуют данные о влиянии Jedi2 на нейроны. В настоящей работе исследованы эффекты Jedi2 на первичные сенсорные нейроны. С помощью метода органотипической культуры ткани было установлено, что Jedi2 дозозависимо регулирует рост нейритов сенсорных нейронов спинномозговых ганглиев. Методом атомно-силовой микроскопии было показано, что указанный агент в концентрации 10 мкМ, которая не влияет на рост нейритов сенсорных нейронов, приводит к увеличению жесткости первичных сенсорных нейронов. Полученный результат можно объяснить опосредованным каналами Piezo1 запуском внутриклеточных Ca^{2+} -активируемых сигнальных путей, что указывает на возможность эффективного применения Jedi2 в концентрации 10 мкМ для выяснения молекулярных механизмов Piezo1-опосредованной механотрансдукции в первичных сенсорных нейронах при физиологически адекватных условиях.

Ключевые слова: сенсорные нейроны, атомно-силовая микроскопия, каналы Piezo1, Jedi2, органотипическая культура ткани

Pharmacological activator of Piezo1 mechanosensitive channels induces increased stiffness of sensory neurons

V. A. Penniyaynen¹, M. M. Khalisov^{✉1}, A. V. Berintseva¹, S. A. Podzorova¹, B. V. Krylov¹

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

Authors

Valentina A. Penniyaynen, SPIN: 6610-3718, Scopus AuthorID: 6603501257, ResearcherID: Q-3979-2016, ORCID: 0000-0003-3936-8681, e-mail: penniyaynen@infran.ru

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

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

Svetlana A. Podzorova, SPIN: 3974-3430, Scopus AuthorID: 6602224180, ResearcherID: ABB-8808-2020, e-mail: 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

For citation: Penniyaynen, V. A., Khalisov, M. M., Berintseva, A. V., Podzorova, S. A., Krylov, B. V. (2024) Pharmacological activator of Piezo1 mechanosensitive channels induces increased stiffness of sensory neurons. *Integrative Physiology*, vol. 5, no. 4, pp. 336–344. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-4-336-344> EDN SROHRZ

Received 2 December 2024; reviewed 17 December 2024; accepted 18 December 2024.

Funding: The study was supported by the State funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (No. 1021062411787-0-3.1.).

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

Abstract. Mechanosensitive ion channels of the Piezo family, discovered in 2010, are crucial participants of intracellular mechanotransduction. The Piezo1 and Piezo2 channels are found in various cell types, including primary sensory neurons, although their precise roles remain poorly understood. Although Jedi2, a pharmacological activator of Piezo1 channels, has been shown to modulate Piezo1 activity, its effects on neurons have not been studied yet. In this work, we investigate the impact of Jedi2 on primary sensory neurons. Using organotypic tissue culture, we demonstrate that Jedi2 regulates neurite growth of sensory neurons of dorsal root ganglia in a dose-dependent manner. Atomic force microscopy revealed that a 10 μ M concentration of Jedi2 — while having no effect on neurite growth — induces a significant increase in the stiffness of primary sensory neurons. This response can be explained by the triggering of intracellular Ca^{2+} -dependent signaling pathways mediated by Piezo1 channel activation. Our findings suggest that Jedi2 at 10 μ M concentration can serve as a useful tool for exploring the molecular mechanisms of Piezo1-mediated mechanotransduction in primary sensory neurons under physiologically relevant conditions.

Keywords: sensory neurons, atomic force microscopy, Piezo1 channels, Jedi2, organotypic tissue culture

Введение

Сущностью механотрансдукции является преобразование механических стимулов в электрические или химические ответы живой клетки (Martinac, Cox 2017). Механотрансдукция играет важную роль при реализации ряда физиологических функций, включая тактильную чувствительность, слух, проприоцепцию, ноцицепцию (Volkers et al. 2015). Молекулярными структурами, воспринимающими механические стимулы, являются механочувствительные ионные каналы, локализованные в плазматической мембране клетки (Canales Coutiño, Mayor 2021). Известны различные ионные каналы, участвующие в механотрансдукции в клетках эукариот: дегенерин/

эпителиальные натриевые (DEG/ENaC), калиевые (K2P), TRP (Transient Receptor Potential), а также Piezo (Miles et al. 2023). Последние были открыты лишь в 2010 году (Coste et al. 2010). Они широко распространены в организме человека, причем возможное нарушение их функционирования может стать причиной возникновения ряда патологий (Cox et al. 2016). Это, а также недостаточно полное понимание механизмов работы механочувствительных ионных каналов Piezo (Piezo1 и Piezo2) обуславливает особый интерес к их изучению. Piezo представляют собой неселективные катионные каналы, проницаемые преимущественно для ионов Ca^{2+} , в меньшей степени — для других катионов: Na^+ , K^+ , Cs^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} (Cox, Gottlieb 2019; Gnanasambandam

et al. 2017). Известно, что ионы Ca^{2+} играют центральную роль в регуляции многих внутриклеточных процессов, включая экспрессию генов и транспортировку белков, ремоделирование цитоскелета (Szczołot et al. 2021), поэтому активация указанных механочувствительных каналов должна играть роль в сопряжении процессов, вызванных механическими стимулами, и процессов внутриклеточной сигнализации.

Каналы Piezo участвуют в механотрансдукции сенсорных нейронов (Roh et al. 2020). Хотя исследования показывают, что каналы Piezo тесно связаны с передачей ощущения прикосновения, проприоцепцией и болью, роль Piezo1 в этих процессах пока неясна (Fang et al. 2021). Ранее считалось, что сенсорные нейроны экспрессируют только каналы Piezo2 (Coste et al. 2010; Ranade et al. 2014; Wang et al. 2019). Однако позже были получены данные, свидетельствующие, что сенсорные нейроны спинномозговых ганглиев экспрессируют и Piezo1 каналы (Roh et al. 2020; Shin et al. 2023). Пониманию роли каналов Piezo1 в механотрансдукции сенсорных нейронов могут способствовать исследования методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) (Binnig et al. 1986) с привлечением веществ, специфических модуляторов активности этих каналов, например таких, как активатор Jedi2. АСМ позволяет изучать механические свойства индивидуальных клеток, являющиеся важным индикатором их состояния (Pérez-Domínguez et al. 2020). Возможное изменение механических свойств сенсорных нейронов в ответ на действие Jedi2 может свидетельствовать о запуске внутриклеточных каскадных процессов, опосредованных активацией каналов Piezo1.

Настоящая работа посвящена изучению возможной роли механочувствительных каналов Piezo1 в процессе механотрансдукции в первичных сенсорных нейронах. Нами впервые было исследовано влияние воздействия Jedi2, специфического фармакологического активатора механочувствительных каналов Piezo1. Полученные результаты подтверждают участие каналов Piezo1 в механотрансдукции первичных сенсорных нейронов, а также свидетельствуют, что Jedi2 можно эффективно применять в исследованиях Piezo1-опосредованной механотрансдукции клеток.

Материалы и методы

Органотипическая культура нервной ткани

Применяемый метод органотипической культуры нервной ткани подробно описан в наших предыдущих работах (Penniaynen et al. 2019).

Объектами исследования были эксплантаты спинномозговых ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов. Экспериментальные эксплантаты культивировали в присутствии Jedi2 в течение трех суток. Эксплантаты, культивируемые только в питательной среде, считали контрольными. Морфометрический метод использовали для количественной оценки роста эксплантатов спинномозговых ганглиев. Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение площади зоны роста к исходной площади эксплантата. Контрольное значение ИП принимали за 100%. Оптический микроскоп Axiostar Plus (Carl Zeiss, Германия) применяли для визуализации эксплантатов. Полученные изображения анализировали с помощью программ ImageJ (National Institutes of Health, США) и ZEN_2012 (Carl Zeiss).

Метод получения культуры сенсорных нейронов

Сенсорные нейроны получали по ранее описанному протоколу (Khalisov et al. 2015; Plakhova et al. 2020). Спинномозговые ганглии 10–12-дневных куриных эмбрионов препарировали, диссоциировали и культивировали следующим образом: выделенные спинномозговые ганглии помещали в раствор Хенкса при 4°C, затем ферментативно диссоциировали 0,125% трипсином (Sigma, США) в течение одной минуты. Ферментативный раствор удаляли и заменяли раствором Хенкса, после чего пипетировали при 4°C. Полученную клеточную суспензию культивировали в питательной среде в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония) в течение трех суток при 37°C и 5% CO_2 . Jedi2 в концентрации 10 мкМ добавляли в экспериментальные чашки непосредственно перед исследованием методом АСМ.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Атомно-силовая микроскопия

Изучение влияния Jedi2 на механические свойства первичных сенсорных нейронов осуществляли с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Catalyst (Bruker, США). Для поиска клеток использовали инвертированный оптический микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), совмещенный с атомно-силовым микроскопом. АСМ-исследование сенсорных нейронов проводили в питательной среде. Температуру чашек Петри во время АСМ-эксперимента поддерживали на уровне около 37°C посредством встроенного в атомно-силовый микроскоп нагревательного элемента

под управлением термоконтроллера 335-й модели (Lake Shore, США).

Для изучения механических свойств первичных сенсорных нейронов применяли кантилеверы Nitra-Tall-V-G-(A) (ScanSens GmbH, Германия). Коэффициент жесткости каждого кантилевера калибровали перед исследованием клеток с помощью метода анализа тепловых шумов (Hutter, Bechhoefer 1993). АСМ-сканирование сенсорных нейронов осуществляли в режиме работы Peak-Force QNM, позволяющем одновременно получать информацию о топографии рельефа поверхности и локальных механических свойствах клеток. Картирование механических свойств при АСМ-сканировании возможно благодаря анализу силовых кривых, регистрируемых на исследуемой поверхности. Механические свойства сенсорных нейронов характеризовали значениями кажущегося модуля Юнга, определенными по модели Снеддона (в ней форма зонда считается конической) (Sneddon 1965), на основании следующего выражения:

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

где F — сила взаимодействия зонд — поверхность, ν — коэффициент Пуассона ($\nu = 0,5$), α — половинный угол раствора конуса ($\alpha = 20^\circ$), δ — величина деформации.

АСМ-сканированию подвергали фрагмент подложки, содержащий сомму сенсорного нейрона (рис. 1А). Значение пиковой силы воздействия зонда на клетку было выбрано на уровне 1 нН. Такая величина силы, с одной стороны, позволяет деформировать сенсорные нейроны в среднем на несколько сотен нанометров, а с другой, как правило, не представляет опасности для целостности клеток. Последнее подтверждается за счет визуального контроля, производимого с помощью оптического микроскопа в процессе проведения АСМ-эксперимента. При определении среднего значения кажущегося модуля Юнга клетки выбирали область на сомме, исключая края нейрона, где ошибка пиковой силы имеет максимальную амплитуду и зонд может контактировать с клеткой не острием, а боковой гранью (рис. 1В).

Используя АСМ-карту кажущегося модуля Юнга, определяли среднее значение его величины для каждого сенсорного нейрона. Влияние Jedi2 на механические свойства сенсорных нейронов выявляли путем сравнения средних значений кажущегося модуля Юнга экспериментальных и контрольных клеток.

Статистическая обработка

Статистический анализ полученных данных выполняли в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием t-критерия

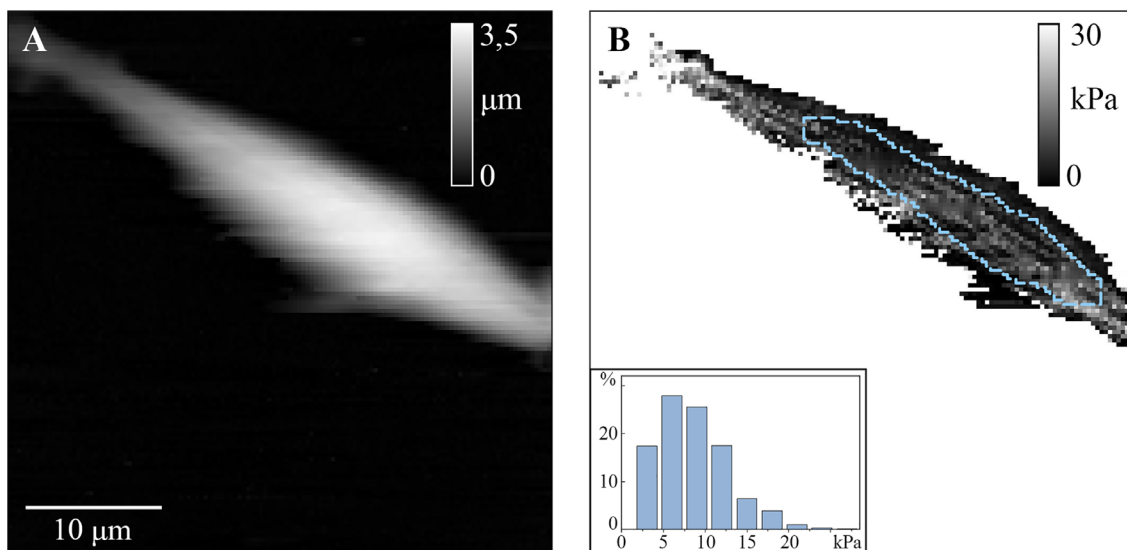


Рис. 1. АСМ-изображения контрольного сенсорного нейрона: топография рельефа поверхности (А) и карта распределения кажущегося модуля Юнга (В), прерывистой линией обозначена область анализа (во вставке — гистограмма кажущегося модуля Юнга в рамках выделенной области). Параметры АСМ-сканирования: заданное значение пиковой силы — 1 нН, частота строчной развертки — 0,15 Гц, частота и амплитуда вертикальных колебаний зонда — 0,25 кГц и 1 мкм соответственно, размер кадра — 128 × 128 точек

Fig. 1. AFM images of the control sensory neuron: (A) topography and (B) apparent Young's modulus map. The dashed line indicates the analysis area, with a histogram of the apparent Young's modulus within this area shown in the inset. AFM imaging parameters: peak force setpoint — 1 nN, scan rate — 0.15 Hz, peak force frequency — 0.25 kHz, peak force amplitude — 1 μm, respectively, frame size — 128 × 128

Стьюдента (метод органотипической культуры ткани) и U-критерия Манна — Уитни (АСМ). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Влияние Jedi2, фармакологического активатора механочувствительных каналов Piezo1, на рост эксплантатов спинномозговых ганглиев исследовали в концентрациях: 1 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ и 0,1 мМ (рис. 2). Добавление в культуральную среду Jedi2 в концентрациях 1 мкМ ($n = 28$) и 10 мкМ ($n = 27$) практически не влияло на рост эксплантатов спинномозговых ганглиев — ИП слабо отличались от контрольного значения ($n = 25$) (рис. 2). При введении в питательную среду Jedi2 в концентрации 20 мкМ наблюдали статистически значимое ингибирование роста нейритов сенсорных нейронов спинномозговых ганглиев. ИП экспериментальных эксплантатов был на $39 \pm 5\%$ ($n = 29$, $p < 0,05$) ниже контрольного значения. В концентрации 0,1 мМ ($n = 30$) исследуемое вещество полностью блокировало рост нейритов сенсорных нейронов спинномозговых ганглиев (рис. 2). Полученные данные демонстрируют, что Jedi2 оказывает дозозависимое действие на рост нейритов сенсорных нейронов спинномозговых ганглиев.

С помощью АСМ было исследовано воздействие Jedi2 в концентрации 10 мкМ на механические свойства первичных сенсорных нейронов. Анализ АСМ-данных показал статистически значимое различие между значениями кажущегося модуля Юнга первичных сенсорных нейронов, подвергшихся воздействию Jedi2, и контрольных клеток. В среднем жесткость сенсорных нейронов после культивирования в питательной среде в присутствии исследуемого вещества выросла до $10,9 \pm 0,9$ кПа ($n = 48$) по сравнению с контролем, $7,3 \pm 0,8$ кПа ($n = 40$). Следовательно, фармакологический активатор каналов Piezo1, Jedi2, в концентрации 10 мкМ вызывает увеличение жесткости первичных сенсорных нейронов.

Обсуждение

Механотрансдукция — фундаментальная способность, позволяющая живым организмам воспринимать механические сигналы как из внешней, так и из внутренней среды и реагировать на них. Существенная роль белков Piezo в механотрансдукции была подтверждена многочисленными исследованиями (Coste, Delmas 2024; Dienes et al. 2023; Douguet et al. 2019; Li et al. 2022; Szczot et al. 2021; Xu et al. 2021).

Ранее было высказано предположение о том, что в сенсорных нейронах экспрессируются

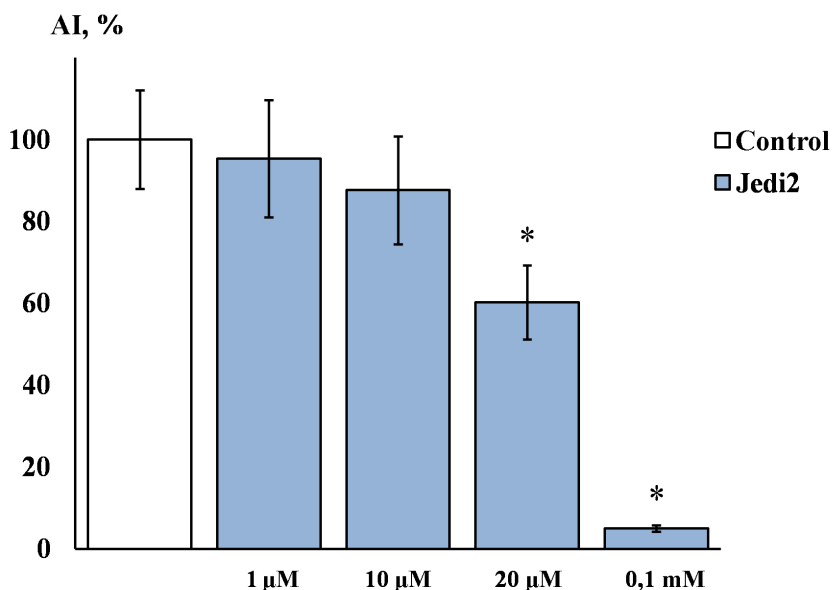


Рис. 2. Влияние Jedi2 на рост нейритов сенсорных нейронов спинномозговых ганглиев (третьи сутки культивирования). По оси ординат — индекс площади эксплантатов (AI, %), * — различия статистически значимы относительно контрольных значений, $p < 0,05$

Fig. 2. Effect of Jedi2 on the growth of neurites of sensory neurons of the dorsal root ganglion (3rd day of cultivation). The ordinate axis represents the area index (AI, %), * indicates statistically significant differences relative to the control values, $p < 0.05$

каналы Piezo2 и практически не экспрессируются каналы Piezo1 (Coste et al. 2010; Ranade et al. 2014). Однако позднее экспрессия Piezo1 была обнаружена в нейронах тройничного узла (Cho et al. 2022; Mikhailov et al. 2019) и спинномозговых ганглиев (Roh et al. 2020; Shin et al. 2023; Wang et al. 2019). Считается, что каналы Piezo2 необходимы для восприятия прикосновений, участвуют в механизмах проприоцепции. Особый интерес вызывают данные, согласно которым указанные каналы вносят вклад в функционирование ноцицептивной системы, нарушение их работы приводит к возникновению аллодинии (Wang et al. 2019; Zhang et al. 2019). Экспрессия Piezo1 в ноцицептивных нейронах спинномозговых ганглиев позволяет предположить участие этих каналов в модуляции ноцицептивной системы мозга (Wang et al. 2019).

Каналы Piezo представляют собой перспективные мишени для новых лекарственных субстанций (Coste, Delmas 2024; Dienes et al. 2023; Ridone et al. 2019). Однако, ввиду нехватки данных о специфических модуляторах активности каналов Piezo, возможности регуляции их работы сильно ограничены. Известны специфические синтетические активаторы каналов Piezo1: Yoda1 (Syeda et al. 2015), Jedi1 и Jedi2 (Wang et al. 2018). Специфических модуляторов активности каналов Piezo2 пока не обнаружено. Селективный фармакологический агонист Yoda1 широко используется для исследования потенциального влияния Piezo1 на различные клеточные процессы (Chubinskiy-Nadezhdin et al. 2019; Jiang et al. 2021; Roh et al. 2020; Vasileva et al. 2021). Данные о влиянии Jedi1/2 на внутриклеточные сигнальные пути, опосредуемые активацией Piezo1 каналов, в литературе практически отсутствуют.

Ясного представления о функции Piezo1 в первичных сенсорных нейронах пока нет. Ответу на этот вопрос могут способствовать специфические активаторы канала Piezo1, включая Jedi2. Для эффективного использования субстанции в исследовании роли Piezo1 в механотрансдукции сенсорных нейронов необходимо установить безопасную концентрацию Jedi2, поскольку высокие концентрации этого агента могут привести к повреждающим эффектам и к ошибочным выводам о степени участия Piezo1 в клеточной сигнализации.

В настоящей работе впервые с помощью метода органотипической культуры ткани было показано, что Jedi2 дозозависимо ингибирует рост нейритов сенсорных нейронов спинномозговых ганглиев. Известно, что активация канала Piezo1 способствует поступлению ионов

Ca^{2+} внутрь клетки, которые впоследствии запускают внутриклеточные сигнальные пути, в том числе, кальций/кальмодулин-зависимую протеинкиназу II, эндотелиальную синтазу оксида азота, фосфоинозитид-3 киназу/протеинкиназу B (Kang et al. 2019; Lai et al. 2021; Wang et al. 2022). Было показано, что Yoda1, селективный агонист Piezo1, индуцирует Ca^{2+} -ответ главным образом в нейронах малого и среднего размера спинно-мозговых ганглиев мышей (Roh et al. 2020). Подобный внутриклеточный кальциевый ответ на Yoda1 был продемонстрирован в нейронах ганглия тройничного нерва (Mikhailov et al. 2019). По-видимому, обнаруженный в настоящей работе ингибирующий эффект Jedi2 на рост нейритов сенсорных нейронов спинномозговых ганглиев связан с Ca^{2+} -зависимыми сигнальными путями, опосредованными Piezo1.

Важным направлением применения АСМ является количественный подход к изучению механических свойств клеток (Haase, Pelling 2015). Изменения механических свойств клеток могут быть связаны с развитием различных заболеваний, например, рака (Stylianou et al. 2018), диабета (Benech et al. 2014), прогрессирующей псевдоревматоидной дисплазии (Lin et al. 2020). Кроме того, влияние на механические свойства клеток способны оказывать старение (Lieber et al. 2004), жесткость подложки (Tee et al. 2011), химические вещества (Khalisov et al. 2020; Liang et al. 2021). Таким образом, изучение механических свойств клеток посредством АСМ может способствовать более глубокому пониманию различных физиологических и патологических процессов. В данной работе метод АСМ был применен для исследования действия Jedi2 на механические свойства первичных сенсорных нейронов. Было обнаружено, что изучаемое вещество в концентрации 10 мкМ, которая не влияла на рост нейритов, вызывает увеличение жесткости клеток. Поскольку Jedi2 представляет собой специфический активатор механочувствительных каналов Piezo1, полученный результат свидетельствует, что субстанция, связываясь с каналами Piezo1 и открывая их, вероятно, запускает Ca^{2+} -опосредованные внутриклеточные каскадные процессы, приводящие к изменению механических свойств первичных сенсорных нейронов.

Ранее отмечалось, что высокое значение $\text{EC}_{50} \approx 158$ мкМ (Wang et al. 2018) может служить ограничивающим фактором использования Jedi2 в лабораторных исследованиях (Coste, Delmas 2024). Действительно, в наших экспериментах наблюдалось сильно выраженное ингибирующее

действие Jedi2 при его концентрации, равной 0,1 мМ. Вместе с тем, данные АСМ показали, что на порядок более низкая концентрация субстанции, 10 мкМ, способна вызывать увеличение жесткости сенсорных нейронов. Полученный результат указывает на возможность эффективного применения Jedi2 именно в этой концентрации для исследований Piezo1-опосредованной механотрансдукции при физиологически адекватных условиях. К такому же выводу пришли и другие авторы, показавшие с применением метода локальной фиксации потенциала, что Jedi2 в концентрации 6 мкМ активирует каналы Piezo1 в клетках K562 (Vasileva et al. 2021). Отметим, что подобный эффект Jedi2 наблюдался ранее и на фибробластах сердца (Khalisov et al. 2024). Схожесть ответов первичных сенсорных нейронов и фибробластов сердца на Jedi2 может указывать на универсальность механизмов действия изучаемой субстанции на клетки разных тканей.

Обнаруженные в настоящей работе ответы на Jedi2 первичных сенсорных нейронов могут объясняться Piezo1-опосредованной активацией Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных сигнальных путей, детализация этих молекулярных механизмов станет задачей наших будущих исследований.

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, утверж-

денным правовыми актами Российской Федерации, и рекомендациям биоэтического комитета Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Ethics Approval

All procedures conducted in this study complied with the ethical standards outlined by the legal regulations of the Russian Federation and the recommendations of the Bioethical Committee of the Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences (RAS).

Вклад авторов

- a. Пеннияйнен Валентина Альбертовна — идея работы, планирование и проведение экспериментов, подготовка рукописи;
- b. Халисов Максим Миндигалеевич — планирование и проведение экспериментов, обработка результатов, подготовка рукописи;
- c. Беринцева Анна Владиславовна — обработка результатов, подготовка рукописи;
- d. Подзорова Светлана Александровна — обработка результатов, подготовка рукописи;
- e. Крылов Борис Владимирович — постановка задачи, редактирование рукописи.

Author Contributions

- a. Valentina A. Penniyaynen — conceived the study, designed and conducted the experiments, prepared the manuscript;
- b. Maksim M. Khalisov — designed and conducted the experiments, processed the experimental data, prepared the manuscript;
- c. Anna V. Berintseva — processed the experimental data, prepared the manuscript;
- d. Svetlana A. Podzorova — processed the experimental data, prepared the manuscript;
- e. Boris V. Krylov — defined the research problem, edited the manuscript.

References

- Benech, J. C., Benech, N., Zambrana, A. I. et al. (2014) Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *American Journal of Physiology — Cell Physiology*, vol. 307, no. 10, pp. C910–C919. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00192.2013> (In English)
- Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930> (In English)
- Canales Coutiño, B., Mayor, R. (2021) Mechanosensitive ion channels in cell migration. *Cells & Development*, vol. 166, article 203683. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203683> (In English)
- Cho, Y. S., Han, H. M., Jeong, S. Y. et al. (2022) Expression of Piezo1 in the trigeminal neurons and in the axons that innervate the dental pulp. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 16, article 945948. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.945948> (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., Delmas, P. (2024) PIEZO ion channels in cardiovascular functions and diseases. *Circulation Research*, vol. 134, no. 5, pp. 572–591. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.322798> (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)
- Cox, C. D., Bae, C., Ziegler, L. et al. (2016) Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals PIEZO1 is gated by bilayer tension. *Nature Communications*, vol. 7, no. 1, article 10366. <https://doi.org/10.1038/ncomms10366> (In English)
- Cox, C. D., Gottlieb, P. A. (2019) Amphipathic molecules modulate PIEZO1 activity. *Biochemical Society Transactions*, vol. 47, no. 6, pp. 1833–1842. <https://doi.org/10.1042/bst20190372> (In English)
- Dienes, B., Bazsó, T., Szabó, L., Csernoch, L. (2023) The role of the Piezo1 mechanosensitive channel in the musculoskeletal system. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 7, article 6513. <https://doi.org/10.3390/ijms24076513> (In English)
- Douguet, D., Patel, A., Xu, A. et al. (2019) Piezo ion channels in cardiovascular mechanobiology. *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 40, no. 12, pp. 956–970. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.10.002> (In English)
- Fang, X.-Z., Zhou, T., Xu, J.-Q. et al. (2021) Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell & Bioscience*, vol. 11, no. 1, article 13. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00522-z> (In English)
- Gnanasambandam, R., Gottlieb, P. A., Sachs, F. (2017) The kinetics and the permeation properties of Piezo channels. *Current Topics in Membranes*, vol. 79, pp. 275–307. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2016.11.004> (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)
- 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, F., Yin, K., Wu, K. et al. (2021) The mechanosensitive Piezo1 channel mediates heart mechano-chemo transduction. *Nature Communications*, vol. 12, no. 1, article 869. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21178-4> (In English)
- Kang, H., Hong, Z., Zhong, M. et al. (2019) Piezo1 mediates angiogenesis through activation of MT1-MMP signaling. *American Journal of Physiology — Cell Physiology*, vol. 316, no. 1, pp. C92–C103. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00346.2018> (In English)
- Khalisov, M. M., Ankudinov, A. V., Penniyaynen, V. A. et al. (2015) Application of atomic force microscopy for investigation of Na⁺,K⁺-ATPase signal-transducing function. *Acta Physiologica Hungarica*, vol. 102, no. 2, pp. 125–130. <https://doi.org/10.1556/036.102.2015.2.2> (In English)
- Khalisov, M. M., Berintseva, A. V., Podzorova, S. A. et al. (2024) Primenenie metoda atomno-silovoj mikroskopii dlya issledovaniya otvetov mekhanochuvstvitel'nykh kanalov Piezo1 fibroblastov serdtsa [Atomic force microscopy as a method to study the responses of mechanosensitive Piezo1 channels of cardiac fibroblasts]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 5, no. 1, pp. 51–59. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-1-50-59> (In Russian)
- 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)
- Lai, A., Chen, Y. C., Cox, C. D. et al. (2021) Analyzing the shear-induced sensitization of mechanosensitive ion channel Piezo-1 in human aortic endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 236, no. 4, pp. 2976–2987. <https://doi.org/10.1002/jcp.30056> (In English)
- Li, X., Hu, J., Zhao, X. et al. (2022) Piezo channels in the urinary system. *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 54, no. 6, pp. 697–710. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00777-1> (In English)
- Liang, X., Liu, S., Wang, X. et al. (2021) Alteration of nanomechanical properties of pancreatic cancer cells through anticancer drug treatment revealed by atomic force microscopy. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 1372–1379. <https://doi.org/10.3762/bjnano.12.101> (In English)
- Lieber, S. C., Aubry, N., Pain, J. et al. (2004) Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *American Journal of Physiology — Heart and Circulatory Physiology*, vol. 287, no. 2, pp. H645–H651. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00564.2003> (In English)
- Lin, L. J., Ge, Y. M., Tian, Y. et al. (2020) Multi-scale mechanical investigation of articular cartilage suffered progressive pseudorheumatoid dysplasia. *Clinical Biomechanics*, vol. 79, article 104947. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2019.12.029> (In English)

- Martinac, B., Cox, C. D. (2017) Mechanosensory transduction: Focus on ion channels. In: B. D. Roitberg (ed.). *Reference module in life sciences*. Amsterdam: Elsevier Publ., pp. 1–47. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.08094-8> (In English)
- Mikhailov, N., Leskinen, J., Fagerlund, I. et al. (2019) Mechanosensitive meningeal nociception via Piezo channels: Implications for pulsatile pain in migraine? *Neuropharmacology*, vol. 149, pp. 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.015> (In English)
- Miles, L., Powell, J., Kozak, C., Song, Y. (2023) Mechanosensitive ion channels, axonal growth, and regeneration. *The Neuroscientist*, vol. 29, no. 4, pp. 421–444. <https://doi.org/10.1177/10738584221088575> (In English)
- Penniyaynen, V. A., Plakhova, V. B., Rogachevskii, I. V. et al. (2019) Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. *Pathophysiology*, vol. 26, no. 3–4, pp. 245–352. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2019.06.003> (In English)
- Pérez-Domínguez, S., Kulkarni, S. G., Rianna, C., Radmacher, M. (2020) Atomic force microscopy for cell mechanics and diseases. *Neuroforum*, vol. 26, no. 2, pp. 101–109. <https://doi.org/10.1515/nf-2020-0001> (In English)
- Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A., Rogachevskii, I. V. et al. (2020) Dual mechanism of modulation of 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)
- Ranade, S. S., Woo, S.-H., Dubin, A. E. et al. (2014) Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature*, vol. 516, no. 7529, pp. 121–125. <https://doi.org/10.1038/nature13980> (In English)
- Ridone, P., Vassalli, M., Martinac, B. (2019) Piezo1 mechanosensitive channels: What are they and why are they important. *Biophysical Reviews*, vol. 11, no. 5, pp. 795–805. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00584-5> (In English)
- Roh, J., Hwang, S.-M., Lee, S.-H. et al. (2020) Functional expression of Piezo1 in dorsal root ganglion (DRG) neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 11, article 3834. <https://doi.org/10.3390/ijms21113834> (In English)
- Shin, S. M., Itson-Zoske, B., Fan, F. et al. (2023) Peripheral sensory neurons and non-neuronal cells express functional Piezo1 channels. *Molecular Pain*, vol. 19, article 17448069231174315. <https://doi.org/10.1177/17448069231174315> (In English)
- Sneddon, I. N. (1965) The relation between load and penetration in the axisymmetric 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)
- Stylianou, A., Lekka, M., Stylianopoulos, T. (2018) AFM assessing of nanomechanical fingerprints for cancer early diagnosis and classification: From single cell to tissue level. *Nanoscale*, vol. 10, no. 45, pp. 20930–20945. <https://doi.org/10.1039/c8nr06146g> (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)
- Szczot, M., Nickolls, A. R., Lam, R. M. et al. (2021) The form and function of Piezo2. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 90, no. 1, pp. 507–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-081720-023244> (In English)
- Tee, S.-Y., Fu, J., Chen, C. S. et al. (2011) Cell shape and substrate rigidity both regulate cell stiffness. *Biophysical Journal*, vol. 100, no. 5, pp. L25–L27. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3744> (In English)
- Vasileva, V., Morachevskaya, E., Sudarikova, A. et al. (2021) Selective chemical activation of Piezo1 in leukemia cell membrane: Single channel analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 15, article 7839. <https://doi.org/10.3390/ijms22157839> (In English)
- Volkers, L., Mechoukhi, Y., Coste, B. (2015) Piezo channels: From structure to function. *Pflügers Archiv — European Journal of Physiology*, vol. 467, no. 1, pp. 95–99. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1578-z> (In English)
- Wang, H., Yuan, Z., Wang, B. et al. (2022) COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), a novel PIEZO1 regulator that controls blood pressure. *Hypertension*, vol. 79, no. 3, pp. 549–561. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17972> (In English)
- Wang, J., La, J.-H., Hamill, O. P. (2019) Piezo1 is selectively expressed in small diameter mouse DRG neurons distinct from neurons strongly expressing TRPV1. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 12, article 178. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00178> (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)
- Xu, X., Liu, S., Liu, H. et al. (2021) Piezo channels: Awesome mechanosensitive structures in cellular mechanotransduction and their role in bone. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 12, article 6429. <https://doi.org/10.3390/ijms22126429> (In English)
- Zhang, M., Wang, Y., Geng, J. et al. (2019) Mechanically activated Piezo channels mediate touch and suppress acute mechanical pain response in mice. *Cell Reports*, vol. 26, no. 6, pp. 1419–1431. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.056> (In English)