

На правах рукописи

Халисов Максим Миндигалеевич

**ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ
ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ОТКЛИКА НАТИВНЫХ КЛЕТОК НА ВНЕШНИЕ
ВОЗДЕЙСТВИЯ**

Специальность 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Санкт-Петербургском национальном исследовательском университете информационных технологий, механики и оптики

Научный руководитель: **Анкудинов Александр Витальевич**
доктор физико-математических наук

Официальные оппоненты: **Васютинский Олег Святославович**
доктор физико-математических наук,
ФГБУН Физико-технический институт им.
А.Ф. Иоффе РАН, главный научный
сотрудник лаборатории физической
газодинамики

Лебедев Дмитрий Витальевич
кандидат физико-математических наук,
ФГБУ Петербургский институт ядерной
физики им. Б.П. Константинова (ПИЯФ)
НИЦ «Курчатовский институт»,
исполняющий обязанности заместителя
руководителя отделения молекулярной и
радиационной биофизики

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный
электротехнический университет «ЛЭТИ»
им. В.И. Ульянова (Ленина)

Защита состоится 25 декабря 2017 г. в 16:00 на заседании диссертационного совета Д 002.034.01 на базе Института аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН) по адресу: 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31–33 лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайтах www.iairas.ru и www.iai.rssi.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.034.01
доктор физико-математических наук



Буляница А. Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы:

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) все больше используется для изучения различных биологических объектов, в особенности животных клеток. Дальнейшему развитию этого направления исследований могут способствовать появившиеся недавно коммерческие АСМ системы, специально адаптированные для работы с нативными клетками в физиологически адекватных условиях (в жидкой среде при оптимальной температуре). Адаптация достигается в том числе за счет полноценной реализации квазистатических режимов (PeakForce QNM, Bruker; HybriD Mode, NT-MDT SI и т.д.), позволяющих поточно детектировать нагрузочно-разгрузочные индентационные зависимости (силовые кривые АСМ). В этих режимах повышена информативность АСМ измерений: автоматическая обработка массивов данных с силовыми кривыми открывает доступ не только к геометрическим, но и к разнообразным локальным механическим характеристикам клетки, таким как контактная жесткость, деформация, сила адгезии зонда к образцу, диссипация энергии в нагрузочно-разгрузочном цикле, модуль Юнга. Увеличение информативности стимулирует расширение АСМ исследований морфологии и механических свойств нативных клеток, нацеленных на биомедицинские применения, такие как определение физиологического и патологических состояний клетки, изучение действия токсинов и лекарств на клеточном уровне.

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

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

Представленные в работе результаты объединены под названием «Применение АСМ для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия» и получены как раз в такого рода методических экспериментах. В качестве образцов для этих экспериментов были выбраны нативные фибробласты, эритроциты, микрососудистые эндотелиальные клетки,

сенсорные нейроны, – достаточно традиционные тестовые объекты для биомедицинских исследований другими методами, альтернативными АСМ.

Все вышесказанное обосновывает актуальность диссертации.

Цель и задачи работы

Цель работы: разработка и адаптация методик атомно-силовой микроскопии (АСМ), повышающих точность детектирования механических и геометрических характеристик нативных объектов (клеток животных) и обеспечивающих возможность использования этих характеристик, как индикаторов внешних воздействий на такие объекты.

Задачи:

- Разработать АСМ методику определения неоднородностей механических свойств наружных слоев нативного объекта. Исследовать с ее помощью фибробласты сердечной ткани.

- Развить способы измерения геометрических и механических характеристик нативных эритроцитов, продолжительное время контактирующих с полилизинной подложкой.

- Применяя АСМ, определить значения модуля Юнга нативного микрососудистого эндотелия в областях с толщиной слоев на твердой подложке, сравнимой с глубиной индентирования. Исследовать отклик этого параметра на специфические ингибиторы полимеризации цитоскелета.

- Адаптировать АСМ методику измерений модуля Юнга для исследования нативных сенсорных нейронов и детектирования их отклика на вещества с анальгетическим эффектом.

Научная новизна работы:

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

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

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

Практическая значимость работы:

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

Положения, выносимые на защиту:

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

Апробация работы

Основные положения и результаты работы докладывались и обсуждались на VII Всероссийской школе-семинаре студентов, аспирантов и молодых ученых по направлению «Диагностика наноматериалов и наноструктур» (Рязань, 2014); XLIV научной и учебно-методической конференции Университета ИТМО (Санкт-Петербург, 2015); V Всероссийском конгрессе молодых ученых Университета ИТМО (Санкт-Петербург, 2016); Первой российской конференции «Физика – наукам о жизни» ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН (Санкт-Петербург, 2016); XXI Международном симпозиуме «Нанозифика и наноэлектроника» (Нижний Новгород, 2017), Международной конференции «Сканирующая зондовая микроскопия» (Екатеринбург, 2017) и Второй российской конференции «Физика – наукам о жизни» ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН (Санкт-Петербург, 2017).

Публикации

Основные результаты диссертации изложены в 24 печатных работах, из них 5 в научных журналах, рекомендованных ВАК, и 19 в материалах международных и российских конференций.

Достоверность и надежность результатов.

Достоверность результатов подтверждена многократно воспроизводимыми экспериментами, проведенным анализом адекватности аналитических моделей,

выбранных для описания измерений, соответствием с результатами других авторов. Она обусловлена совместным использованием взаимодополняющих методов атомно-силовой и оптической микроскопии, а также современных теоретических представлений о взаимодействии зонда АСМ с мягкими и вязкими объектами, помещенными в жидкую среду.

Личный вклад автора

Автором получены все основные оригинальные экспериментальные результаты диссертации. Анализ экспериментальных и теоретических результатов, а также подготовка публикаций проводились совместно с соавторами из Института Физиологии им. И.П. Павлова, Российского кардиологического научно-производственного комплекса, ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Университета ИТМО, Института аналитического приборостроения и научным руководителем.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, заключения, списка литературы. Общий объем диссертации составляет 185 страниц, включая 57 рисунков, 2 таблицы и список цитируемой литературы из 246 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность проведенного исследования, изложены цель и задачи работы, а также сформулированы выносимые на защиту положения. Описаны новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены сведения об апробации работы, обозначен личный вклад автора.

Первая глава – литературный обзор по теме исследования. Приведена краткая информация об объекте изучения данной работы – нативной животной клетке. Рассмотрены распространенные активные (регистрирующие отклик клетки на деформацию под действием внешних сил) методы изучения механических характеристик индивидуальных клеток – микропипеточная аспирация и оптический пинцет, а также различные варианты реализации пассивных методов (позволяющих детектировать генерируемые самой клеткой силы). Изложена суть атомно-силовой микроскопии (АСМ) – активного метода измерения механических параметров клеток, основного метода исследования данной работы. Представлено обзрение режимов АСМ для изучения механических характеристик образца – традиционных (силовой спектроскопии, Force Volume и др.), а также более новых квазистатических режимов (PeakForce QNM, Bruker; HybriD mode, НТ-МДТ и др.). Приведены данные о растущем интересе к АСМ изучению клеток. Перечислены основные достоинства и недостатки АСМ при исследовании нативных животных клеток. Кроме того, обозначена проблема большого разброса измеренного с помощью АСМ модуля Юнга нативных клеток, вкратце описаны наиболее популярные механические модели для расчета модуля упругости в АСМ.

Вторая глава является методической. В ней приведен принцип действия атомно-силового микроскопа. Рассмотрены оптимизированный для

биологических образцов зондовый микроскоп Bruker BioScope Catalyst и квазистатический режим PeakForce QNM, которые использовались для зондирования нативных животных клеток в данной работе. Показаны варианты определения модуля Юнга в режиме PeakForce QNM. Изложены особенности выбора зондового датчика для измерений нативных клеток и подготовки образцов с клетками для АСМ исследования. Описаны условия и параметры сканирования клеток в PeakForce QNM, представлена информация об обработке данных АСМ. Кроме того, проанализированы артефакты АСМ изображений, которые обнаруживаются при сканировании нативных клеток животных в режиме PeakForce QNM.

В главе 3 предложена методика, позволившая установить, что наружный слой нативного фибробласта куриного эмбриона, культивированного на коллагеновой подложке, жестче более глубоких слоев клетки. Для индентирования нативных фибробластов были применены зонды двух типов: стандартные острые Bruker SNL-(D) и специальные, субмикронные сферические NT-MDT CSG10 [1] (рисунок 1 а,б).

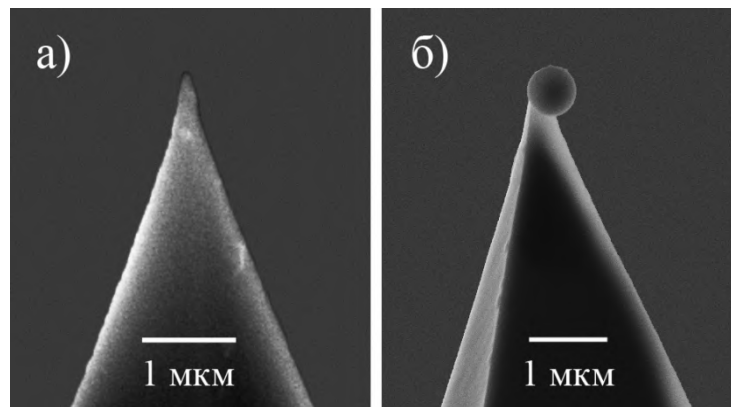


Рисунок - 1 СЭМ изображения а) стандартного зонда, закругление кончика по паспорту $R \leq 12$ нм, б) зонда с SiO_2 сферической частицей, $R = 325$ нм.

В первом случае расчет модуля Юнга (E) производился в рамках модели Снеддона (зонд аппроксимируется конусом) [2]:

$$F_s = \frac{2}{\pi} \frac{E_s}{1-\nu^2} \text{tg}\alpha \cdot \delta^2 \quad (1)$$

где F_s – сила отталкивания зонда от образца, ν – коэффициент Пуассона, α – половинный угол раствора конического индентора, δ – деформация. Во втором случае нужный параметр определялся в соответствии с моделью ДМТ (индентор сферической формы) [3]:

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

где $(F_{DMT} - F_{adh})$ – сила отталкивания зонд-образец (F_{adh} – сила адгезии), R – радиус закругления кончика зонда.

АСМ исследования выявили сильную гетерогенность механических характеристик фибробластов (рисунок 2 а,б). Распределение фибриллярных

структур под мембраной существенно варьировалось от клетки к клетке, что особенно явно проявлялось на АСМ картах модуля Юнга фибробластов, полученных с помощью острого зонда. Наблюдаемые при АСМ картировании крупные и жесткие элементы цитоскелета клеток соответствуют стресс-фибриллам (пучкам актиновых волокон, скрепленных молекулами миозина) [4].

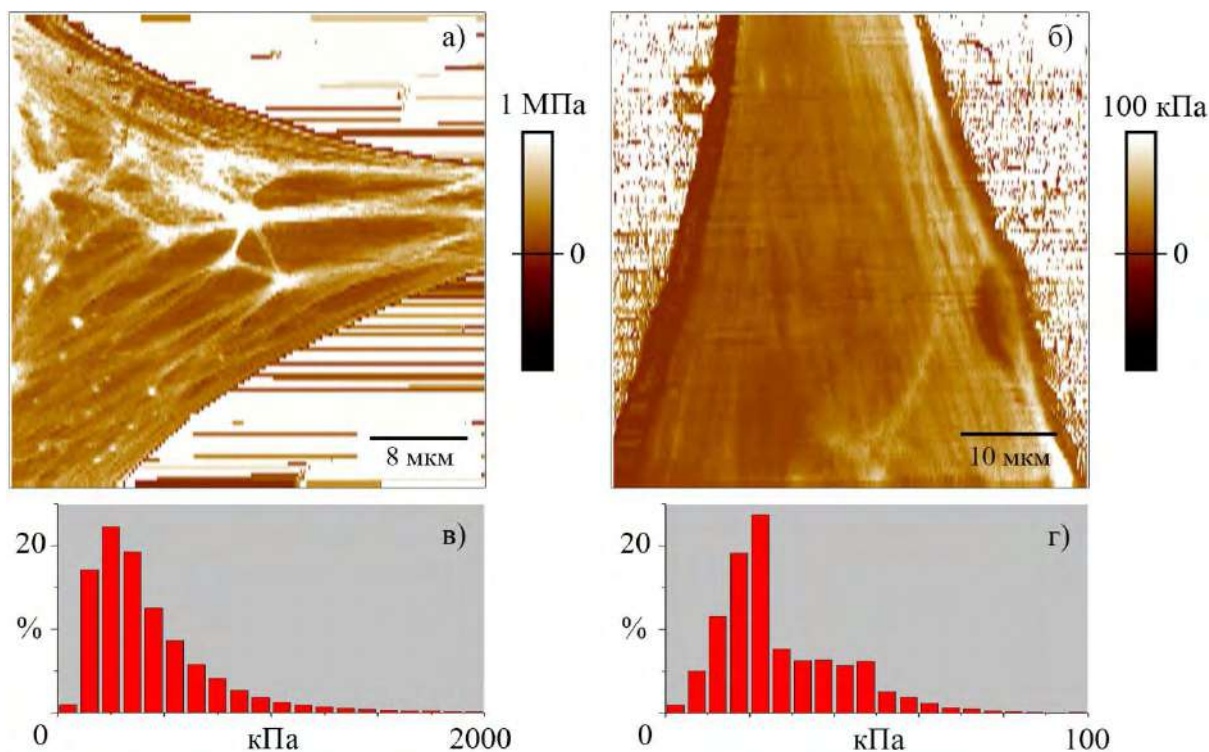


Рисунок 2 - а,б) АСМ карты модуля Юнга, полученные с помощью стандартного острого и субмикронного сферического зондов, соответственно; в,г) распределения значений модуля Юнга по поверхности фибробластов с а,б.

Чтобы избежать возможных нарушений условия предельной деформации [5], использовались поправочные коэффициенты, позволяющие в расчете учесть малую толщину объекта исследования [6, 7]. Вычисление модуля Юнга фибробластов E_S при зондировании клеток острым индентором производилось в соответствии со следующим выражением [7]:

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

где h – локальная высота (применимость: при $\delta < 80\%$ от h). А при использовании субмикронных сферических зондов расчет модуля упругости клеток осуществлялся по другому выражению [6]:

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

$$\chi = \frac{\sqrt{R\delta}}{h} \quad (5)$$

(применимость: при $0,1R < h < 12,8R$).

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

Из $F(\delta)$ зависимостей (1) и (2) фиксируя F и δ , находим следующую связь между модулями упругости по Снеддону и ДМТ:

$$\frac{E_S}{E_{DMT}} = \frac{2\pi}{3\text{tg}\alpha} \sqrt{\frac{R}{\delta}} \quad (6)$$

Подстановка экспериментальных значений параметров $\alpha = 18^\circ$, $R = 325$ нм, $\delta = 200$ нм (средняя деформация острым зондом) дает $E_S/E_{DMT} \approx 8$.

Теоретическая оценка и экспериментальное значение E_S/E_{DMT} несколько отличаются, но следует учитывать большую погрешность при определении экспериментальных значений модуля Юнга. Разница может быть связана также с тем, что штатная программа обработки АСМ данных считает значения модуля по Снеддону, используя кривую подвода, а в ДМТ модели – кривую отвода.

Интересно, что в отличие от модуля Юнга, средние локальные жесткости ($S = F/\delta$) практически совпали – 18 ± 7 мН/м ($n = 118$) и 18 ± 4 мН/м ($n = 22$) – для острого и сферического инденторов соответственно. Существенное несовпадение модулей Юнга по Снеддону и ДМТ при одинаковой контактной жесткости клеток свидетельствует, что обе модели не применимы для анализа полученных данных по фибробластам. В наших экспериментах локальная жесткость более адекватно описывала механические свойства этих клеток.

При однородности фибробластов, деформации, сообщенные клеткам зондами с различной остротой, должны отличаться. Если предположить, что внешние слои фибробласта существенно мягче внутренних и, в отличие от сферического, острый зонд их «не чувствует», то в измерениях сферическим зондом клетки должны казаться выше. Однако анализ АСМ топографий показал, что средние максимальные высоты фибробластов совпали: $1,7 \pm 0,5$ мкм (острый зонд) и $1,7 \pm 0,4$ мкм (сферический зонд).

Независимость контактной жесткости фибробласта от остроты индентора можно объяснить, рассматривая внешние слои этих клеток как жесткую оболочку, глубина продавливания которой определяется только величиной приложенной силы.

Глава 4 составлена по результатам АСМ исследования нефиксированных, нативных крысиных эритроцитов на полилизинной подложке. Для прикрепления нефиксированных эритроцитов в АСМ экспериментах используют поли-L-лизин. Отмечалось, что адгезия клеток к полилизину может быть настолько сильной, что объекты меняют свою форму, расплываясь по подложке [8]. Мы изучили влияние полилизина на свойства эритроцитов, исследуя клетки в физиологическом растворе в чашках Петри, обработанных очень слабым (0,001%) водным раствором полилизина.

В наших экспериментах эритроциты при наблюдении в инвертированном световом микроскопе представляли собой оптически контрастные объекты округлой формы и в стандартном режиме светлого поля имели красноватую окраску (рисунок 3 а). Было обнаружено, что некоторые клетки со временем обесцвечиваются и становятся практически невидимыми (рисунок 3 б). В этом случае лишь контуры клеток слабо проявляются на фоне подложки.

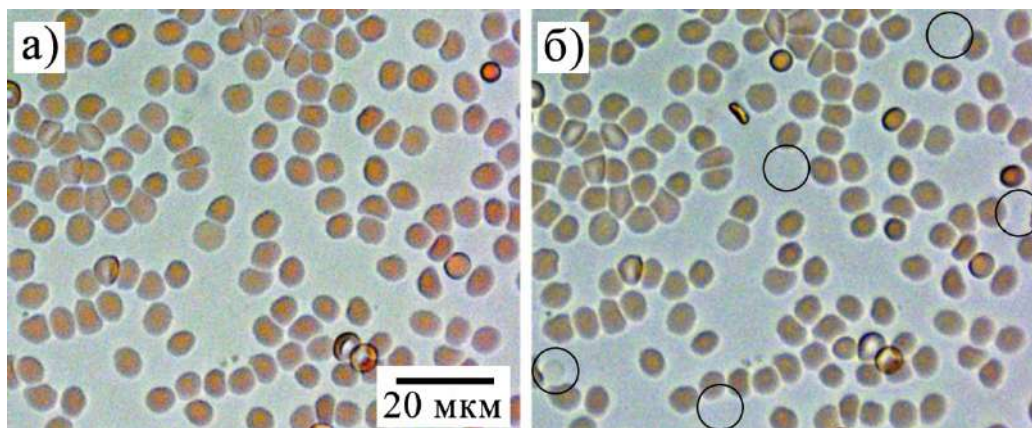


Рисунок 3 - Эритроциты на полилизине а) после приготовления образца б) по прошествии 90 минут (кругами отмечены обесцвечившиеся клетки)

АСМ сканирование показало, что изменение оптических свойств эритроцитов сопровождается трансформацией их формы. Так, если в исходном состоянии они были плоскими и невысокими – $0,3 \pm 0,3$ мкм ($n = 22$), то трансформировавшиеся оптически прозрачные клетки становились значительно выше – $1,7 \pm 0,5$ мкм ($n = 7$) и приобретали куполообразную форму. Средний модуль Юнга таких эритроцитов был почти в 4 раза больше, чем у оптически контрастных – 48 ± 10 кПа ($n = 6$) и 13 ± 9 кПа ($n = 17$) соответственно.

Процесс трансформации удалось зарегистрировать во время АСМ сканирования. Эритроцит, расположенный в верхней части кадра на рисунке 4 а,б меняет форму, и одновременно увеличиваются значения модуля упругости на его поверхности.

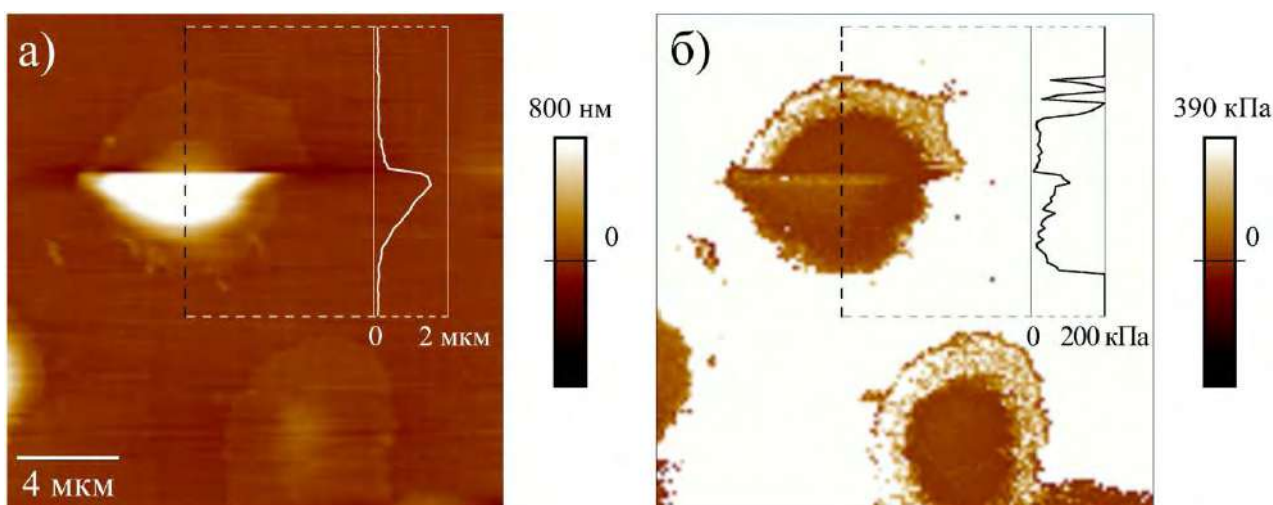


Рисунок 4 - АСМ а) топография эритроцитов (пунктиром показано место сечения) б) карта распределения модуля Юнга.

В работе [9] тоже наблюдалось обесцвечивание эритроцитов на полилизине. Авторы связали явление с разрывом плазматической мембраны вследствие ее продолжительного натяжения, вызванного сильной адгезией с полилизиновой подложкой. Согласно расчетам, у распластанных на полилизине клеток величина натяжения мембраны составляет $\approx 0,001$ Н/м [9]. Т.к. это на порядок больше естественного натяжения, сделан вывод, что дополнительное натяжение может вызывать разрыв мембраны и лизис клетки. В работе приведен предполагаемый механизм взаимодействия нативных эритроцитов с полилизиновой подложкой, согласно которому сразу после осаждения на полилизин эритроцит приобретает выпуклую форму, а по прошествии времени его мембрана рвется – происходит лизис.

Наши эксперименты показали, что при обесцвечивании эритроциты увеличиваются в объеме и упрочняются, но целостность мембраны сохраняется, и лизиса трансформировавшихся клеток не происходит. В связи с полученными результатами, предложены следующие стадии взаимодействия нативных эритроцитов с полилизиновой подложкой (рисунок 5): (1) осаждение свободного дискоцита на полилизиновую подложку → (2) распластывание по полилизину из-за сильной адгезии между клеткой и подложкой → (3) набухание эритроцита → (4) разрыв плазматической мембраны, лизис клетки.

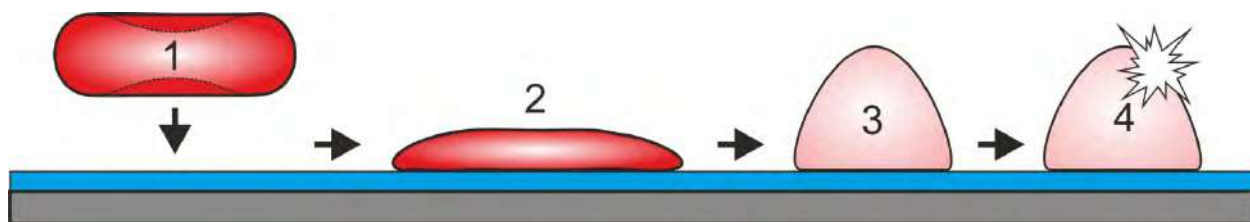


Рисунок 5 - Предполагаемый механизм трансформации эритроцитов при сильном адгезионном взаимодействии с полилизиновой подложкой

Глава 5 посвящена изучению эндотелиальных клеток (ЭК) мышей. АСМ может способствовать выявлению вкладов различных белковых молекул в механические характеристики ЭК. Одной из таких молекул является киназа легких цепей миозина (КЛЦМ210), которая способна активировать основной моторный белок клетки – немышечный миозин II типа. Влияние КЛЦМ210 на механические свойства ЭК пока изучены слабо, поэтому необходимы дополнительные исследования, проясняющие роль данного белка в регуляции механических свойств эндотелиоцитов.

ЭК микрососудов мышечных легких, культивируемая на желатине, имеет высокое ядро и тонкую периферию (рисунок 5). Измерения механических характеристик тонких периферийных областей ЭК с помощью АСМ осложнены близостью твердой подложки. В силу протяженных латеральных размеров и склонности клеток к агрегации (рисунок 6) надежное выравнивание при обработке АСМ изображений (и, соответственно, определение высоты клеток) затруднено, что не позволяет применить поправку Чедвика [7].

Следует отметить, что тонкая периферия (дистальные области) ЭК представляет особый интерес при исследовании механических характеристик

эндотелия, т.к. ее свойства определяют качество контактов между клетками и целостность эндотелиального монослоя.



Рисунок 5 - Схематичное изображение культивированной на подложке ЭК, поясняющее специфику зондирования ее периферии.

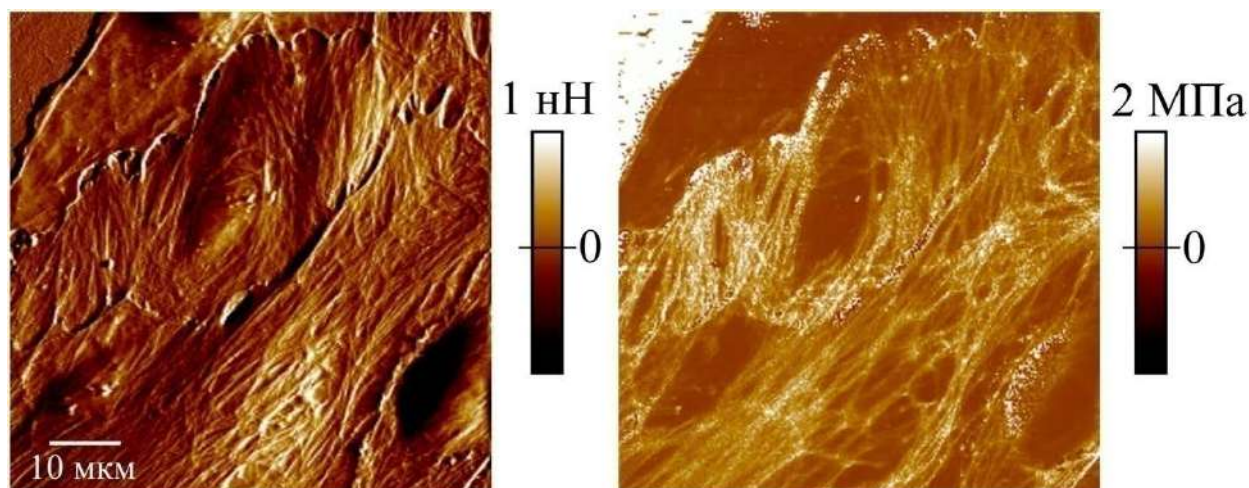


Рисунок 6 - АСМ изображения а) сигнала ошибки обратной связи б) модуля Юнга скопления нативных ЭК.

Вклад различных белков, в частности КЛЦМ210, в механические свойства эндотелия можно изучать по различиям в упругой реакции дистальных областей нативных ЭК при добавлении веществ, регулирующих активность этих белков. Однако малая толщина объекта исследования на твердой подложке может помешать регистрации изменений механических свойств ЭК. Для проверки влияния твердой подложки на измеряемые с помощью АСМ возмущения механических характеристик ЭК, мы воздействовали на ЭК латрункулином В (150 нМ), нокодазолом (7 мкМ) и блеббистатином (8 мкМ) – веществами, ингибирующими отдельные составляющие цитоскелета (актиновые микрофиламенты, тубулиновые микротрубочки) и активность главного моторного белка (немышечного миозина II типа) соответственно. Эти субстанции известным образом влияют на жесткость цитоскелета клеток, в том числе и эндотелия [4, 10, 11].

Мы измеряли модуль Юнга ЭК и сравнивали результаты у контрольных и обработанных указанными веществами объектов. Действие специфических ингибиторов на ЭК анализировалось по вариациям модуля Юнга клеток, определенному на тонкой (~100 нм) периферии и над высоким (~1 мкм) ядром. Полученные средние медианные значения модуля упругости периферии и ядра ЭК представлены в таблице 1. Отметим, что значение параметра над ядром при добавлении латрункулина В достоверно определить не удалось.

Таблица 1 Измеренные средние медианные значения модуля Юнга ЭК.

Тип эксперимента	Периферия	Ядерная область
ЭК без воздействия	140 ± 110 кПа (n = 26)	60 ± 40 кПа (n = 28)
ЭК + латрункулин В	60 ± 60 кПа (n = 8)	–
ЭК + нокодазол	70 ± 60 кПа (n = 25)	100 ± 70 кПа (n = 22)
ЭК + блеббистатин	90 ± 70 кПа (n = 8)	50 ± 30 кПа (n = 9)

Оценка значимости различий значений модуля Юнга контрольных и обработанных веществами-ингибиторами ЭК производилась с помощью U-критерия Манна-Уитни. Значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными ЭК наблюдались на периферии эндотелиоцитов при добавлении латрункулина В ($p = 0,017$) и нокодазола ($p = 0,003$). Обработка блеббистатином не приводила к статистически значимому результату ($p = 0,188$). В ядерной области эндотелиоцитов ингибиторы тубулина и немышечного миозина II типа не вызывали статистически значимых изменений значений модуля упругости ($p = 0,081$ и $p = 0,230$ для нокодазола и блеббистатина соответственно).

Предположим, что в измеренный модуль Юнга периферии контрольных ЭК определяющий вклад вносит твердая подложка. Тогда дезинтеграция жестких цитоскелетных структур – актиновых микрофиламентов и тубулиновых микротрубочек (с помощью латрункулина В и нокодазола соответственно) – либо не должна существенно сказываться на модуле упругости дистальных областей эндотелиоцитов, либо должна привести к их кажущемуся упрочнению из-за увеличения вклада от твердой подложки в измеряемые значения модуля Юнга. Мы при добавлении ингибиторов компонентов цитоскелета наблюдали размягчение удаленных от центра районов ЭК. Это доказывает, что близость твердой подложки не играет ключевой роли при определении вариаций модуля Юнга периферии эндотелиоцитов, так как не скрывает уменьшение модуля упругости под действием специфических ингибиторов цитоскелета.

Интересна реакция ядерной области нативных эндотелиоцитов на обработку нокодазолом. Величина модуля Юнга над ядром не только не уменьшилась, но даже выросла в $\approx 1,5$ раза. Такой эффект можно объяснить тем, что нокадозол способен стимулировать полимеризацию актина [11].

В **шестой главе** представлены результаты исследования действия веществ с анальгетическим эффектом – убаина и коеновой кислоты [12, 13] на нативные сенсорные (ответственные за передачу болевых импульсов) нейроны куриных эмбрионов. Действие убаина (концентрация 10^{-10} М) изучалось на клетках, культивированных на двух типах подложки – полилизиновой и коллаген-фибронектиновой, влияние коеновой кислоты (10^{-8} М) оценивалось только на полилизине.

Типичный набор АСМ данных для характеристики прикрепленных к полилизину нервных клеток, представлен на рисунке 7. Измерялись геометрические и механические характеристики сомы (тела) клеток: длина, максимальная высота, распределение модуля упругости и его среднее значение.

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

Модули Юнга сенсорных нейронов на полилизине были очень близки в контроле и после воздействия коеновой кислотой: 120 ± 100 кПа ($n = 21$) и 120 ± 90 кПа ($n = 30$) соответственно. Тогда как, нервные клетки, культивированные в присутствии убаина, демонстрировали более высокий средний модуль упругости – 170 ± 110 кПа ($n = 15$). Следует отметить, что ни после действия коеновой кислоты, ни убаина по U-критерию Манна-Уитни модули Юнга сенсорных нейронов статистически значимо не отличались от значений данного параметра у контрольных клеток ($p = 0,95$ и $p = 0,08$ соответственно).

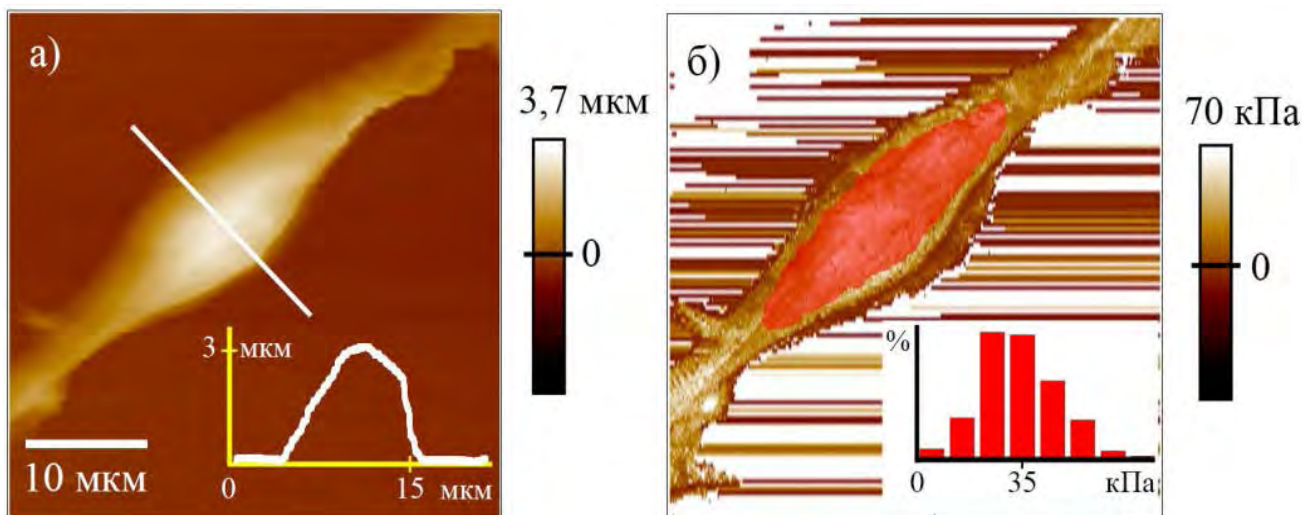


Рис. 7 АСМ а) топография нейрона б) карта распределения модуля Юнга.

Хотя тест по U-критерию Манна-Уитни не подтвердил статистическую значимость различий между контрольными нейронами и клетками после воздействия убаином, тенденция к упрочнению клеток наблюдалась в двух независимых сериях экспериментов на разных типах подложки – полилизиновой и коллаген-фибронектиновой. В первом случае, отношение средних значений модуля Юнга нейронов культивируемых в присутствии убаина и контроле равнялось $\approx 1,5$, а во втором – $\approx 1,3$. Меньшая разница в соотношении на подложке из коллагена с фибронектином может быть связана с не достаточно надежным закреплением нейронов и откреплении многих клеток от подложки при АСМ сканировании.

Средние модули упругости нейронов на коллаген-фибронектиновой и полилизиновой подложках отличались в несколько раз и составили 30 ± 20 кПа и 120 ± 90 кПа соответственно. Кроме разных типов подложки в экспериментах использовались неодинаковые модели зондовых датчиков. Чтобы проверить

зависимость измеренного модуля Юнга от характеристик зонда, мы сканировали нативные сенсорные нейроны на полилизинной подложке кантилеверами разных моделей: Bruker SNL-(D) и DNP-(C), а также AppNano Nitra-Tall-V-G-(A).

Согласно полученным АСМ данным (рисунок 8 а), использование кантилеверов с отличающимися характеристиками приводит как к различию в положении пиков, так и неодинаковой дисперсии модуля Юнга.

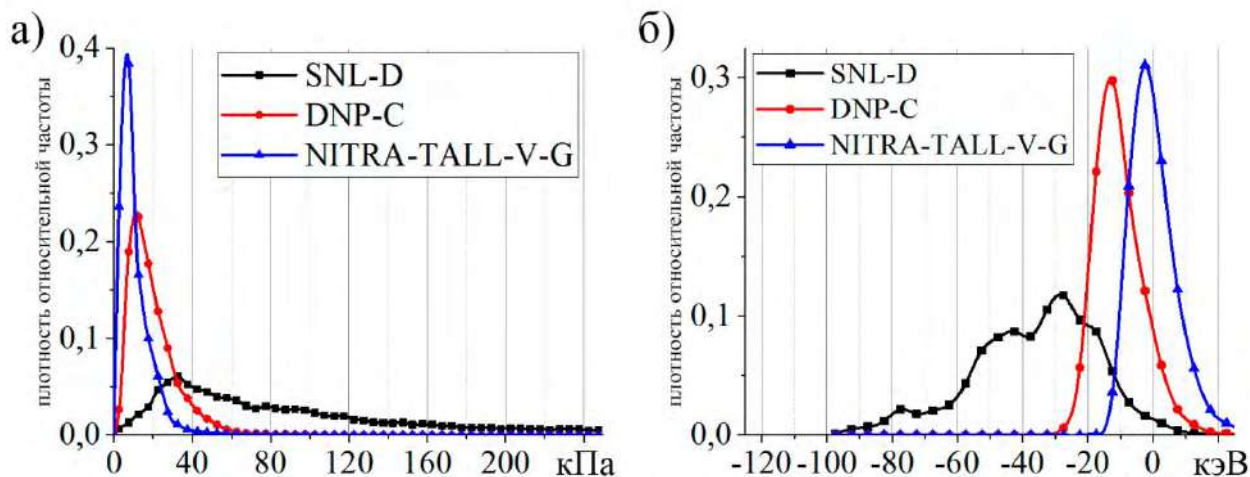


Рисунок 8 - а) Средние распределения модуля Юнга по some сенсорных нейронах на полилизине при зондировании клеток разными типами зондов б) гистограмма диссипации энергии ($n_{\text{SNL-(D)}} = 30$, $n_{\text{DNP-(C)}} = 18$, $n_{\text{NITRA}} = 21$)

Полученный результат можно объяснить, если рассмотреть диссипацию энергии при взаимодействии зонд-клетка (рисунок 8 б). Диссипация в АСМ соответствует площади фигуры, ограниченной кривыми подвода и отвода зонда при индентировании образца. На рисунке 8 б видно, что зонды SNL-(D); DNP-(C) и NITRA-TALL-V-G-(A) демонстрируют различную среднюю диссипацию энергии. Из всех зондов SNL-(D) сопровождается наибольшей по модулю диссипацией. Кроме того, если гистограммы для DNP-(C) и NITRA-TALL-V-G-(A) имеют форму, близкую к нормальному распределению, то распределение для SNL-(D) асимметрично и характеризуется несколькими пиками. Важно добавить, что пик гистограммы для NITRA-TALL-V-G-(A) почти совпадает с нулем, что также говорит о практически упругом взаимодействии, в среднем, и минимально возмущающих клетку измерениях.

Из вышесказанного следует, что для повышения достоверности измерения модуля Юнга клеток, как минимум, необходимо использовать зонды одного типа. В нашей работе сравнение значений модуля упругости групп нейронов после воздействия убаином или коеновой кислотой с контрольными клетками осуществлялось только для данных, полученных кантилеверами одной модели.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы работы:

1. Показано, что измеряемые в режиме PeakForce QNM значения контактной жесткости точнее характеризуют механические свойства нативных фибробластов сердечной ткани куриных эмбрионов, чем величины модуля

Юнга, определенные по моделям Снеддона и ДМТ для стандартных острых и субмикронных сферических зондов соответственно.

2. Разработана АСМ методика для обнаружения неоднородности механических свойств наружных слоев клеток. Она заключается в зондировании нативных объектов двумя типами зондов с субмикронным кончиком (пирамидальным и сферическим) и использовании значений контактной жесткости для количественной характеристики механических свойств клеток. Применение этой методики для исследования фибробластов сердечной ткани показало, что внешние слои этих клеток ведут себя как жесткая по отношению к цитоплазме оболочка.

3. С помощью АСМ в режиме количественной наномеханики обнаружено, что на полилизиновой подложке у нефиксированных крысиных эритроцитов дополнительное натяжение плазматической мембраны, вызванное продолжительным по времени контактом с подложкой, не нарушая целостности объектов, приводит к набуханию клеток и, как минимум, к 3-х кратному увеличению их модуля Юнга.

4. Доказано, что близость твердой подложки не препятствует АСМ детектированию в квазистатическом режиме изменений модуля Юнга цитоскелета дистальных областей микрососудистого эндотелия мышечных легких толщиной ~100 нм (сопоставимой с глубиной индентирования), возникающих под действием специфических ингибиторов основных компонентов цитоскелета (актина, тубулина). Обработка ингибиторами проявлялась в достоверно зарегистрированном размягчении тонкой периферии клеток.

5. Адаптированная АСМ методика измерений модуля Юнга позволила при миллисекундных временах индентирования детектировать отклик нативных сенсорных нейронов при контакте с полилизин или фибронектином на вещество с анальгетическим эффектом – убаин: добавление субстанции привело к увеличению твердости сомы этих клеток в 1,3–1,5 раза. Показано также, что другое вещество с анальгетическим действием – коленовая кислота не меняет твердости сенсорных нейронов.

6. Обнаружено существенное расхождение средних значений модуля Юнга сенсорных нейронов куриных эмбрионов при измерении в квазистатическом режиме АСМ стандартными кантилеверами различных типов. Результат наглядно проявляет важность сохранения неизменной геометрии кантилевера при накоплении статистических данных измерений модуля Юнга клеток выбранного типа.

Цитируемая литература:

1. Няпшаев И.А., Анкудинов А.В., Стовпяга А.В., Трофимова Е.Ю., Еропкин М.Ю. Диагностика живых клеток в атомно-силовом микроскопе, используя субмикронный сферический зонд калиброванного радиуса кривизны // Журнал технической физики. 2012. Т. 82 № 10. С. 109–116.
2. Sneddon I. The Relation Between Load and Penetration in the Axi-Symmetric Boussinesq Problem for a Punch of Arbitrary Profile // Int. J. Engng. Sci. 1965. V. 3. P. 47–57.

3. Derjaguin B.V., Muller V.M., Toporov Yu.P. Effect of contact deformations on the adhesion of particles // J. Colloid. Interface Sci. 1975. V. 53(2). P. 314–326.
4. Rotsch C., Radmacher M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study // Biophys. J., 2000. V. 78(1). P. 520–535.
5. Kuznetsova T.G., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. et al. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // Micron. 2007. V. 38. P. 824–833.
6. Dimitriadis E.K., Horkay F., Maresca J., Kachar B. and Chadwick R.S. Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope // Biophysical Journal. 2002. V. 82. P. 2798–2810.
7. Gavara N., Chadwick R.S. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips // Nature Nanotechnology. 2012. V. 7(11). P. 733–736.
8. Mazia D., Schatten G., Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to Electron Microscopy // Journal of Cell Biology. 1975. V.66(9). P. 198–200.
9. Hategan A., Law R., Kahn S., Discher D.E. Adhesively-Tensed Cell Membranes: Lysis Kinetics and Atomic Force Microscopy Probing // Biophys. J. 2003. V. 85(4). P. 2746–2759.
10. Martens J.C., Radmacher M. Softening of the actin cytoskeleton by inhibition of myosin II // Pflugers Arch. 2008. V. 456(1). P. 95–100.
11. Pesen D., Hoh J.H. Micromechanical Architecture of the Endothelial Cell Cortex // Biophys J. 2005. V. 88(1). P. 670–679.
12. Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V. Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na⁺,K⁺-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief // Med. Chem. 2012. V. 8(1). P. 33–39.
13. Plakhova V., Rogachevsky I., Lopatina E., Shelykh T., Butkevich I., Mikhailenko V., Otellin V., Podzorova S., Krylov B. A novel mechanism of modulation of slow sodium channels: from ligand-receptor interaction to design of an analgesic medicine // *Activitas Nervosa Superior Rediviva*. 2014. V. 56(3-4). P. 55–64.

Публикации автора по теме исследования:

Статьи в научных журналах, включенных в перечень ВАК.

1. Khalisov, M.M. Application of atomic force microscopy for investigation of Na⁺,K⁺-ATPase signal-transducing function / M.M. Khalisov, A.V. Ankudinov, V.A. Penniyaynen, D. Dobrota, B.V. Krylov // *Acta Physiologica Hungarica*. – 2015. – Vol. 102, N. 2. – P. 125–130.

2. Анкудинов, А.В. Применение атомно-силовой микроскопии для исследования процессов внутриклеточной сигнализации в нейронах / А.В. Анкудинов, М.М. Халисов, В.А. Пеннийнен, С.А. Подзорова, Б.В. Крылов // ЖТФ. – 2015. – Т. 85, № 10. – С. 126–130.
3. Халисов, М.М. Атомно-силовая микроскопия набухания и упрочнения закрепленных на подложке интактных эритроцитов / М.М. Халисов, К.И. Тимощук, А.В. Анкудинов, Т.Е. Тимошенко // ЖТФ. – 2017. – Т. 87, № 2. – С. 282–285.
4. Халисов, М.М. Особенности рецептор- и трансдуктор-опосредованной активации внутриклеточных сигнальных каскадов в сенсорном нейроне, выявленные с помощью метода атомно-силовой микроскопии / М.М. Халисов, В.А. Пеннийнен, Н.А. Есикова, А.В. Анкудинов, Б.В. Крылов // Письма в ЖТФ. – 2017. – Т. 43, № 1. – С. 89–94.
5. Халисов, М.М. Атомно-силовая микроскопия устройства поверхностных слоев интактных фибробластов / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов, В.А. Пеннийнен, И.А. Няпшаев, А.В. Кипенко, К.И. Тимощук, С.А. Подзорова, Б.В. Крылов // Письма в ЖТФ. – 2017. – Т. 43, № 4. – С. 56–63.

Другие публикации.

1. Тимошенко, Т.Е. Исследование структурно-механических свойств эритроцитов при нормо- и гипоксии средствами атомно-силовой микроскопии / Т.Е. Тимошенко, М.М. Халисов, А.В. Анкудинов // Сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». – СПб-Колтуши, 2014. – С. 136.
2. Халисов, М.М. Исследование геометрии и упругости живых клеток в режиме атомно-силовой микроскопии PeakForce QNM / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов, Т.Е. Тимошенко, В.А. Пеннийнен // Сборник тезисов IX Международной конференции «Аморфные и микрокристаллические полупроводники». – СПб, 2014. – С. 375–376.
3. Халисов, М.М. Изучение сенсорных нейронов с помощью режима PeakForce QNM атомно-силовой микроскопии / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов, В.А. Пеннийнен // Сборник статей седьмой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». – СПб, 2014. – С. 106–112.
4. Халисов, М.М. Механические и топографические портреты различных видов живых клеток, полученные в атомно-силовом микроскопе / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов // Труды VII всероссийской школы-семинара студентов, аспирантов и молодых ученых по направлению «Диагностика наноматериалов и наноструктур». – Рязань, 2014. – С. 242–246.
5. Халисов, М.М. Исследование действия уабаина на сенсорные нейроны с помощью режима PeakForce QNM атомно-силовой микроскопии / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов // Сборник тезисов докладов IV Всероссийского конгресса молодых ученых Университета ИТМО. – СПб, 2015.

6. Тимощук, К.И. Исследование корреляции формы, упругих и оптических свойств живых эритроцитов / К.И. Тимощук, М.М. Халисов, А.В. Анкудинов // Сборник тезисов докладов IV Всероссийского конгресса молодых ученых Университета ИТМО. – СПб, 2015.
7. Самсонов, М.В. Высокомолекулярная киназа легких цепей миозина участвует в регуляции упругости кортикальной цитоплазмы эндотелия микрососудов легких мыши / М.В. Самсонов, М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, А.В. Анкудинов, В.П. Ширинский // Материалы докладов V съезда биофизиков России, Т. 1. – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 238.
8. Халисов, М.М. Наблюдение методом атомно-силовой микроскопии упрочнения эритроцитов на подложке с сильной адгезией / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов, К.И. Тимощук, Т.Е. Тимошенко // Сборник статей XX международной научно-практической конференции "Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике". – СПб, 2015. – С. 164–167.
9. Халисов, М.М. Особенности механических и геометрических свойств живых эритроцитов, закрепленных на полилизинной подложке / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов // Сборник тезисов докладов V Всероссийского конгресса молодых ученых Университета ИТМО. – СПб, 2016.
10. Shirinsky, V.P. Spatiotemporal activity profiling of key myosin regulators in endothelial cells with regard to control of cell stiffness and barrier dysfunction / V.P. Shirinsky, O.A. Kazakova, M.V. Samsonov, M.M. Khalisov, A.Yu. Khapchaev, V.A. Penniyaynen, A.V. Ankudinov, B.V. Krylov // Abstract book of Russian conference with international participation "Experimental and computational biomedicine". – Ekaterinburg, 2016. – P. 53.
11. Samsonov, M.V. The role of 210 kda myosin light chain kinase and RHOA-activated protein kinase in control of microvascular endothelial cell stiffness / M.V. Samsonov, M.M. Khalisov, A.Yu. Khapchaev, V.A. Penniyaynen, A.V. Ankudinov, B.V. Krylov, V.P. Shirinsky // Materials of International Symposium "Biological motility". – Pushchino, 2016. – P. 208–209.
12. Samsonov, M.V. Effects of disease-related aldehydes on endothelial cells: a comparative study and probing possible molecular mechanisms / M.V. Samsonov, M.M. Khalisov, A.Yu. Khapchaev, A.V. Vorotnikov, V.A. Penniyaynen, A.V. Ankudinov, B.V. Krylov, V.Z. Lankin, V.P. Shirinsky // Materials of International Symposium "Biological motility". – Pushchino, 2016. – P. 209–211.
13. Халисов, М.М. Форма и модуль Юнга неподвижных интактных эритроцитов / М.М. Халисов, К.И. Тимощук, А.В. Анкудинов, Т.Е. Тимошенко // Тезисы докладов Первой российской конференции "Физика - наукам о жизни" ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН. – СПб, 2016. – С. 72.
14. Халисов, М.М. Исследование реакции живых нейронов на неопиоидный анальгетик посредством атомно-силовой микроскопии / М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, А.В. Анкудинов, Б.В. Крылов // Тезисы докладов Первой российской конференции "Физика - наукам о жизни" ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН. – СПб, 2016. – С. 53.

15. Тимощук, К.И. Изучение рельефа и механических свойств живых эритроцитов методами АСМ / К.И. Тимощук, М.М. Халисов, А.В. Анкудинов, Т.И. Тимошенко // Труды XXI Международного симпозиума "Нанопластика и наноэлектроника" Т. 1. – Нижний Новгород, 2017. – С. 337–338.
16. Халисов, М.М. Особенность устройства иммобилизованных на подложке живых фибробластов, выявленная с помощью атомно-силовой микроскопии / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов // Труды XXI Международного симпозиума "Нанопластика и наноэлектроника" Т. 1. – Нижний Новгород, 2017. – С. 345–346.
17. Халисов, М.М. Особенности реакции живых клеток на внешние воздействия, зарегистрированные в квазистатическом режиме атомно-силовой микроскопии / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов // Scanning Probe Microscopy. Abstract Book of International Conference. – Ekaterinburg, 2017. – P. 91–92.
18. Ширинский, В.П. Механобиология сосудистого эндотелия / В.П. Ширинский, М.В. Самсонов, М.М. Халисов, А.Ю. Хапчаев, В.А. Пенниайнен, А.В. Анкудинов // Тезисы докладов Второй российской конференции с международным участием "Физика - наукам о жизни". – СПб, 2017. – С. 22.
19. Халисов, М.М. Нанозондирование подверженных действию лекарственных препаратов нативных клеток *in vitro* / М.М. Халисов, А.В. Анкудинов, В.А. Пенниайнен, М.В. Самсонов, Т.Е. Тимошенко, В.П. Ширинский, Б.В. Крылов // Тезисы докладов Второй российской конференции с международным участием "Физика - наукам о жизни". – СПб, 2017. – С. 59.

Благодарности

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

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

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