

УДК 576.08:576.31

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ EA.hy926 МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ И СКАНИРУЮЩЕЙ ИОН-ПРОВОДЯЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. С. Н. Плескова^{1, 2, *}, Н. А. Безруков¹, Е. Н. Горшкова¹, С. З. Бобык¹, Е. В. Лазаренко^{1, 2}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, научно-исследовательская лаборатория сканирующей зондовой микроскопии, Нижний Новгород, 603950 Россия

²Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, кафедра “Нанотехнологии и биотехнологии”, Нижний Новгород, 603115 Россия

*E-mail: pleskova@mail.ru

Поступила в редакцию 18.04.2023 г.

После доработки 28.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Разработана и апробирована двухсекционная аналитическая система для исследования культуры эндотелиальных клеток EA.hy926 в режиме реального времени с высоким разрешением. Показано, что релевантные результаты дает метод сканирующей ион-проводящей микроскопии, поскольку он обеспечивает отсутствие механических воздействий на клетки, и с его помощью возможно сканирование на мембранах, обеспечивающих окружение эндотелиальных клеток питательной средой. Метод дал возможность визуализировать не только изменения поверхности клеток в процессе длительного сканирования, но и детектировать внеклеточные (микрофиламенты) и внутриклеточные (ядрышко) структуры. Построение карт ригидности позволило определить, что значение жесткости мембран эндотелиоцитов находится в диапазоне от 357 до 796 Па. Через 240 мин от начала наблюдения начиналось формирование апоптотных тел эндотелиальными клетками, при этом ригидность самих клеток постепенно нарастала, а апоптотных тел — уменьшалась.

Ключевые слова: эндотелиоциты, апоптоз, ригидность мембраны, морфология клетки, микроструктуры, двухсекционная аналитическая камера, сканирующая ион-проводящая микроскопия, атомно-силовая микроскопия

DOI: 10.31857/S0041377123050073, **EDN:** GZFWWG

Культура эндотелиальных клеток часто используется для исследования транспортных функций и проникновения лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер (Roux, Couraud, 2005; Helms et al., 2016) и для моделирования процессов трансэндотелиальной миграции иммунокомпетентных клеток и бактерий. Еще одним важным практическим направлением использования эндотелиальных клеток является создание васкуляризированных композитных тканей (Kérourédan et al., 2019; Shah Mohammadi et al., 2021). Для оценки эффективности физиологических процессов и конструкторов необходимо развитие методов, позволяющих наблюдать за культурами клеток в динамике с высоким разрешением. Не менее важной задачей является оценка механических свойств эндотелиальных тканей, как в нативных структурах, так и в “строительных блоках”

применяемых в тканевой инженерии (Kosheleva et al., 2022). Высокоразрешающая микроскопия открывает новые возможности в изучении клеток и субклеточных структур.

В отличие от электронной микроскопии (сканирующей и просвечивающей), которая получает одномоментные изображения клеток (Watanabe et al., 2014), сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) позволяет исследовать динамические процессы в режиме реального времени. Основными преимуществами методов СЗМ являются следующие: 1) динамические наблюдения за клетками с высоким разрешением в нативной среде с возможностью модификации состава среды, внесением различных модуляторов и регистрацией немедленного отклика на эти изменения; 2) механические манипуляции на уровне отдельных клеток (например, доставка в клетку лекарственных веществ или, напротив, извлечение молекул); 3) определение вязко-упругих, зарядовых, фрикционных, гидрофобных свойств клеток с построением карт распределения этих свойств по по-

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия; ПЭТГ — полиэтилентерефталатгликоль; СЗМ — сканирующая зондовая микроскопия; СИПМ — сканирующая ион-проводящая микроскопия; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

верхности клеток; 4) оценка прочности адгезионных контактов между клетками; 5) изготовление сенсорных панелей для медицинской диагностики (Плескова, 2011).

В настоящее время, для исследования процессов трансэндотелиальной миграции применяются стандартные трансвеллы (Bai et al., 2017), представляющие собой двухкамерные системы, где в лунку культурального планшета помещается специальный вкладыш с мембраной. Однако из-за особенностей геометрии они не подходят для методов высокоразрешающей микроскопии. Поэтому цель настоящей работы заключалась в разработке двухкамерной системы, которая позволит вести длительные динамические наблюдения за культурой эндотелиальных клеток методами высокоразрешающей микроскопии и сравнение методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) и сканирующей ион-проводящей микроскопии (СИПМ) для определения изменений морфологии и ригидности культуры эндотелиальных клеток.

В работе стояли следующие задачи: 1) смоделировать и изготовить двухкамерную систему, в которой эндотелиальная клеточная линия EA.hy926 выращивается на мембране, а сверху и снизу окружена питательной средой; 2) отработать оптимальные условия для длительного наблюдения за эндотелиальными клетками методами высокоразрешающей микроскопии (АСМ и СИПМ); 3) выявить изменения морфологии и ригидности эндотелиальных клеток в режиме реального времени при динамическом наблюдении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Клеточная культура эндотелиоцитов. Использовали перевиваемую клеточную линию EA.hy926 – гибрид аденокарциномы A549 легкого человека с первичной линией эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Клетки были получены в НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург). Пересев клеточных линий осуществляли 1 раз в течение 3–4 сут по общепринятой методике (Marin et al., 2001), дезинтеграцию монослоя вызывали с помощью раствора трипсина с ЭДТА (3 мин, 37°C). Клетки пассировали по достижении ими 90–100%-ного монослоя. Для создания монослоя на мембране клетки культивировали в среде DMEM-F12, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина, 8 мМ L-глутамина (Portable MiniNB 203M, N-Biotek, Южная Корея) в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂.

Создание аналитической камеры для наблюдения за культурой клеток EA.hy926 в режиме реального времени с высоким разрешением. Методом 3D-печати создали вкладыши, фиксирующие мембраны в полистироловой чашке Петри диаметром 35 мм (Corning,

США). Вкладыши изначально моделировали с использованием программного обеспечения AutoCAD (Autodesk, Inc., США), после чего изготавливали с помощью 3D-принтера QQ-S PRO с прямым экструдером (FLSun, Китай) из полиэтилентерефталатгликольного (ПЭТГ) пластика. Выбор пластика обусловлен пригодностью ПЭТГ-изделий к обработке химическими агентами, например, перекисью водорода (Grzelak et al., 2021). Готовые изделия отмывали в 5%-ной перекисью водорода (6 ч), ополаскивали дистиллированной водой, высушивали на воздухе и использовали в экспериментах неограниченное количество раз с повторной процедурой отмывки между экспериментами.

Мембраны для формирования монослоя. Учитывая геометрию приборов, использовали мембранные вкладыши с диаметром 24 мм для проведения АСМ-исследований или с диаметром 6.5 мм для сканирования методом СИПМ. Для выращивания монослоя и последующего сканирования тестировали необработанные мембраны из эфиров целлюлозы, ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы, полиамида с диаметром пор 0.2 мкм (Владисарт, Россия), мембраны из поликарбоната, полученные из трансвеллов с адгезионным покрытием и диаметром пор 0.4 мкм (Corning, США) и аналогичные мембраны, но с диаметром пор 3 мкм (SPL Lifesciences, Южная Корея). Культуру клеток EA.hy926 в начальной концентрации 4×10^5 кл./мл высаживали на мембраны и культивировали, как описано выше. Контроль роста проводили оптически (Olympus IX71, Япония).

Буферный раствор для длительного динамического наблюдения за культурой EA.hy926. Для длительного наблюдения за клетками методами высокоразрешающей микроскопии важен буферный раствор с оптимальным уровнем pH, значение которого длительно поддерживается на заданном уровне и который обеспечивает жизнеспособность клеток, достаточную для изучения изменений их морфологии и ригидности (Glasser et al., 1985). Были апробированы стерильный физиологический раствор (0.9% NaCl), фосфатно-солевой буфер (PBS), раствор Хенкса, содержащий 2 мМ L-глутамина или 2 мМ L-глутамина и 10 мМ HEPES, среда RPMI-1640 с 2 мМ L-глутамина и среда DMEM-F12 с 2 мМ L-глутамина.

Трехсуточную культуру EA.hy926 отмывали от DMEM-F12 и культивировали в одном из буферов. Каждый час определяли изменение уровня pH, после измерения которого снимали клетки с помощью раствора Версена (ПанЭко, Россия) и определяли жизнеспособность по окрашиванию йодистым пропидием (1 мкг/мл, Sigma, США) с помощью проточного цитофлуориметра CytoflexS (BeckmanCoulter, США).

Сканирование монослоя культуры EA.hy926 методом АСМ. Мембрану диаметром 24 мм с выращенным на ней монослоем эндотелиальных клеток отмывали экспериментальной средой от DMEM-F12 и

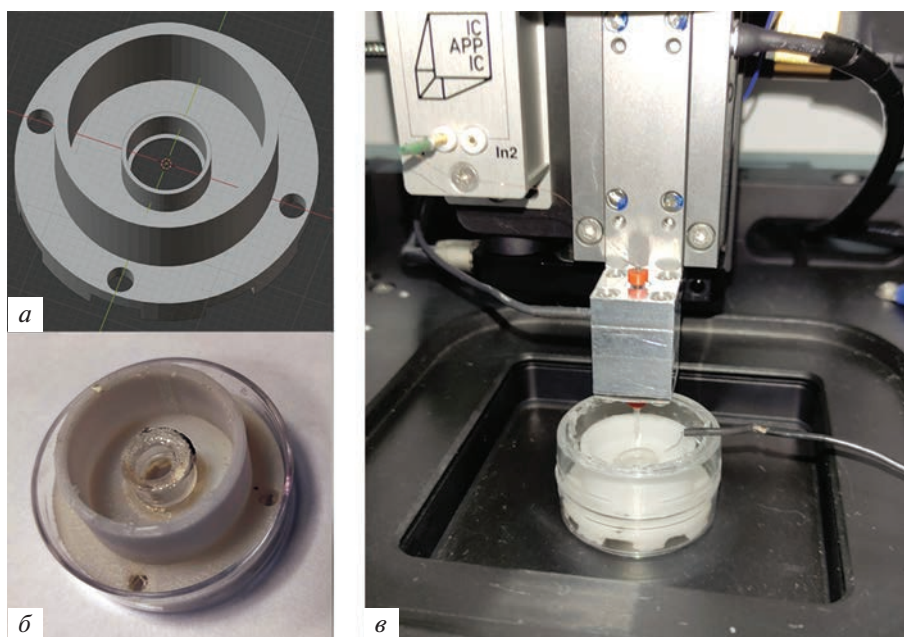


Рис. 1. Схема создания аналитической двухсекционной камеры для полного окружения средой культуры эндотелиальных клеток EA.hy926. *а* – первоначальный чертеж камеры в программе AutoCAD (Autodesk, Inc., США); *б* – двухсекционная аналитическая камера, изготовленная из ПЭТГ методом 3D-печати с вложенной мембраной; *в* – камера, встроенная в сканирующий ион-проводящий микроскоп.

помещали в аналитическую камеру, заполненную 2.5 мл экспериментальной среды. Поверхность мембраны сканировали с помощью атомно-силового микроскопа NTEGRA (НТ-МДТ, Россия) с использованием зондов MLCT-C (Bruker, США) в резонансном режиме. Полученные изображения обрабатывали в программе Gwyddion (GNU, Чехия).

Сканирование и измерение ригидности клеток методом СИПМ. Аналитическую камеру заполняли 2.5 мл экспериментальной среды, после чего в ней фиксировали отмытую экспериментальной средой мембрану с монослоем эндотелиоцитов.

Мембрану 6.5 мм с выращенным монослоем эндотелиальных клеток стерильно отмывали экспериментальной средой от DMEM-F12 и помещали в чашку Петри с ПЭТГ, таким образом культура клеток EA.hy926 оказывалась с обеих сторон окружена экспериментальной средой. Клетки сканировали с использованием сканирующего ион-проводящего микроскопа (ICAPPIC Ltd., Великобритания; ООО НАНОПРОФАЙЛИНГ, Россия). Сканирование проводили в “прыжковом режиме” со скоростью падения 100 нм/мс при потенциале смещения 200 мВ с использованием нанокapилляров в качестве зондов. Нанокapилляры с характерным внутренним радиусом кончика 25–50 нм получали на лазерном пуллере P-2000 (Sutter Instruments, США). Ригидность клеток определяли по напряжению, оказываемому нанокapилляром на клетку, в диапазоне уменьшения ионного тока от 0.5 до 2%, регистрируемого усилителем MultiClamp 700 В (Molecular Devices, Вели-

кобритания). Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения ICAPPIC (ICAPPIC Ltd., Великобритания). Определяли модуль Юнга, основываясь на модели Герца (Pleskova et al., 2021), значения выражали в Па.

Статистическая обработка данных. Для обработки данных использовали программу Origin 8.0 (Origin Lab Corporation, США). Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределения соответствовали критериям нормальности, определяли среднее и среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание аналитической камеры для исследования методами СЗМ. Методом 3D-печати смоделировали и изготовили двухсекционные камеры, разделенные мембранами с выращенным на них монослоем культуры эндотелиальных клеток EA.hy926. При создании камер учитывали геометрию головок разных СЗМ. Этапы создания аналитической камеры отражены на рис. 1. В аналитическую камеру помещали поликарбонатную мембрану с выращенным в стерильных условиях монослоем эндотелиальных клеток культуры EA.hy926.

Оптимальные условия роста монослоя культуры EA.hy926 на мембранах. Выявлено, что на рост монослоя на мембране влияли свойства мембраны (материал, размер пор, покрытие поверхности), началь-

Таблица 1. Изменение уровня pH и жизнеспособности эндотелиальных клеток культуры EA.hy926 в процессе инкубации с разными буферными растворами

Раствор	Значение pH			Жизнеспособность, %	
	начальный уровень	через 1 ч	через 2 ч	через 1 ч	через 2 ч
Стерильный физиологический	7.40	6.79	6.67	82.6 ± 9.7	69.3 ± 23.5
PBS	7.65	7.15	7.12	89.7 ± 3.0	72.7 ± 9.3
Хенкса + 2 мМ L-глутамина	7.27	6.86	6.95	88.9 ± 6.0	81.3 ± 12.3
Хенкса + 2 мМ L-глутамина + 10 мМ HEPES	7.38	7.04	7.08	90.3 ± 4.0	85.9 ± 2.4
RPMI-1640 + 2 мМ L-глутамина	7.85	7.64	7.70	91.9 ± 2.0	77.2 ± 10.44
DMEM-F12 + 2 мМ L-глутамина	7.75	7.65	7.74	86.8 ± 10.4	80.7 ± 7.5

ная концентрация клеток и время культивирования. Апробировали варианты мембран, состоящие из ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы или полиамида с диаметром пор 0.2 мкм, а также мембраны из целлюлозы или поликарбоната с диаметром пор 0.4 и 3 мкм и диаметром мембраны 24 и 6.5 мм, с наличием и отсутствием адгезионного покрытия. Все варианты необработанных мембран характеризовались плохой адгезией эндотелиальных клеток и не обеспечивали формирование монослоя. Кроме того, все целлюлозные мембраны теряли натяжение по мере смачивания, что исключало возможность проведения экспериментов методами СЗМ. Поликарбонатные мембраны обеспечивали хорошую адгезию клеток, но стабильное формирование монослоя эндотелиоцитов отмечали только при начальной концентрации 2.5×10^5 кл./мл. Критичным для формирования монослоя эндотелиоцитов оказался также диаметр пор: большой диаметр пор (3 мкм) не позволял формировать монослой эндотелиоцитов, тогда как поры меньшего диаметра обеспечивали равномерное разрастание клеток. Было протестировано несколько начальных концентраций EA.hy926: 1.5×10^5 , 2×10^5 , 2.5×10^5 и 4×10^5 кл./мл. Время культивирования варьировало от 48 до 72 ч.

Оптимальными для длительного высокоразрешающего исследования оказались поликарбонатные мембраны с адгезионным покрытием и диаметром пор 0.4 мкм, поскольку они давали стабильно воспроизводимый рост монослоя эндотелиальных клеток. Оптимальное время культивирования составило 72 ч при начальной концентрации эндотелиальных клеток 2.5×10^5 .

Оптимальная среда для длительных наблюдений за культурой эндотелиальных клеток в двухсекционной аналитической камере. Для длительных динамических наблюдений за культурой EA.hy926 методами СЗМ были апробированы разные растворы: стерильный физиологический раствор (0.9% NaCl); PBS; раствор Хенкса, содержащий 2 мМ L-глутамин или 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES; среда RPMI-1640 с 2 мМ L-глутамин и среда DMEM-F12

с 2 мМ L-глутамин. Результаты замеров значений pH и определения жизнеспособности эндотелиальных клеток при использовании разных буферов суммированы в табл. 1. Начальная жизнеспособность эндотелиальных клеток находилась на уровне 98–99%.

Из полученных данных очевидно, что “бедные” среды, такие как стерильный физиологический раствор и PBS, не обеспечивают ни поддержания стабильного уровня pH, ни, как следствие, приемлемого уровня жизнеспособности эндотелиальных клеток. Во всех без исключения буферных растворах со временем наблюдали разную степень закисления. Самыми оптимальными для длительного наблюдения оказались раствор Хенкса, содержащий 2 мМ L-глутамин или 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES. Для дальнейших динамических наблюдений был выбран раствор Хенкса, содержащий 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES, поскольку поддерживаемый им уровень pH был ближе всего к физиологическим значениям в крови (7.35–7.45) (Горн и др., 1999), а также уровень жизнеспособности эндотелиальных клеток после длительной инкубации в нем был максимальным.

Морфология монослоя культуры EA.hy926 методами АСМ и СИПМ. Оба метода (АСМ и СИПМ) дают возможность наблюдения в режиме реального времени за морфологией эндотелиальных клеток в среде максимально нативной для клеток. Результаты исследования эндотелиальных клеток методом АСМ представлены на рис. 2. Очевидно, что исследование на мембранах методом АСМ практически невозможно, поскольку при сканировании в полуконтактном резонансном режиме из-за отсутствия жесткой фиксации индуцируются дополнительные колебания мембраны, что приводит к артефактам сканирования (рис. 2а, б). Попытки создать более жесткое натяжение мембраны с помощью теплового воздействия приводило к сплавлению пор и нарушению проницаемости, что исключало поступление питательной среды из нижнего отсека камеры. Кроме того, изменялось адгезионное покрытие, что подавляло формирование монослоя эндотелиоцитов.

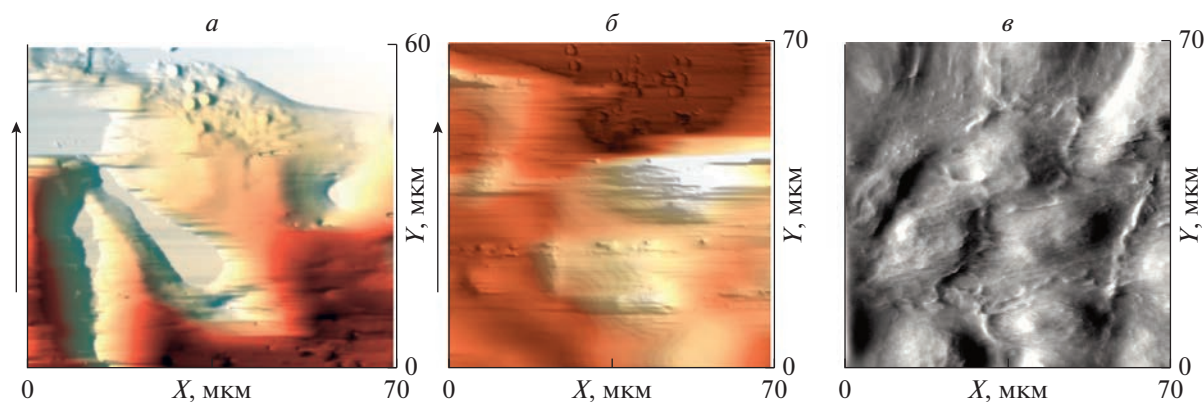


Рис. 2. Морфология эндотелиальных клеток EA.hy926 при сканировании методом АСМ. *а, б* — сканирование на мембране, *в* — сканирование на твердой подложке чашки Петри, не позволяющей вести длительные наблюдения и исследовать процесс трансэндотелиальной миграции.

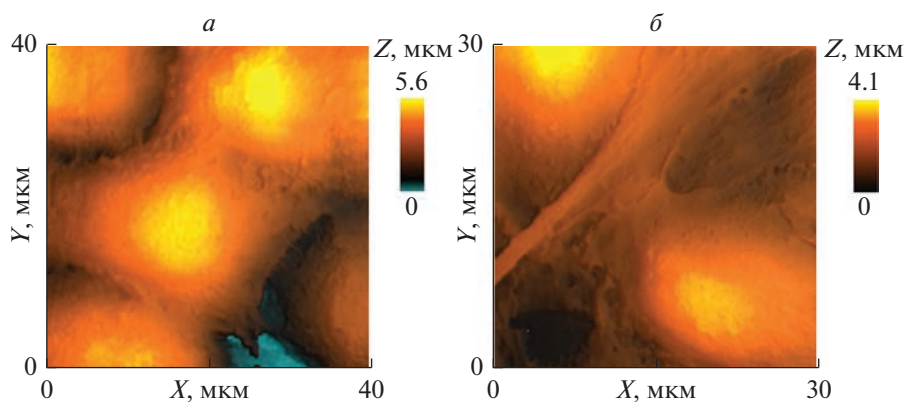


Рис. 3. Морфология эндотелиальных клеток EA.hy926 при сканировании методом СИПМ. *а* — сканирование на мембране в двухсекционной аналитической камере в окружении питательной среды, позволяющей вести длительные динамические наблюдения. *б* — сканирование на твердой подложке чашки Петри, не позволяющей вести длительные наблюдения и исследовать процесс трансэндотелиальной миграции. Справа показаны шкалы высот (мкм) в цвете.

Перепады высот в области сканирования приводили к срыву эндотелиоцитов с мембраны. Сканирование на жесткой подложке, обеспечивающей только одностороннее поступление среды (сверху), тогда как нижняя часть клетки прочно адгезировалась всей поверхностью к покрытию чашки Петри, приводило к получению четких сканов, позволяющих анализировать морфологию монослоя с высоким разрешением (рис. 2в). Однако и в этом случае возникали две проблемы: 1) поскольку питательная среда находится только сверху над эндотелиоцитами, это исключает возможность очень длительных исследований; 2) при выборе не оптимального режима сканирования происходит отрыв клеток от поверхности подложки.

Результаты исследования монослоя культуры EA.hy926 методом СИПМ представлены на рис. 3. Очевидно, что в обоих случаях и при сканировании эндотелиоцитов, выросших на адгезионных мембранах в двухсекционных аналитических камерах (рис. 3а), и

при сканировании клеток на жесткой подложке — поверхности чашки Петри (рис. 3б), хорошо прописываются все особенности морфологии эндотелиоцитов, включая микроструктуру поверхности. В дальнейшем предпочтение отдавали клеткам, выросшим на адгезионных мембранах, которые были закреплены в двухсекционных аналитических камерах, поскольку именно в этом случае они оказывались окруженными питательной средой с двух сторон, что позволяло проводить длительное динамическое наблюдение за изменением их морфологии и ригидности.

На рис. 4 показано, что в режиме измерения распределения ионных токов, позволяющем одновременно получать топографические сканы (исследовать морфологию клеток) и карту ригидности (распределение жесткости поверхностной мембраны клетки), можно дополнительно получать информацию не только о микроструктуре мембран нативных клеток, но и определять внеклеточные структуры на

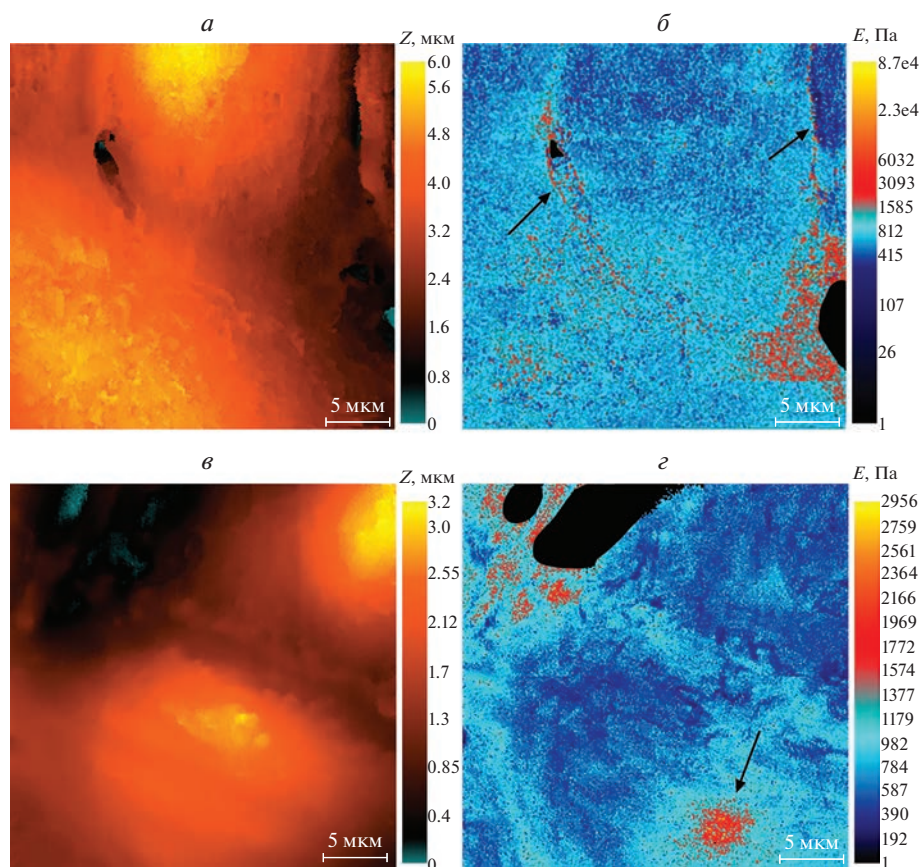


Рис. 4. Морфология и ригидность эндотелиоцитов. *а* — топографический скан, четко визуализируется микроструктура мембраны эндотелиоцита; *б, г* — карта ригидности (E — модуль Юнга, Па): хорошо видны поверхностные структуры микрофиламентов (стрелки, *а*) и ядрышко (стрелка, *г*); *в* — топографический скан, визуализируются только особенности морфологии эндотелиальных клеток.

них (микрофиламентозные образования) (рис. 4*а, б*) и даже внутриклеточные структуры (ядрышки) (рис. 4*в, г*). Благодаря построению карты ригидности удалось определить, что жесткость мембран эндотелиоцитов варьирует от 357 до 796 Па. Максимальная ригидность отмечается у филаментов клеток и ядрышек — соответственно 1536 и 1729 Па.

Разработанная система позволила вести длительные динамические наблюдения с высоким разрешением. Через 3 ч наблюдаются существенные изменения морфологии клеток: микроструктура мембран сглаживается, а над ядерной зоной клетки появляются выросты мембраны (рис. 5*а*). Через 4 ч наблюдаются признаки апоптоза: формируются апоптотные тела (рис. 5*б*), они формируются на границе межклеточных контактов. Для апоптотных тел выявлена интересная особенность: при их формировании ригидность клетки постепенно повышается, а ригидность апоптотных тел постепенно уменьшается (рис. 6). Исключение составляет изображение на рис. 5*г*, на котором отмечено сморщивание (shrinkage) апоптотного тела: здесь, напротив, ригидность эндотелиоцита падает, а апоптотных тел — повышает-

ется, что четко видно на рис. 6. Эта тенденция абсолютно одинакова для обоих апоптотных тел, отпочковывающихся от эндотелиальной клетки.

Формирование апоптотного тела на границе клеток особенно четко видно при построении трехмерной проекции клетки (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Создание двухкамерной аналитической системы для исследования клеток, когда они с обеих сторон окружены оптимальной для них (по составу и величине pH) средой, дает возможность длительных динамических наблюдений за эндотелиоцитами. В этой системе, помимо состава и значения pH среды, важно учитывать диаметр пор мембраны, ее адгезионные свойства, начальную концентрацию и время роста эндотелиальной культуры для формирования монослоя, имитирующего эндотелиальную выстилку интимы сосуда. Особенности системы обратной связи и механики АСМ не дают возможности исследовать клетки на мембранах, даже в малотравматичном резонансном режиме сканирования. СИПМ

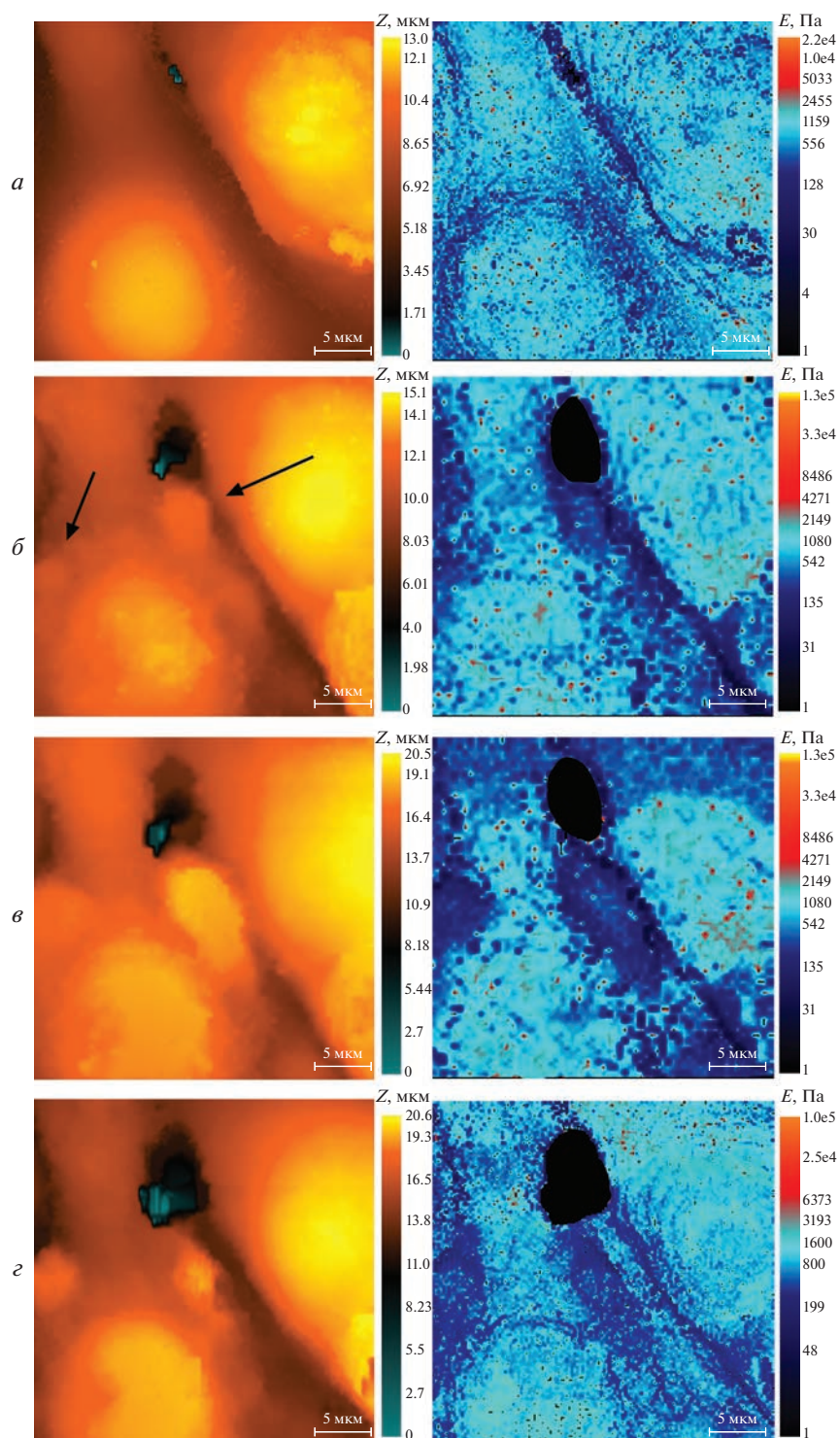


Рис. 5. Изменение морфологии эндотелиоцитов в процессе длительного наблюдения топография (ряд слева) и карта жесткости (ряд справа). По вертикали — высота (мкм, слева) и модуль Юнга (E , Па справа). *а* — “сглаживание” мембраны и формирование выростов в ядерной области через 180 мин наблюдения; *б* — начало формирования апоптозных тел (стрелки) через 246 мин; *в* — увеличение объема апоптозных тел через 255 мин; *г* — сморщивание (shrinkage) апоптозных тел через 258 мин наблюдения.

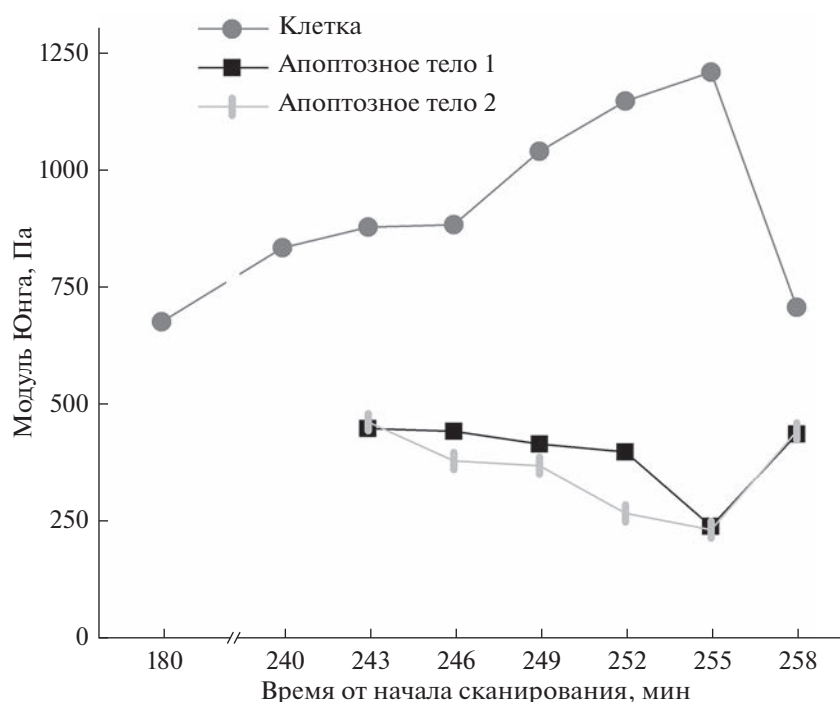


Рис. 6. Изменение модуля Юнга (Па) эндотелиоцита и апоптозных тел в процессе апоптоза при динамическом наблюдении в течение 258 мин.

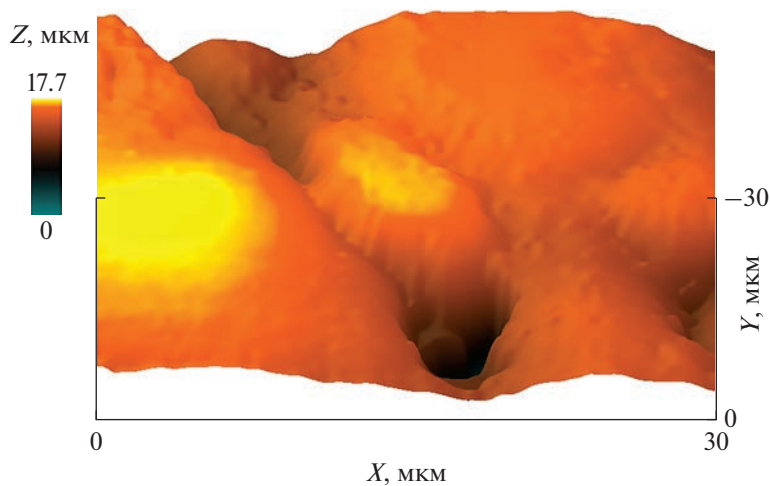


Рис. 7. Трехмерная проекция эндотелиоцитов. В середине четко визуализировано апоптозное тело.

позволяет анализировать не только морфологию и микроструктуру клеток и субклеточных структур, но и измерять ригидность эндотелиальных клеток.

Анализ клеток в течение 180–258 мин позволил наблюдать апоптоз эндотелиоцитов. В процессе апоптоза выявлено, что отпочковывающиеся апоптозные тела мягче, чем клетка, от которой они отделяются. Эти данные согласуются с исследованием, в котором авторы (Rodriguez-Quijada, Dahl, 2020) измеряли ригидность апоптозных тел, используя мик-

рофлюидную технологию. Но в этой работе значения ригидности апоптозных тел, извлеченных из сыворотки крови, составили 5.6 ± 0.5 Па (Rodriguez-Quijada, Dahl, 2020), тогда как минимальные значения ригидности, полученные нами в настоящей работе, относятся к моменту непосредственно перед сморщиванием апоптозных тел и составляют 235–242 Па. Существенная разница значений может быть объяснена как разными методами измерения ригидности, так и разными источниками апоптозных тел (клетками, от которых они отпочковались). Из на-

стоящей работы также очевидно, что ригидность апоптозных тел со временем может изменяться. Ранее при длительных наблюдениях нами был зарегистрирован феномен осцилляции ригидности нейтрофильных гранулоцитов перед отпочковыванием апоптозных тел (Pleskova, 2010), тогда как в настоящем исследовании на более коротком временном отрезке мы наблюдали феномен плавного нарастания ригидности эндотелиоцита перед отпочковыванием апоптозных тел и плавное снижение ригидности самих апоптозных тел, за исключением момента их сморщивания, когда эти тенденции резко менялись местами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность С.А. Селькову и Д.И. Соколову (НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург) за предоставление клеточной линии EA.hy926.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-74-00004).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не использовали животных или людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горн М.М., Хейтц У.И., Сверинген П.Л., Вебер К.С. 1999. Водно-электролитный и кислотно-основной баланс. СПб.—М.: Невский Дialect, БИНОМ. (Gorn M.M., Heitz W.I., Swearingen P.L., Weber K.S. 1999. Water-electrolyte and acid-base balance. SPb.—M.: Nevsky Dialect, BINOM) (Horne M.M., Heitz U.E., Swearingen P.L. 1991. Fluid, electrolyte, and acid-base balance: a case study approach. St. Louis: Mosby Inc.)
- Плескова С.Н. 2011. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Долгопрудный: Интеллект. (Pleskova S.N. 2011. Atomic-force microscopy in biology and medicine. Dolgoprudny: Intellect.)
- Bai M., Grieshaber-Bouyer R., Wang J., Schmider A.B., Wilson Z.S., Zeng L., Halyabar O., Godin M.D., Nguyen H.N., Levescot A., Cunin P., Lefort C.T., Soberman R.J., Nigrovic P.A. 2017. CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood*. V. 130. P. 2092.
- Glasser L., Fiederlein R.L., Huestis D.W. 1985. Liquid preservation of human neutrophils stored in synthetic media at 22 degrees C: controlled observations on storage variables. *Blood*. V. 66. P. 267.
- Grzelak K., Łaszczyk J., Polkowski J., Mastalski P., Kluczyński J., Łuszczek J., Torzewski J., Szachogłuchowicz I., Szymaniuk R. 2021. Additive manufacturing of plastics used for protection against COVID19 – the influence of chemical disinfection by alcohol on the properties of ABS and PETG polymers. *Materials (Basel)*. V. 14. P. 4823.
- Helms H.C., Abbott N.J., Burek M., Cecchelli R., Couraud P.O., Deli M.A., Förster C., Galla H.J., Romero I.A., Shusta E.V., Stebbins M.J., Vandenhaute E., Weksler B., Brodin B. 2016. *In vitro* models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* V. 36. P. 862.
- Kérourédan O., Bourget J.M., Rémy M., Crauste-Manciet S., Kalisky J., Catros S., Thébaud N.B., Devillard R. 2019. Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by laser-assisted bioprinting. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 30. P. 28. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6230-1>
- Kosheleva N.V., Efremov Y.M., Koteneva P.I., Ilina I.V., Zurina I.M., Bikhmulina P.Y., Shpichka A.I., Timashev P.S. 2022. Building a tissue: mesenchymal and epithelial cell spheroids mechanical properties at micro- and nanoscale. *Acta. Biomater.* V. 2022. S1742-7061(22)00621-3. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.051>
- Marin V., Kaplanski G., Grès S., Farnarier C., Bongrand P. 2001. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J. Immunol. Methods*. V. 254. P. 183.
- Pleskova S.N. 2010. Behavior of the living neutrophil granulocytes under a lipopolysaccharide condition observed in real time by atomic force microscopy. In: *Handbook of granulocytes. Classification, toxic materials produced and pathology*. N.Y.: Nova Science Publishers. P. 289.
- Pleskova S.N., Bobyk S.Z., Kriukov R.N., Gorshkova E.N., Novikov D.V., Vasilchikov P.I., Bezrukov N.A., Novikov V.V. 2021. *S. aureus* and *E. coli* change the force and work of adhesion between P- and E-selectins of endothelial cells and ligands of neutrophil granulocytes. *Micron*. V. 150. 103139. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103139>
- Rodriguez-Quijada C., Dahl J.B. 2020. Non-contact microfluidic mechanical property measurements of single apoptotic bodies. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* V. 1865. P. 129657. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129657>
- Roux F., Couraud P.O. 2005. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell. Mol. Neurobiol.* V. 25. P. 41.
- Shah Mohammadi M., Buchen J.T., Pasquina P.F., Niklason L.E., Alvarez L.M., Jariwala S.H. 2021. Critical considerations for regeneration of vascularized composite tissues. *Tissue Eng. B. Rev.* V. 27. P. 366.
- Watanabe S., Lehmann M., Hujber E., Fetter R.D., Richards J., Söhl-Kielczynski B., Felies A., Rosenmund C., Schmoranz J., Jorgensen E.M. 2014. Nanometer-resolution fluorescence electron microscopy (nano-EM) in cultured cells. *Methods Mol. Biol.* V. 1117. P. 503.

Study of EA.hy926 Endothelial Cells by Atomic Force and Scanning Ion-Conductance Microscopy

S. N. Pleskova^{a, b, *}, N. A. Bezrukov^a, E. N. Gorshkova^a, S. Z. Bobyk^a, and E. V. Lazarenko^{a, b}

^aLobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Scanning Probe Microscopy Laboratory, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

^bNizhny Novgorod State Technical University, Department of Nanotechnology and Biotechnology, Nizhny Novgorod, 603115 Russia

*e-mail: pleskova@mail.ru

A two-section analytical system was developed and tested to study the culture of EA.hy926 endothelial cells in real time with high resolution imaging. Scanning ion-conductance microscopy was shown as more relevant method because it didn't cause mechanical damage of cell, and made possible scanning on the membranes, when endothelial cells were surrounded by nutrient medium. The method allowed not only to analyze changes in the cells morphology, but also to identify extracellular (microfilaments) and intracellular (nucleolus) structures. The rigidity mapping showed that the rigidity of the endotheliocyte membrane varied from 357 to 796 Pa. After 240 min from the beginning of the observation, the formation of endothelial cells apoptotic bodies has begun, and the rigidity of the cell gradually increased, while rigidity of the apoptotic bodies decreased.

Keywords: endotheliocytes, apoptosis, membrane rigidity, cell morphology, microstructures, two-section analytical chamber, scanning ion-conductance microscopy, atomic force microscopy