

14

Увеличение жесткости фибробластов вследствие фармакологической активации механочувствительных ионных каналов Piezo1

© М.М. Халисов¹, В.А. Пенниайнен¹, А.В. Беринцева¹, С.А. Подзорова¹, Г.Г. Зегря^{1,2}, Б.В. Крылов¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: khalisovmm@infran.ru

Поступило в Редакцию 5 июня 2025 г.

В окончательной редакции 16 сентября 2025 г.

Принято к публикации 17 сентября 2025 г.

Изучено влияние Jedi2, специфического фармакологического активатора механочувствительных ионных каналов Piezo1, на фибробласти сердца. Методом атомно-силовой микроскопии обнаружено, что Jedi2 в концентрации 10 μ M увеличивает жесткость клеток. Флуоресцентный анализ показал рост интенсивности флуоресценции F-актина в клетках при указанной концентрации Jedi2. По-видимому, Jedi2 в концентрации 10 μ M активирует Piezo1-опосредованные Ca^{2+} -зависимые сигнальные каскады, которые приводят к повышению уровня F-актина и, как следствие, увеличению жесткости клеток.

Ключевые слова: Piezo1, Jedi2, фибробласты, актин, атомно-силовая микроскопия.

DOI: 10.61011/PJTF.2026.02.62071.20398

В 2021 г. D. Julius и A. Patapoutian были награждены Нобелевской премией за открытие молекулярной структуры механочувствительных ионных каналов семейства Piezo (Piezo1 и Piezo2) [1]. Эти каналы модулируют ряд важнейших физиологических функций и представляют большой интерес при поиске потенциальной мишени для лекарственных средств, необходимых для коррекции возникающих патологий на организменном уровне, например, при сердечно-сосудистых заболеваниях, причем экспрессия этих каналов была подтверждена в клетках сердца, включая фибробласты [2,3].

Широкие возможности для исследования каналов Piezo1 открывает метод атомно-силовой микроскопии (ACM). В его основе лежит силовое взаимодействие между исследуемой поверхностью и закрепленным на конце упругой консоли зондом с нанометровым острием. Индентирование зондом атомно-силового микроскопа позволяет не только изучать механические свойства живых клеток, но и механически их стимулировать прецизионально контролируемой силой. Было показано, что фибробласты сердца при малых силах воздействия (1–5 nN) демонстрируют практически одинаковую жесткость, в то время как при больших силах (6–7 nN) жесткость повышается [4]. Такой результат можно объяснить тем, что достижение пороговой величины механического воздействия активирует процесс механотрансдукции, приводящий к увеличению жесткости фибробластов сердца, при меньших силах воздействия этот процесс не активируется. Таким образом, запуск механотрансдукции может вызывать изменение механических свойств клеток. Механические свойства клеток связаны с составом и организацией их цитоскелета [5]. Эффективно

исследовать различные компоненты цитоскелета дает возможность метод флуоресцентного анализа.

Механизм Piezo1-опосредованной механотрансдукции в фибробластах сердца пока остается малоизученным. Углублению понимания могут помочь исследования с привлечением веществ, специфических модуляторов активности этих каналов, например активатора Jedi2 [6]. В настоящей работе с помощью методов ACM и флуоресцентного окрашивания с последующим анализом было исследовано влияние активатора Jedi2 на механические свойства фибробластов сердца и содержание F-актина.

Диссоциированная культура фибробластов была получена из сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов *White Leghorn*. Контрольные фибробласти сердца культивировали в питательной среде, содержащей модифицированную методом Дульбекко среду Игла с низким содержанием глюкозы (1 g/l), 10 % фетальной сыворотки коровы и гентамицин (100 U/ml), в 40 mm чашках Петри в течение 5 суток при 36.5 °C и 5 % CO_2 [7]. Jedi2 добавляли к фибробластам в концентрациях 10 или 100 μ M непосредственно перед исследованием с помощью атомно-силового микроскопа. Для флуоресцентного анализа клетки культивировали в присутствии Jedi2 в тех же концентрациях в течение 3 h, так как ранее было показано, что при концентрации 10 μ M максимальное увеличение жесткости фибробластов достигается после 2–3 h воздействия Jedi2 [4].

Фибробласты сердца исследовались с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Catalyst (Bruker, США) в физиологически адекватных условиях: в питательной среде при температуре 37 °C. Для индентирования клеток применялись кантилеверы Bruker SNL-C

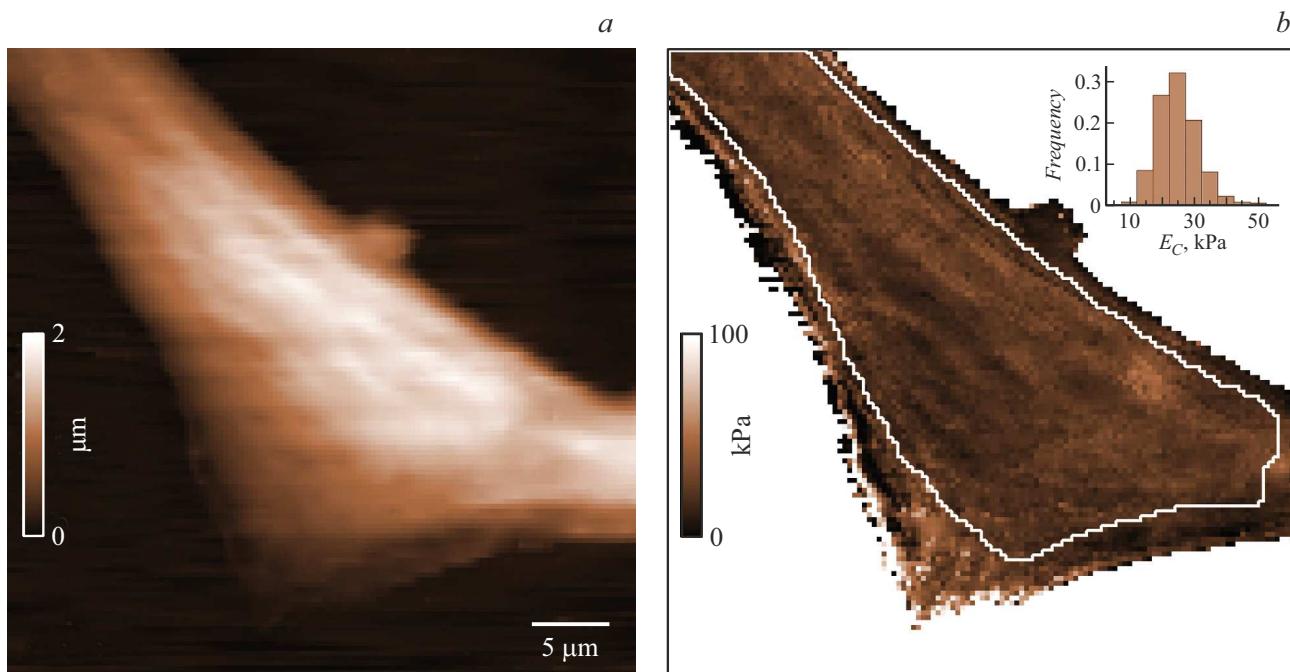


Рис. 1. ACM-изображения контрольного фибробlasta: топография рельефа поверхности (a) и карта кажущегося модуля Юнга E_C (b). Светлым контуром обозначена область анализа (на вставке — гистограмма распределения кажущегося модуля Юнга в рамках выделенной области анализа). Параметры ACM-сканирования: заданная величина силы 3 nN, амплитуда и частота вертикальных осцилляций зонда 1000 nm и 0.25 kHz соответственно, частота строчной развертки 0.15 Hz, размер кадра 128 × 128 точек.

с номинальным значением радиуса закругления зонда 2 nm. Константа жесткости кантилевера калибровалась с помощью метода анализа тепловых шумов [8]. Использовался режим работы ACM PeakForce QNM, который позволяет одновременно получать топографию рельефа поверхности клетки (рис. 1, a) и карту распределения кажущегося модуля Юнга (рис. 1, b). Картирование кажущегося модуля Юнга фибробластов производилось с использованием модели Снеддона (коническая форма зонда) [9]. Термин „кажущийся“ подчеркивает, что сигнал формально описывает индентационную силовую кривую [10]. Значения кажущегося модуля Юнга корректировались с целью учета влияния близости твердой подложки [11]. Все клетки визуализировали с постоянными параметрами сканирования (рис. 1).

Используя карты скорректированного кажущегося модуля Юнга E_C , каждый фибробласт характеризовали средним значением E_C . Для изучения влияния Jedi2 на механические свойства фибробластов проводили сравнение средних значений E_C клеток, подвергшихся воздействию исследуемого вещества, и контрольных фибробластов. Обработка ACM-изображений осуществлялась в программе Gwyddion 2.58 [12].

Прижизненное окрашивание фибробластов сердца было выполнено рабочим раствором фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентным красителем Texas Red®-X (Life Technologies, США). Фаллоидин высокоспецифично

связывается с F -актином и позволяет визуализировать актиновый цитоскелет клеток.

Флуоресцентный анализ осуществлялся с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия), интегрированного с инвертированным оптическим микроскопом Axio Observer Z1 (Carl Zeiss). Интенсивность флуоресценции F -актина определяли с помощью программы ZEN_2012 (Carl Zeiss).

В каждом фибробласте интенсивность флуоресценции F -актина измеряли в трех случайно выбранных областях с одинаковой площадью ($3.6 \mu\text{m}^2$), после чего рассчитывали среднее значение интенсивности для каждой клетки. В выбранных областях распределение интенсивности флуоресценции соответствовало нормальному распределению. Затем вычисляли среднее значение по всей группе клеток. Среднее значение интенсивности флуоресценции F -актина контрольных фибробластов принимали за 100 %. Работа выполнена на оборудовании ЦКП „Конфокальная микроскопия“ Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Анализ данных осуществлялся в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием t -критерия Стьюдента (флуоресцентный анализ) и U -критерия Манна–Уитни (ACM). Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Исследовалось влияние на фибробласти сердца Jedi2, активатора каналов Piezo1, в не влияющей на рост экс-

планктатов сердца ($10\text{ }\mu\text{M}$) и полностью ингибирующей рост экспланктатов ($100\text{ }\mu\text{M}$) концентрациях [4]. Методом АСМ было обнаружено, что при воздействии Jedi2 в концентрации $10\text{ }\mu\text{M}$ фибробласты демонстрируют увеличение кажущегося модуля Юнга по сравнению с контрольным значением, в то время как при более высокой концентрации ($100\text{ }\mu\text{M}$) среднее значение кажущегося модуля Юнга клеток остается на уровне контрольного значения (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что фибробласты сердца становятся жестче в результате воздействия Jedi2 в концентрации $10\text{ }\mu\text{M}$. Более высокая концентрация Jedi2 ($100\text{ }\mu\text{M}$) не влияет на жесткость фибробластов.

Флуоресцентный анализ показал, что интенсивность флуоресценции *F*-актина значительно увеличивается при более низкой концентрации Jedi2 ($10\text{ }\mu\text{M}$), а при более высокой концентрации ($100\text{ }\mu\text{M}$) практически не отличается от контрольного значения (рис. 3). Результаты свидетельствуют об увеличении количества *F*-актина в фибробластах сердца после воздействия Jedi2 в концентрации $10\text{ }\mu\text{M}$. В то же время более высокая концентрация вещества ($100\text{ }\mu\text{M}$) такого эффекта не вызывает.

Активация каналов Piezo1 низкой концентрацией Jedi2 инициирует клеточный ответ, проявляющийся в увеличении жесткости фибробластов и повышении количества *F*-актина в сравнении с контрольными клетками. В отличие от этого в высокой концентрации Jedi2 не влияет на жесткость фибробластов и уровень *F*-актина. Полученные результаты дают основание полагать, что зарегистрированное увеличение жесткости клеток в ответ на действие исследуемого вещества в концентрации $10\text{ }\mu\text{M}$, не влияющей на рост экспланктатов сердца, связано с усилением полимеризации актина за счет Piezo1-опосредованных Ca^{2+} -зависимых сигнальных каскадов, так как эти каналы проницаемы для ионов Ca^{2+} [2]. Отметим, что Yoda1, другой химический активатор каналов Piezo1, также способен приводить к усиленной полимеризации актиновых микрофиламентов [13]. Таким образом, в результате фармакологической активации каналов Piezo1 может увеличиваться содержание *F*-актина, что вызывает увеличение жесткости клеток. Культивирование фибробластов в присутствии Jedi2 в концентрации $100\text{ }\mu\text{M}$, по-видимому, приводит к сверхактивации каналов Piezo1 и, как следствие, запуску Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей, не связанных с полимеризацией актина. Известно, что перегрузка ионами Ca^{2+} может вызывать запуск каскадов, в конечном итоге приводящих к гибели клетки [14]. На вероятность такого исхода может указывать ингибирование роста экспланктатов Jedi2 в концентрации $100\text{ }\mu\text{M}$ [4]. Однако для проверки этой гипотезы необходимы дополнительные исследования.

Эффект увеличения жесткости клеток за счет действия Jedi2 в концентрации $10\text{ }\mu\text{M}$ аналогичен эффекту, вызываемому в фибробластах механической стимуляцией АСМ-зондом с повышенной силой $6\text{--}7\text{ }\text{nN}$ [4]. Исходя из этого можно предположить, что воздействие Jedi2

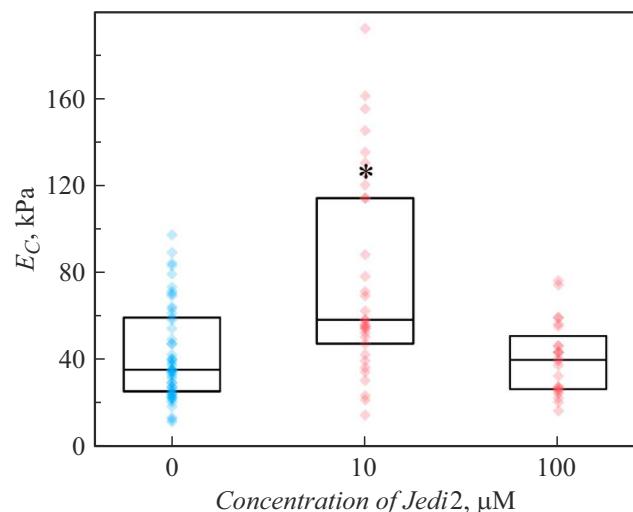


Рис. 2. Значения кажущегося модуля Юнга E_C фибробластов сердца после воздействия Jedi2. Показаны медиана и диапазон с первого по третий квартиль. Нулевая концентрация Jedi2 обозначает контрольную группу клеток. Число исследованных клеток $n = 50, 33$ и 24 при концентрациях Jedi2, равных $0, 10$ и $100\text{ }\mu\text{M}$ соответственно. Звездочка — $p < 0.05$.

в указанной концентрации на каналы Piezo1 приводит к увеличению чувствительности клеток к механической стимуляции со стороны АСМ-зонда, и уже при силе $3\text{ }\text{nN}$, использованной в экспериментах, наблюдается клеточный ответ в виде увеличения жесткости фибробластов сердца. Однако обнаруженное увеличение количества *F*-актина, вызванное, по-видимому, активацией Ca^{2+} -зависимых каскадов, опосредованных Piezo1, в ответ на действие только Jedi2, указывает на то, что жесткость фибробластов может повышаться даже без механической стимуляции. Таким образом, исследование химической активации каналов Piezo1 важно для понимания их физиологической роли и способствует более глубокому пониманию механизмов регуляции этих каналов. Полученные в настоящем исследовании данные вносят вклад в представление о воздействии на фибробласты сердца Jedi2 — вещества, которое может иметь перспективу практического применения в терапии патологий сердечно-сосудистой системы. Отметим также, что использованный в работе подход может быть применен для изучения работы каналов Piezo1 в других типах клеток.

Финансирование работы

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411787-0-3.1.8).

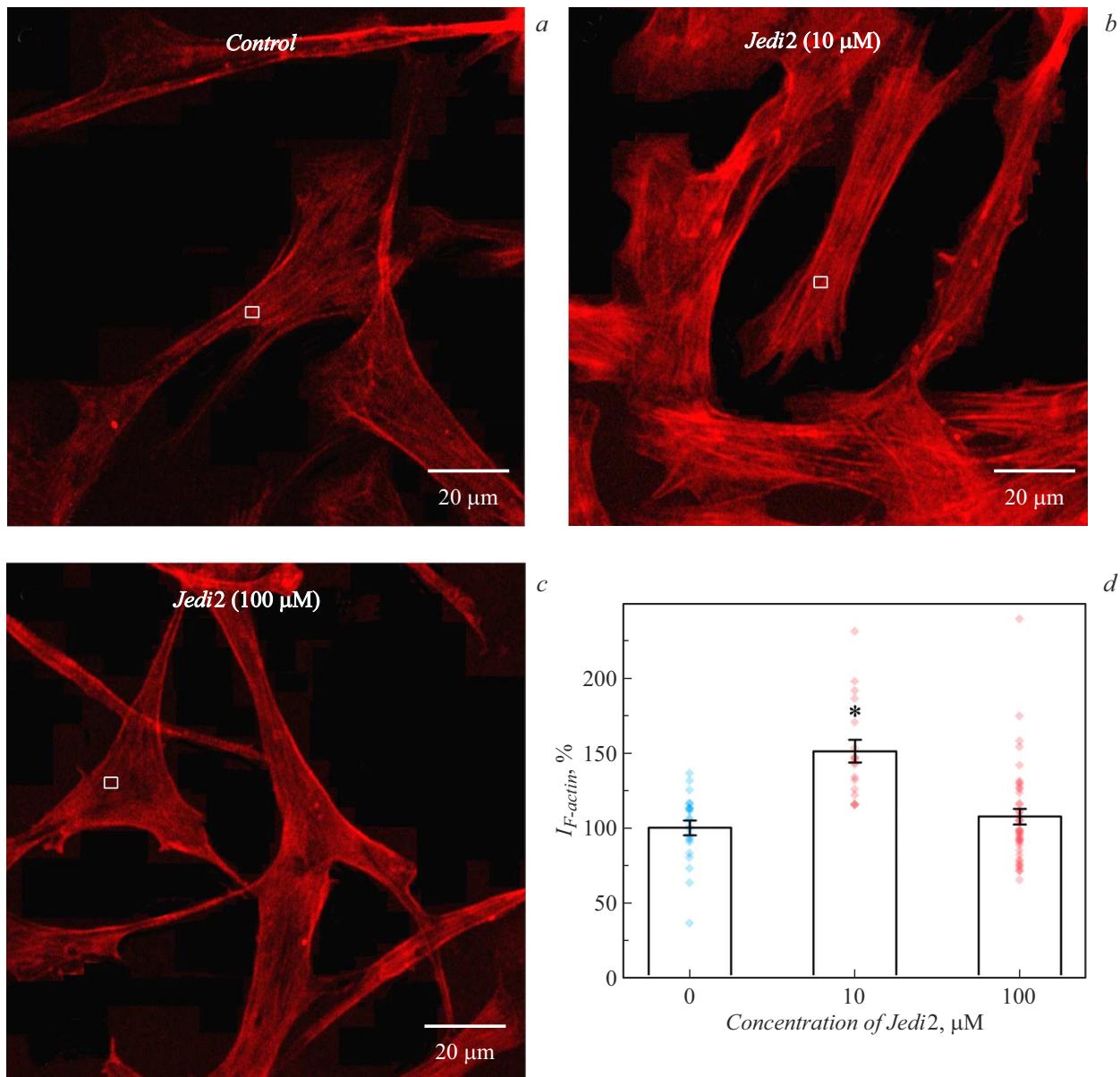


Рис. 3. Визуализация актинового цитоскелета в фибробластах сердца в контроле (a) и после воздействия Jedi2 (b, c). Окраска фаллоидином с флуоресцентным красителем Texas Red (красный). Прямоугольником отмечена область анализа. d — значения интенсивности флуоресценции F-актина ($I_{F\text{-}actin}$) в фибробластах сердца после воздействия Jedi2. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Нулевая концентрация Jedi2 обозначает контрольную группу клеток. Число исследованных клеток $n = 22, 41$ и 18 при концентрациях Jedi2, равных $0, 10$ и $100 \mu\text{M}$ соответственно. Звездочка — $p < 0.05$.

Соблюдение этических стандартов

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021. [Электронный ресурс]. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2021/summary/>
- [2] B. Coste, J. Mathur, M. Schmidt, T.J. Earley, S. Ranade, M.J. Petrus, A.E. Dubin, A. Patapoutian, *Science*, **330** (6000), 55 (2010). DOI: 10.1126/science.1193270
- [3] N.M. Blythe, K. Muraki, M.J. Ludlow, V. Stylianidis, H.T.J. Gilbert, E.L. Evans, K. Cuthbertson, R. Foster, J. Swift, J. Li, M.J. Drinkhill, F.A. van Nieuwenhoven, K.E. Porter, D.J. Beech, N.A. Turner, *J. Biol. Chem.*, **294** (46), 17395 (2019). DOI: 10.1074/jbc.ra119.009167

- [4] М.М. Халисов, А.В. Беринцева, С.А. Подзорова, Б.В. Крылов, В.А. Пенниайнен, Интегративная физиология, **5** (1), 50 (2024). DOI: 10.33910/2687-1270-2024-5-1-50-59
- [5] R. Emig, W. Knodt, M.J. Krussig, C.M. Zgierski-Johnston, O. Gorka, O. Groß, P. Kohl, U. Ravens, R. Peyronnet, Cells, **10** (3), 663 (2021). DOI: 10.3390/cells10030663
- [6] Y. Wang, S. Chi, H. Guo, G. Li, L. Wang, Q. Zhao, Y. Rao, L. Zu, W. He, B. Xiao, Nat. Commun., **9** (1), 1300 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-03570-9
- [7] М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, С.А. Подзорова, К.И. Тимошук, А.В. Анкудинов, Б.В. Крылов, ЖТФ, **90** (11), 1938 (2020). DOI: 10.21883/jtf.2020.11.49987.118-20 [M.M. Khalisov, V.A. Penniyaynen, S.A. Podzorova, K.I. Timoshchuk, A.V. Ankudinov, B.V. Krylov, Tech. Phys., **65** (11), 1853 (2020). DOI: 10.1134/S106378422011016X].
- [8] J.L. Hutter, J. Bechhoefer, Rev. Sci. Instrum., **64**, 1868 (1993). DOI: 10.1063/1.1143970
- [9] I.N. Sneddon, Int. J. Eng. Sci., **3** (1), 47 (1965). DOI: 10.1016/0020-7225(65)90019-4
- [10] К.И. Тимошук, М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, Б.В. Крылов, А.В. Анкудинов, Письма в ЖТФ, **45** (18), 44 (2019). DOI: 10.21883/pjtf.2019.18.48238.17878 [K.I. Timoshchuk, M.M. Khalisov, V.A. Penniyaynen, B.V. Krylov, A.V. Ankudinov, Tech. Phys. Lett., **45** (9), 947 (2019). DOI: 10.1134/S1063785019090293].
- [11] P.D. Garcia, R. Garcia, Biophys. J., **114**, 2923 (2018). DOI: 10.1016/j.bpj.2018.05.012
- [12] D. Nečas, P. Klapetek, Open Phys., **10** (1), 181 (2011). DOI: 10.2478/s11534-011-0096-2
- [13] V.I. Chubinskiy-Nadezhdin, V.Y. Vasileva, I.O. Vassilieva, A.V. Sudarikova, E.A. Morachevskaya, Y.A. Negulyaev, Biochem. Biophys. Res. Commun., **514** (1), 173 (2019). DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.139
- [14] S. Orrenius, B. Zhivotovsky, P. Nicotera, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **4** (7), 552 (2003). DOI: 10.1038/nrm1150