

05;14

## **Эффект длины зонда на кантилере атомно-силового микроскопа в измерениях механических свойств нативных нейронов**

© А.В. Анкудинов<sup>1,2</sup>, М.М. Халисов<sup>2,3</sup>, В.А. Пеннийнен<sup>3</sup>,  
С.А. Подзорова<sup>3</sup>, К.И. Тимощук<sup>2,3</sup>, Б.В. Крылов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: alexander.ankudinov@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 20 апреля 2018 г.

Методом атомно-силовой микроскопии в режиме PeakForce QNM в условиях, приближенных к физиологическим, исследовались нативные сенсорные нейроны. Выявлена зависимость измеряемого кажущегося модуля Юнга клеток от отношения высоты зонда к длине консоли используемого кантилера. Дано качественное объяснение полученного результата, опирающееся на анализ деформаций консоли в двух крайних случаях: зонд скользит по объекту исследования, зонд защемлен последним. Предложено классифицировать нативные клетки по преобладающему характеру взаимодействия с зондом (скольжение или залипание).

DOI: 10.21883/PJTF.2018.15.46438.17351

Привлекательным приложением атомно-силовой микроскопии (АСМ) становятся исследования механических свойств, главным образом модуля Юнга, нативных клеток [1,2]. Представляет большой интерес определение влияния на клетку различных фармакологических веществ [3–5]. Недавно с помощью АСМ изучалось действие на нативные сенсорные нейроны веществ с анальгетическим эффектом. Был выявлен примерно полуторакратный рост модуля Юнга у исследуемых клеток при введении в культуральную среду уабаина [6,7]. У нейронов,

культивируемых на разных подложках — поли-L-лизиновой и коллаген-фибронектиновой, с помощью кантилеров Bruker SNL-(D) и SNL-(C) соответственно наблюдалась одинаковая реакция на убаин. Однако абсолютные значения средних модулей Юнга у однотипных клеток расходились в этих двух случаях почти в 4 раза, что связывалось с вероятным влиянием на механические свойства клеток химического состава используемых подложек [7,8]. Возможная роль характеристик используемого кантилера в таком расхождении не рассматривалась. Настоящая работа посвящена выяснению роли характеристик кантилера в АСМ-измерениях модуля Юнга нативных клеток.

Исследовались нативные сенсорные нейроны 10–12-дневных куриных эмбрионов. Извлеченные из областей L5-S1 ганглии спинного мозга пипетировали в растворе Хенкса для получения суспензии клеток. Культивирование нейронов осуществлялось в питательной среде: раствор Хенкса — 45%, среда Игла — 40%, фетальная бычья сыворотка — 15%, инсулин — 0.5 U/ml, глюкоза — 0.6%, глутамин — 2 mM, гентамицин — 100 U/ml, фактор роста нервов 7S — 10 ng/ml (Sigma, США). Питательная среда добавлялась к полученной клеточной суспензии для получения желаемой плотности клеток в пластиковой чашке Петри. Нейрональные клетки удаляли, позволяя им оседать на поверхности пластика 90-миллиметровой чашки Петри в течение 25 min при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония), в то время как оставшиеся клетки (в основном нейроны) культивировали на покрытых поли-L-лизином поверхностях 40-миллиметровых чашек Петри в течение трех суток при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

Сенсорные нейроны в питательной среде исследовались с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Catalyst (Bruker, США), интегрированного в оптический микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). АСМ-эксперименты проводились при температуре 37°C, которая поддерживалась с помощью термодатчика Model 335 (Lake Shore Cryotronics, США). Применялось три типа кантилеров: SNL-(D) и DNP-(C) (Bruker, США), NITRA-TALL-V-G-(A) (AppNano, США) (см. таблицу).

Измерения проводились в АСМ-режиме PeakForce QNM со следующими параметрами сканирования: частота строчной развертки 0.10–0.15 Hz, пиковая сила 1 nN, частота и амплитуда вертикального зондирования 0.25 kHz и 1 μm соответственно. Особенность режима заключается в поточечном измерении силовых, индентационных кривых и

Характеристики кантилеверов [9,10], использованных в АСМ-измерениях, и кажущиеся средние модули Юнга  $E$  сенсорных нейронов на поли-L-лизиновой подложке ( $k_C$  — жесткость консоли,  $l_C$  — длина консоли,  $l_T$  — высота зонда,  $r$  — радиус кончика зонда)

Параметр	Марка			
	SNL-(D)	SNL-(C)	DNP-(C)	NITRA-TALL-V-G-(A)
$k_C$ , N/m	0.03–0.12 (0.07*)	0.12–0.48 (0.32*)	0.12–0.48 (0.25*)	0.08–0.32 (0.21*)
$l_C$ , $\mu\text{m}$	200–210	115–125	115–125	95–115
$l_T$ , $\mu\text{m}$	2.5–8.0(4**)	2.5–8.0(4**)	2.5–8.0(5**)	14–16(15**)
$r$ , nm	2–12	2–12	20	< 30
Материал зонда	Кремний	Кремний	Нитрид кремния	Нитрид кремния
$E$ , kPa	115	31***	22	11

\* Среднее значение жесткости кантилевера, измеренное методом тепловых шумов.

\*\* Средняя высота зонда, измеренная в оптическом микроскопе через объектив с  $NA = 0.9$ .

\*\*\* Среднее значение кажущегося модуля Юнга сенсорных нейронов на коллаген-фибронектиновой подложке [6].

последующей автоматической обработке получаемого массива данных. Силовые кривые анализировались в рамках модели Снеддона [11] с помощью зависимости

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

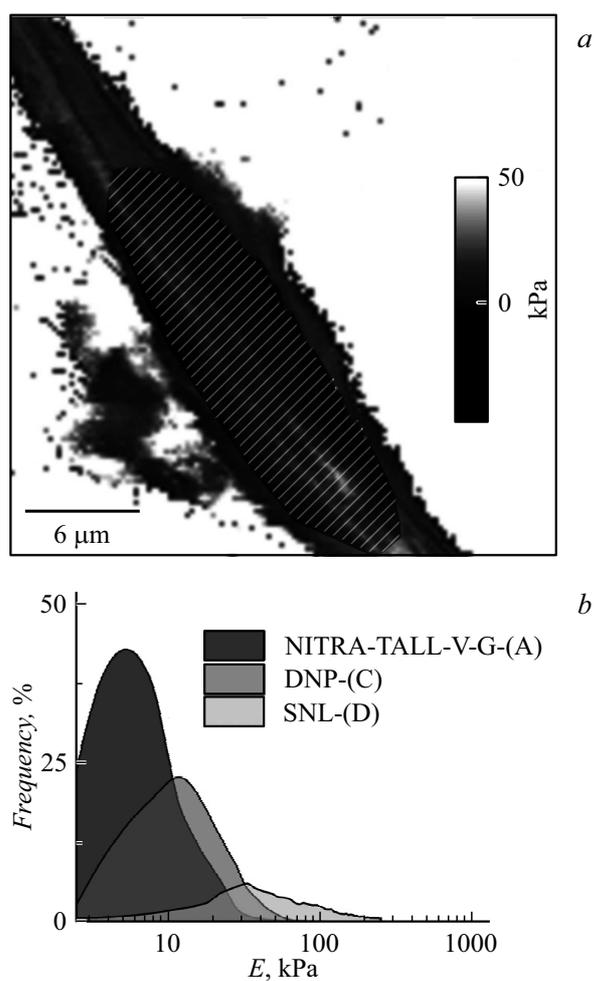
где  $F$  — сила взаимодействия зонд–образец,  $\nu$  — коэффициент Пуассона ( $\nu = 0.5$ ),  $\theta = 18^\circ$  — полуугол раствора конуса, аппроксимирующего пирамидальную форму зонда,  $\delta$  — глубина деформации. Значение  $E$ , оптимизирующее подгонку кривой (1) к эксперименту, соответствует кажущемуся модулю Юнга [12]. 2D-карта значений  $E$  на участке подложки с сенсорным нейроном изображена на рис. 1, а. Из области изображения, соответствующей соме клетки, извлекался массив данных, который преобразовывался в частотное распределение параметра с шагом 5 кПа. Результаты, полученные с помощью разных кантилеверов, сравнивались по средним распределениям кажущегося модуля Юнга по выборкам клеток.

Данные исследования нативных сенсорных нейронов при применении АСМ-кантилеров трех типов анализируются на рис. 1, *b*. Видно, что значения кажущихся модулей Юнга не совпадают. Положения пиков распределения параметра  $E$  для кантилеров Bruker SNL-(D), DNP-(C) и AppNano NITRA-TALL-V-G-(A) приходятся на 32, 12 и 7 кПа; средние значения  $115 \pm 90$ ,  $22 \pm 10$  и  $11 \pm 7$  кПа соответственно (см. таблицу).

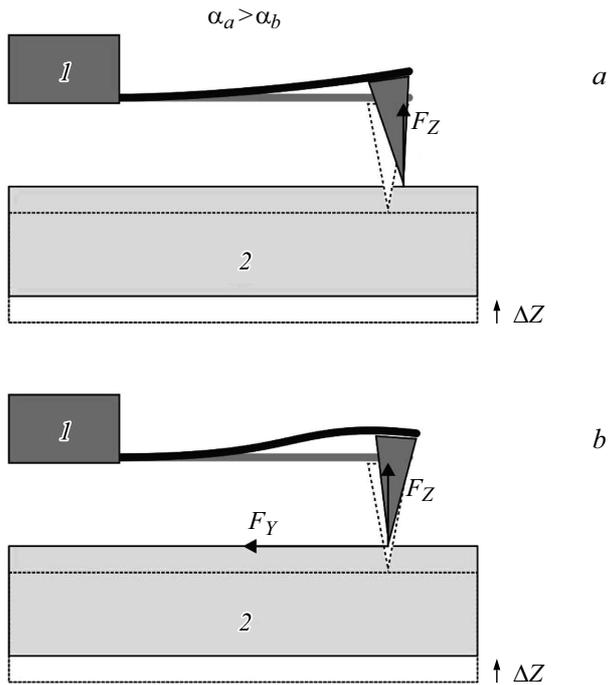
Данные рис. 1 достоверно демонстрируют несовпадение средних значений  $E$ , полученных с помощью кантилеров трех типов.  $U$ -критерий Манна–Уитни подтвердил значимость различий (у любой из трех возможных пар статистическая разница  $p < 0.01$ ).

В таблице сопоставлены характеристики использованного кантилера с измеренным с его помощью результатом. Например, нет явной корреляции величины  $E$  с материалом зонда и с жесткостью консоли. Можно заметить, что значение  $E$  больше у острых зондов. Эта связь могла бы быть важной, если бы индентирование проводилось на глубину меньше радиуса кривизны. В наших же измерениях глубина составляла несколько сотен нанометров, и площадь контакта практически не зависела от остроты кончика. Это обосновывало вычисления модуля Юнга по формуле (1), в которую радиус кривизны не входит. Наиболее существенной представляется зависимость величины  $E$  от отношения длины консоли к высоте зонда. Приведем объяснение этой зависимости.

Как в большинстве современных атомно-силовых микроскопов, в Bruker BioScope Catalyst использована система оптического рычага [13], следящая не за смещениями зонда, а за углами отклонения (изгиба или кручения) консоли, несущей зонд. Поскольку углов два, все три компоненты вектора смещения зонда или силы взаимодействия не определяются однозначно [14,15], что усложняет интерпретацию измерений. Рис. 2 иллюстрирует два крайних случая реакции кантилера на поднятие образца: трения нет, зонд скользит по образцу, консоль изгибается, угол отклонения монотонно растет от точки закрепления к концу консоли (рис. 2, *a*); трение есть, зонд защемился на образце, консоль прогибается, угол отклонения в начале растет, а в конце убывает (рис. 2, *b*). Защемление зонда приводит к меньшим углам отклонения конца консоли, чем его скольжение при таком же поднятии образца. Из-за этого регулируемый системой обратной связи АСМ угол отклонения консоли будет при защемлении зонда достигаться при большем перемещении и, как следствие, большей деформации образца,



**Рис. 1.** *a* — АСМ-карта параметра  $E$  на участке подложки с нативным сенсорным нейроном, заштрихована область выборки — сома клетки; *b* — распределение средних значений  $E$  по соматическим нейронам при применении кантилеверов NITRA-TALL-V-G-(A), DNP-(C) и SNL-(D). В каждом случае исследовано  $n = 21, 18$  и  $30$  нейронов соответственно.



**Рис. 2.** Качественное объяснение результатов измерений. Деформация консоли кантилевера при поднятии образца на высоту  $\Delta Z$ : *a* — в условиях скользящего контакта (трения нет, действует только нормальная сила  $F_Z$ ), угол изгиба на конце консоли  $\alpha_a$ ; *b* — заостренный зонд зашел в образец (добавилась латеральная сила  $F_Y$ ), угол прогиба на конце консоли  $\alpha_b$ . *1* — чип с кантилевером, *2* — образец.

чем при скольжении. Другими словами, образец будет казаться мягче, чем при скольжении.

Угол отклонения конца консоли связан с силой противодействия, лежащей в плоскости рис. 2, следующим образом [16]:

$$\alpha = \frac{3}{2l_C k_C} (F_Z - 2\lambda F_Y) = \frac{3F_Z}{2l_C k_C} (1 - 2\mu\lambda), \quad (2)$$

где  $\lambda = l_T/l_C$  — отношение высоты зонда к длине консоли,  $k_C$  — коэффициент жесткости кантилевера,  $\mu$  — отношение латеральной

компоненты силы к нормальной. Если зонд не скользит по поверхности образца ( $\mu > 0$ ), то, согласно (2), угол  $\alpha$  убывает с ростом  $\lambda$ . Поэтому чем больше  $\lambda$  кантилевера, тем ниже значение  $\alpha$  и, как следствие, контактная жесткость и кажущийся модуль Юнга образца. Качественно именно это и наблюдается в эксперименте (см. таблицу). Возможен и количественный анализ, учитывающий угол наклона чипа с кантилевером (в использованной АСМ-системе он равен  $12^\circ$ ) и значения нормальной и латеральной жесткости контакта зонда с образцом. Его изложение имеет уточняющий характер и выходит за рамки представляемого краткого сообщения. Необходимо добавить, что отмеченное выше почти четырехкратное уменьшение кажущегося модуля Юнга нейронов, весьма вероятно, было вызвано не разным химическим составом подложек, а двукратным ростом величины  $\lambda$  у кантилевера Bruker SNL-(C) по сравнению со значением для SNL-(D).

Таким образом, обнаружено, что измеряемый в АСМ-режиме PeakForce QNM кажущийся модуль Юнга  $E$  нативных клеток может зависеть от параметра  $\lambda$  — отношения высоты зонда к длине консоли используемого кантилевера. Для сенсорных нейронов  $E$  уменьшается с ростом  $\lambda$ , что указывает на залипание зонда на клетке при получении силовых кривых. Если зонд скользит по объекту, то вклад от  $\lambda$  мал, и  $E$  может служить количественным параметром. Если нет, то, изучая с помощью АСМ роль различных факторов в механических свойствах нативных клеток, необходимо не менять марку кантилевера. В заключение важно отметить, что, исследуя зависимости  $E$  от  $\lambda$ , можно сортировать клетки по группам: липкие и скользкие по отношению к материалу зонда.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 64), а также РФФИ (грант № 18-015-00079).

## Список литературы

- [1] Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. // *Micron*. 2007. V. 38. N 8. P. 824–833.
- [2] Li M., Dang D., Liu L., Xi N., Wang Y. // *IEEE Trans Nanobiosci*. 2017. V. 16. N 6. P. 523–540.

- [3] *Rotsch C., Radmacher M.* // *Biophys. J.* 2000. V. 78. N 1. P. 520–535.
- [4] *Li M., Liu L.Q., Xi N., Wang Y.C.* // *Acta Pharmacol. Sin.* 2015. V. 36. N 7. P. 769–782.
- [5] *Hung M.-Sh., Tsai M.-F.* // *BioNanoSci.* 2015. V. 5. N 3. P. 156–161.
- [6] *Анкудинов А.В., Халисов М.М., Пенниайнен В.А., Подзорова С.А., Крылов Б.В.* // *ЖТФ.* 2015. Т. 85. В. 10. С. 126–130.
- [7] *Халисов М.М., Пенниайнен В.А., Есикова Н.А., Анкудинов А.В., Крылов Б.В.* // *Письма в ЖТФ.* 2017. Т. 43. В. 1. С. 89–94.
- [8] *Takai E., Costa K.D., Shaheen A., Hung C.T., Guo X.E.* // *Ann. Biomed. Eng.* 2005. V. 33. N 7. P. 963–971.
- [9] [www.brukerafmprobes.com](http://www.brukerafmprobes.com)
- [10] [www.appnano.com](http://www.appnano.com)
- [11] *Sneddon I.* // *Int. J. Eng. Sci.* 1965. V. 3. N 1. P. 47–57.
- [12] *Costa K.D., Yin F.C.* // *J. Biomech. Eng.* 1999. V. 121. N 5. P. 462–471.
- [13] *Meyer G., Amer N.M.* // *Appl. Phys. Lett.* 1988. V. 53. N 12. P. 1045–1047.
- [14] *Fujisawa S., Ohta M., Konishi T., Sugawara Y., Morita S.* // *Rev. Sci. Instrum.* 1994. V. 65. N 3. P. 644–647.
- [15] *Kawakatsu H., Bleuler H., Saito T., Hiroshi K.* // *Jpn. J. Appl. Phys.* 1995. V. 34. N 6B. P. 3400–3402.
- [16] *Sarid D.* *Exploring scanning probe microscopy with MATHEMATICA.* 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. Ch. 2. P. 46.