

УДК 57.086.2

*Н.Е. Морозова, А.Д. Ведяйкин, А.В. Сабанцев,
Г.Е. Побегалов, С.В. Мурашов, М.А. Ходорковский*

ФОРМИРОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ ТУБУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ИЗ ГЕПАТОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

*N.E. Morozova , A.D. Vedyaykin, A.V. Sabantsev,
G.E. Pobegalov, S.V. Murashov, M.A. Khodorkovskiy*

St. Petersburg State Polytechnical University,
29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia.

MEMBRANE TETHER FORMATION FROM HUMAN HEPATOCYTES

Посредством формирования мембранных тубулярных структур определены значения силы натяжения и обобщенной вязкости клеточных мембран гепатоцитов человека (клеточная линия HepG2). Стационарная сила натяжения мембраны составила 40 ± 3 пН, обобщенная вязкость мембраны составила $0,27 \pm 0,07$ пН·с/мкм. Разработанная методика может быть использована для исследования взаимосвязи различных факторов (в том числе употребления этанола) с механическими свойствами мембран клеток печени.

МЕМБРАННЫЕ ТУБУЛЯРНЫЕ СТРУКТУРЫ, ОПТИЧЕСКАЯ ЛОВУШКА, HEPG2, КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА, ГЕПАТОЦИТЫ.

For the first time to our knowledge the mechanical properties (membrane tension and apparent viscosity) of human hepatocyte (HepG2 cell line) membranes were measured by membrane tether formation using optical trap. Membrane tension and apparent membrane viscosity were measured to be 40 ± 3 pN and 0.27 ± 0.07 pN·s/ μ m respectively. The developed procedure can be used to study connections between liver cell membrane mechanics and different factors, including ethanol and drug consumption, aging, pathological processes, etc.

MEMBRANE TETHER FORMATION, OPTICAL TRAP, HEPG2, CELL MEMBRANE, HEPATOCYTES.

Физические характеристики клеточной мембраны играют важную роль в гомеостазе клеток за счет влияния на целый ряд связанных с мембраной ферментативных и рецепторных систем [1]. Свойства клеточных мембран гепатоцитов тесно связаны с функционированием данного типа клеток [2].

Методами спектроскопии электронного парамагнитного резонанса [3–5] и де-

поляризации флуоресценции [6, 7, 1, 8] была продемонстрирована тесная связь вязкости плазматических мембран клеток печени с различными функциональными состояниями.

Так, было показано, что этанол вызывает снижение вязкости мембран клеток печени как *in vivo* [7], так и в культуре [6]. В работе [1] была продемонстрирована кор-

реляция вязкости мембраны клеток печени с различными патологиями у пациентов, в том числе вызванными потреблением этанола. Кроме того, было показано, что целый ряд лекарственных веществ, в том числе анестетики, способны изменять вязкие свойства клеточных мембран и для некоторых из них именно этим можно объяснить физиологический эффект [9]. Также было показано, что накопление в клетках пероксидов липидов и активных форм кислорода, связанное со старением, вызывают увеличение вязкости мембран клеток печени [10].

Несмотря на успешность описанных подходов к изучению вязкости клеточных мембран, они обладают рядом недостатков: косвенные измерения не позволяют получать абсолютные значения вязкости и других механических параметров мембран. Кроме того, измерения проводятся не на живых клетках, а на мембранных фракциях гомогенизированных клеток. В частности, это не позволяет оценить разброс измеряемых параметров от клетки к клетке и проследить динамику изменения механических параметров мембран в ответ на изменение внешних условий.

В связи с этим представляется перспективным использование метода измерения механических свойств клеточных мембран посредством формирования мембранных тубулярных структур при помощи оптической ловушки (ОЛ) [11–13] для измерения абсолютных величин механических параметров мембран клеток печени на уровне одиночных клеток.

В 1989 г. [14] была впервые продемонстрирована возможность формирования мембранных тубулярных структур (МТС) из клеточной мембраны при помощи ОЛ. В опытах исследовались растительные клетки, а сила прикладывалась к мелким клеточным органеллам.

Первый количественный эксперимент по исследованию свойств клеточной мембраны посредством формирования МТС при помощи ОЛ был описан в работе [15], где изучались механические свойства мембраны конуса роста нейронов. Позднее описанная в этой статье методика была ис-

пользована для исследования свойств различных эукариотических и прокариотических клеток [12, 16, 17].

Целью данной работы было определение механических характеристик (натяжения и вязкости) клеточной мембраны гепатоцитов человека (клеточная линия HepG2) посредством формирования МТС при помощи ОЛ, а также изучение динамики различных, в том числе релаксационных, процессов в ходе формирования МТС из данных клеток.

Материалы и методы исследования

Оптическая ловушка (лазерный, или оптический пинцет) — метод удержания и манипулирования объектами с помощью сфокусированного луча лазера. Впервые ОЛ была предложена А. Ашкином в 1978 г., и уже в 80-х годах данный метод был использован для изучения биологических объектов (бактерий) [18].

В основе работы ОЛ лежит явление захвата и удержания микро- и наночастиц (размеры от 5 нм до 10 мкм) сфокусированным лазерным пучком. ОЛ позволяет прикладывать и измерять силы в диапазоне 0,01 — 100 пН с временным разрешением порядка миллисекунд. Следует отметить, что ОЛ является достаточно малоинвазивным методом, так как излучение используемых лазеров, как правило, почти не поглощается в живых тканях. Об этом свидетельствует тот факт, что клетки бактерий *E.coli* способны успешно и многократно делиться, находясь в оптической ловушке [19]. Тем не менее, есть свидетельства о том, что оптическая ловушка вызывает локальный нагрев образца на величину около 1,2 °С на 100 мВт лазерной мощности [20].

Оптическая ловушка позволяет формировать МТС из различных фосфолипидных мембран [15, 12, 16, 17]. В эксперименте по формированию МТС используются клетки, закрепленные на поверхности покровного стекла. При помощи оптической ловушки микросфера приводится в соприкосновение с плазматической мембраной. После образования контакта между микросферой и мембраной микросфера с постоянной скоростью отводится от клетки, вытягивая

за собой участок мембраны, формируя тем самым МТС. Когда сила, действующая на микросферу со стороны МТС, становится больше, чем максимальная сила оптической ловушки, микросфера покидает ловушку, МТС сокращается, и микросфера возвращается в исходное положение. В процессе эксперимента отслеживается положение микросферы в ловушке, а затем проводится анализ смещения микросферы из ее центра, что позволяет определить силу, действующую на микросферу со стороны МТС.

Экспериментальная установка. Установка была подробно описана ранее [21, 22]. При помощи луча инфракрасного лазера Spectra-Physics VL-106C с длиной волны 1064 нм, сфокусированного при помощи масляного иммерсионного объектива с числовой апертурой 1.46 'Plan-Apochromat' 100×/1.46 Oil DIC производства фирмы Carl Zeiss, создается оптическая ловушка. Перемещение объекта относительно оптической ловушки осуществляется при помощи пьезостолика производства фирмы Physik Instrumente (PI). Для регистрации изображений используются охлаждаемые ПЗС-камеры Photometrics Cascade II 1024 и Andor iXon3 897.

Подготовка экспериментального образца клеток HerG2, закрепленных на поверхности покровного стекла. Указанная подготовка выполняется в представленной далее последовательности.

1. Для выращивания клеток линии HerG2 используются покровные стекла 18 × 18 мм (Mentzel Glasser). Перед использованием покровные стекла промываются водопроводной водой, затем дистиллированной водой и тщательно промываются водой MilliQ, после чего стекла обрабатываются этиловым спиртом для удаления воды, для дополнительной очистки и стерилизации.

2. Покровные стекла высушиваются и покрываются поли-*L*-лизинном (Sigma). Для этого на покровное стекло наносится 25 мкл раствора поли-*L*-лизина в воде в концентрации 0,01 %.

3. После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре покровное стекло промывается водой MilliQ и исполь-

зуется в качестве подложки для роста культуры клеток HerG2.

4. Культура клеток HerG2, выращенная на поверхности пластиковых культуральных чашек (Greiner), переводится в суспензию при помощи трипсина, после чего рассеивается на покрытые полилизинном покровные стекла в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco), 2 mM *L*-глутамина и гентамицина в концентрации 20 мкг/мл при 37 °C в атмосфере 5 %-го CO₂.

5. Ночью клетки растут в CO₂-инкубаторе, после чего используются для эксперимента. Покровные стекла с клетками закрепляются на предметные стекла при помощи двухсторонней клейкой ленты; при этом образуется канал между покровным и предметным стеклами, в котором осуществляется эксперимент.

6. Далее в канал с клетками вмываются микросферы из полистирола диаметром 2,5 мкм (Bangs Laboratories) в разведении 1 : 100 в клеточной среде ДМЕМ. В ходе проведения эксперимента при помощи нагревательного кольца для объектива температура образца поддерживается на уровне 37 °C. Эксперимент проводится в течение 1,5 ч с момента приготовления образца.

Протокол эксперимента. Последовательность действий в ходе эксперимента по формированию МТС схематически представлена на рис. 1, а. Сначала микросфера из полистирола захватывается в оптическую ловушку и приводится в соприкосновение с мембраной клетки. Спустя примерно 10 с микросфера начинает перемещаться с постоянной скоростью в направлении от поверхности клетки при помощи оптической ловушки. В ходе этого процесса при помощи ПЗС-камеры Andor регистрируются изображения микросферы в ОЛ. После смещения пьезостолика на заданное расстояние (20 мкм) перемещение прекращается, и регистрируется релаксация силы, действующей на микросферу со стороны МТС. В заключительной фазе эксперимента ОЛ выключается, и при помощи ПЗС-камеры регистрируется динамика возврата микросферы к поверхности клетки.

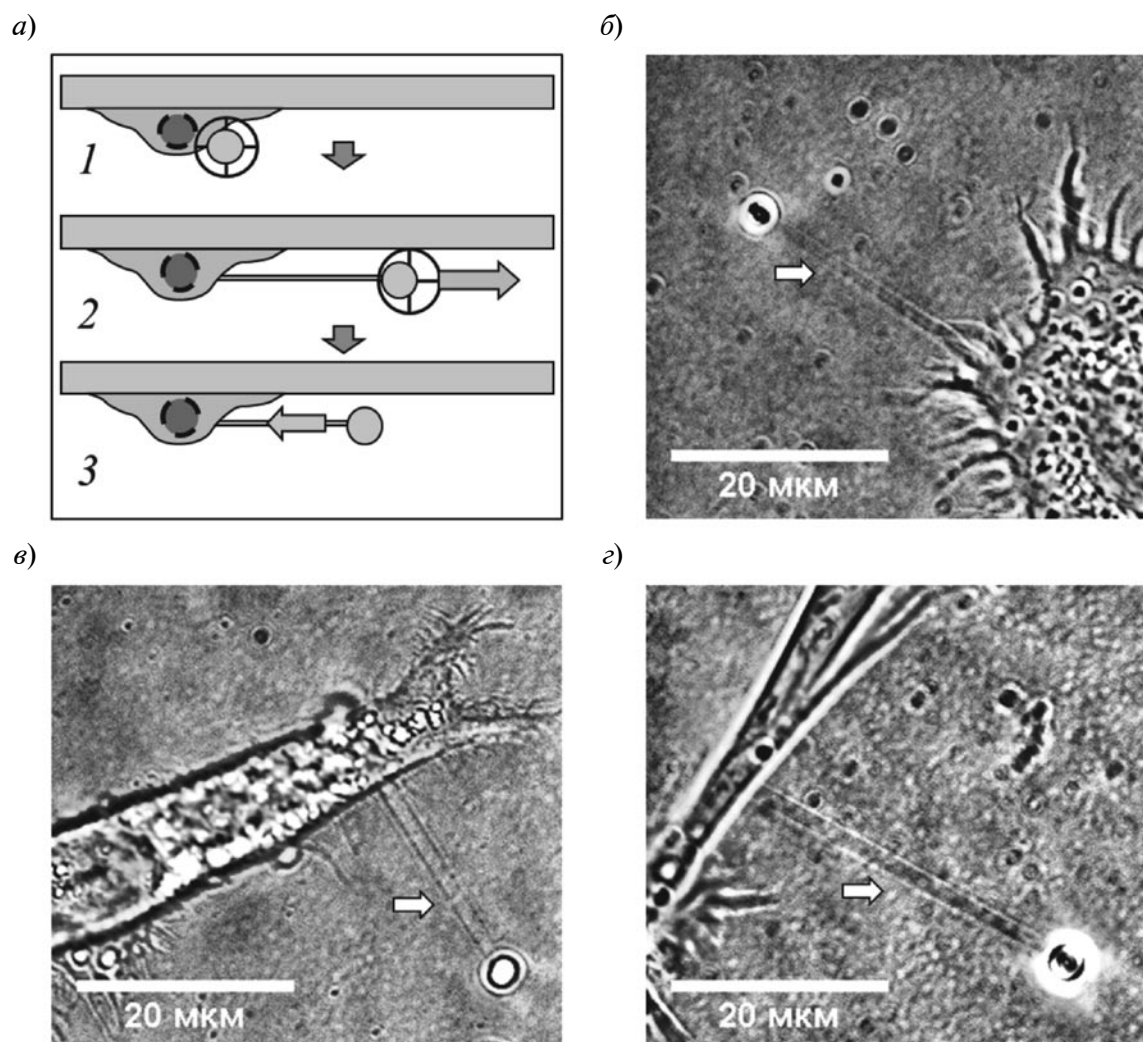


Рис. 1. Схема эксперимента (а) по формированию мембранных тубулярных структур (МТС) из клеток HepG2 и изображения МТС (показаны стрелками) в режиме дифференциального интерференционного контраста (б – з).

1 – закрепление микросферы на клеточной мембране; 2 – формирование МТС; 3 – регистрация динамики возврата микросферы к поверхности клетки после выключения оптической ловушки

По окончании эксперимента проводится калибровка оптической ловушки по силе вязкого трения. Для этого образец перемещается относительно микросферы в ОЛ при помощи пьезостолика с заданной скоростью попеременно в противоположных направлениях. При этом микросфера смещается из центра ловушки на расстояние, пропорциональное силе вязкого трения, действующей на движущуюся микросферу (указанная сила скомпенсирована силой, действующей на микросферу со стороны ОЛ). Траектория микросферы регистрируется при помощи

ПЗС-камеры Andor, что позволяет определить зависимость силы, действующей на микросферу со стороны ОЛ, от смещения микросферы из центра ОЛ.

Обработка экспериментальных данных. Экспериментальные данные обрабатывались при помощи программного пакета ImageJ [23] (набор подпрограмм Fiji [24]). Для определения положения микросферы изображение инвертировалось, обрабатывалось фильтром высоких частот, после чего определялся центр масс изображения микросферы.

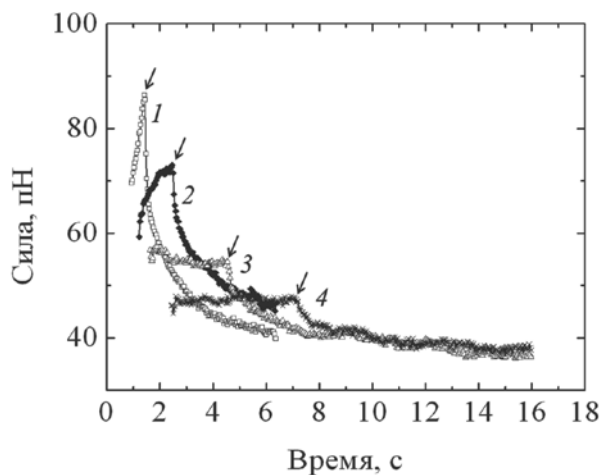


Рис. 2. Зависимости силы, действующей на микросферу, от времени в ходе эксперимента по формированию МТС из клеток НерG2 при различных скоростях удлинения МТС, мкм/с: 20 (1), 10 (2), 5 (3) и 3 (4); стрелки указывают моменты прекращения удлинения МТС

Результаты и их обсуждение

Описанная выше экспериментальная процедура позволила успешно осуществлять формирование МТС из мембран гепатоцитов человека (клеточная линия НерG2). На рис. 1, б – г представлены изображения МТС в режиме дифференциального интерференционного контраста. Для подчеркивания слабоконтрастных МТС на фоне высоко контрастных изображений клеток НерG2, изображения обработаны фильтром CLANE из пакета Fiji, позволяющим усилить локальный контраст.

В результате эксперимента были получены временные зависимости силы, действующей на микросферу в ходе формирования МТС, при различных скоростях удлинения МТС (рис. 2). С увеличением скорости уд-

линения МТС сила, действующая на микросферу, растет. Линейная регрессия этой зависимости позволила определить стационарную силу натяжения мембраны (она составила 40 ± 3 пН), а также обобщенную вязкость мембраны [25] ($0,27 \pm 0,07$ пН·с/мкм). При низких скоростях удлинения МТС данный процесс носит квазистационарный характер: сила, действующая на микросферу, не зависит от длины МТС. В то же время при более высокой скорости удлинения МТС квазистационарность процесса нарушается. Данный эффект ранее не был описан в литературе и, по всей видимости, наблюдается впервые.

Кроме того, анализ релаксационных кривых силы после прекращения удлинения МТС показал, что процесс релаксации имеет многостадийный характер и плохо описывается одной затухающей экспоненциальной функцией. Для описания зависимости от времени силы, действующей на микросферу со стороны МТС при постоянной длине МТС, требуется не менее двух затухающих экспоненциальных функций. При этом характерные времена обеих экспонент уменьшаются с увеличением скорости удлинения МТС (см. таблицу).

Также была проанализирована кинетика сокращения МТС после выключения ОЛ. На рис. 3, а приведен пример зависимости длины МТС от времени в ходе этого процесса. Знание траектории микросферы позволяет проанализировать уравнение движения последней под действием силы со стороны МТС, а также силы вязкого трения. Уравнение движения микросферы в данном случае можно записать как

$$ma = F_t(t) - 6\pi R\mu V, \quad (1)$$

где m – масса микросферы (8,3 пг); a – ускорение микросферы; F_t – сила, дей-

Зависимость характерных времен релаксации силы, действующей на микросферу со стороны МТС, от скорости удлинения МТС

Скорость удлинения МТС, мкм·с ⁻¹	Характерное время релаксации компоненты, с	
	быстрой	медленной
2	$0,204 \pm 0,06$	$8,4 \pm 3,3$
3	$0,195 \pm 0,05$	$3,7 \pm 0,4$
5	$0,11 \pm 0,01$	$1,9 \pm 0,1$
10	$0,050 \pm 0,002$	$1,40 \pm 0,02$

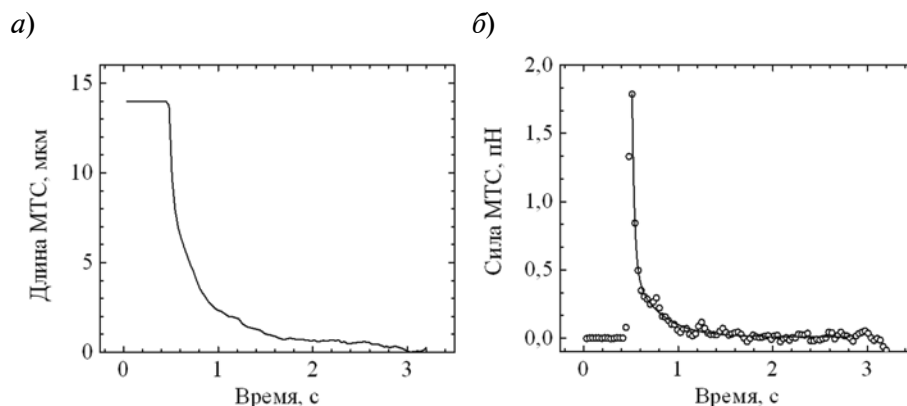


Рис. 3. Кинетика сокращения МТС после момента выключения оптической ловушки ($t = 0,5$ с): *а* – изменение длины МТС, *б* – изменение силы, действующей на микросферу

ствующая на микросферу со стороны МТС; R – радиус микросферы (1,25 мкм); V – скорость микросферы; μ – динамическая вязкость среды (0,0084 Пуаз [26]).

Таким образом, зная траекторию микросферы $x(t)$, выражение для силы $F_t(t)$ можно определить как

$$F_t(t) = md^2x(t) / dt^2 + 6\pi R\mu dx(t) / dt. \quad (2)$$

Анализ траектории показал, что первое слагаемое в уравнении (2) на три порядка меньше второго. Следовательно, уравнение для силы, действующей на микросферу со стороны МТС, можно записать в упрощенном виде:

$$F_t(t) \approx 6\pi R\mu dx(t)/dt. \quad (3)$$

На рис. 3, *б* приведен пример зависимости $F_t(t)$, полученной на основании траектории микросферы (рис. 3, *а*) по формуле (3). Данный анализ показал, что после выключения оптической ловушки сила натяжения МТС резко снижается, причем этот процесс описывается двухэкспоненциальной кинетикой с характерными временами 330 ± 20 и 27 ± 2 мс. Быстрое снижение силы МТС до значений, которые ниже стационарного натяжения мембраны, свидетельствует о наличии лимитирующей стадии в процессе релаксации МТС. Последняя может быть связана с затрудненным прохождением мембраны через основания МТС. В пользу этой гипотезы также свидетельствует тот факт, что толщина МТС в ходе релаксации существенно увеличивается (данные не представлены).

Методика формирования МТС при помощи оптической ловушки позволила впервые определить абсолютные величины механических характеристик (натяжения и вязкости) клеточных мембран гепатоцитов человека (клеточная линия HepG2). Стационарная сила натяжения мембраны составила 40 ± 3 пН, а обобщенная вязкость мембраны составила $0,27 \pm 0,07$ пН·с/мкм.

Кроме того, впервые были охарактеризованы релаксационные процессы при прекращении удлинения МТС, а также при сокращении МТС после выключения ОЛ. Показано, что в обоих случаях релаксационные процессы имеют сложный, двухэкспоненциальный характер. Кроме того, характерные времена обеих компонент релаксации силы натяжения МТС после окончания удлинения снижаются с увеличением скорости предшествующего удлинения. Также впервые наблюдался нестационарный характер процесса удлинения МТС при больших (10 мкм/с и выше) скоростях удлинения.

Измеренное значение обобщенной вязкости близко к ранее полученному для конусов роста нейронов межпозвоночного ганглия цыпленка ($0,2$ пН·с/мкм [15]). При этом стационарная сила натяжения МТС клеток HepG2 существенно больше значений, полученных для конусов роста нейронов (6 пН [15]), и практически совпадает со значениями, полученным для клеточной линии фибробластов мыши 3T3 (40 пН [27]) и для сперматозоидов червя-нематоды *C.elegans* (36 пН [28]).

Таким образом, продемонстрирована применимость методики измерения натяжения и вязкости клеточных мембран посредством формирования МТС при помощи оптической ловушки для изучения гепатоцитов человека. Этот подход позволит по-новому взглянуть на взаимосвязь различных факторов (этанола, лекарственных препаратов, паталогических процессов, старения) с механическими параметрами мембран клеток печени. Кроме того, возможность про-

ведения измерений на уровне одиночных клеток позволяет оценить разброс и динамику механических свойств мембран клеток печени.

Работа проведена с использованием уникальной установки «Лазерный пинцет» при финансовой поддержке Минобрнауки России (ГК № 14.518.11.7034, стипендия Президента России № СП-5651.2013.4), РФФИ (гранты №12-04-31536 и №12-04-32060) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «УМНИК».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Schuller, A.** The fluidity of liver plasma membranes from patients with different types of liver injury [Text] / A. Schuller, J.A. Solis-Herruzo, J. Moscat [et al.] // *Hepatology*. – 1986. – Vol. 6. – № 4. – P. 714–717.
2. **Schachter, D.** Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes [Text] / D. Schachter // *Hepatology*. – 1984. – Vol. 4. – № 1. – P. 140–151.
3. **Gordon, L.M.** Spin label studies on rat liver and heart plasma membranes: Effects of temperature, calcium, and lanthanum on membrane fluidity [Text] / L.M. Gordon, R.D. Sauerheber, J.A. Esgate // *J. Supramol. Struct.* – 1978. – Vol. 9. – № 3. – P. 299–326.
4. **Gordon, L.M.** The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes [Text] / L.M. Gordon, R.D. Sauerheber, J.A. Esgate [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1980. – Vol. 255. – № 10. – P. 4519–4527.
5. **Sauerheber, R.D.** Spin label studies on rat liver plasma membrane: Calcium effects on membrane fluidity [Text] / R.D. Sauerheber, L.M. Gordon // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1975. – Vol. 150. – № 1. – P. 28–31.
6. **Polokoff, M.A.** Chronic ethanol increases liver plasma membrane fluidity [Text] / M.A. Polokoff, T.J. Simon, R.A. Harris [et al.] // *Biochemistry*. – 1985. – Vol. 24. – No. 13. – P. 3114–3120.
7. **Schuller, A.** The fluidity of plasma membranes from ethanol-treated rat liver [Text] / A. Schuller, J. Moscat, E. Diez [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 1984. – Vol. 64 – № 1. – P. 89–95.
8. **Shi, Q.Y.** Effects of ursodeoxycholic acid on the liver plasma membrane fluidity, hepatic glutathione concentration, hepatic estrogen receptors and progesterone receptors in pregnant rats with ethinylestradiol and progesterone induced intrahepatic cholestasis [Text] / Q.Y. Shi, B.H. Kong, K.D. Ma [et al.] // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. – 2003. – Vol. 38. – № 11. – P. 680–682.
9. **Goldstein, D.B.** The effects of drugs on membrane fluidity [Text] / D.B. Goldstein // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1984. – Vol. 24. – P. 43–64.
10. **Hashimoto, M.** Relationship between age-related increases in rat liver lipid peroxidation and bile canalicular plasma membrane fluidity [Text] / M. Hashimoto, M.H. Shahdat, T. Shimada [et al.] // *Exp. Gerontol.* – 2001. – Vol. 37. – № 1. – P. 89–97.
11. **Chen, Y.** The constitutive equation for membrane tether extraction [Text] / Y. Chen, D.K. Yao, J.Y. Shao // *Ann. Biomed. Eng.* – 2010. – Vol. 38. – № 12. – P. 3756–3765.
12. **Dai, J.** Membrane tether formation from blebbing cells [Text] / J. Dai, M.P. Sheetz // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 77. – № 6. – P. 3363–3370.
13. **Schumacher, K.R.** Computational analysis of the tether-pulling experiment to probe plasma membrane-cytoskeleton interaction in cells [Text] / K.R. Schumacher, A.S. Popel, B. Anvari [et al.] // *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter. Phys.* – 2009. – Vol. 80. – № 4. – Pt. 1. – 041905 p.
14. **Ashkin, A.** Internal cell manipulation using infrared laser traps [Text] / A. Ashkin, J.M. Dziejczak // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1989. – Vol. 86. – № 20. – P. 7914–7918.
15. **Dai, J.** Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers [Text] / J. Dai, M.P. Sheetz // *Biophys. J.* – 1995. – Vol. 68. – № 3. – P. 988–996.
16. **Jauffred, L.** Visco-elastic membrane tethers extracted from *Escherichia coli* by optical tweezers [Text] / L. Jauffred, T.H. Callisen, L.B. Oddershede // *Biophys. J.* – 2007. – Vol. 93. – № 11. – P. 4068–4075.
17. **Li, Z.** Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers [Text] / Z. Li, B.

Anvari, M. Takashima [et al.] // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 82. – № 3. – P. 1386–1395.

18. **Ashkin, A.** Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles [Text] / A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, S. Chu // *Opt. Lett.* – 1986. – Vol. 11. – № 5. – P. 288 p.

19. **Ericsson, M.** Sorting out bacterial viability with optical tweezers [Text] / M. Ericsson, D. Hanstorp, P. Hagberg [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – № 19. – P. 5551–5555.

20. **Liu, Y.** Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers [Text] / Y. Liu, D.K. Cheng, G.J. Sonek [et al.] // *Biophys. J.* – 1995. – Vol. 68. – № 5. – P. 2137–2144.

21. **Побегалов, Г.Е.** Изменение механических свойств молекулы ДНК при взаимодействии с интеркалирующим красителем YOYO-1 [Текст] / Г.Е. Побегалов, А.Н. Арсениев, А.Д. Ведяйкин [и др.] // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. – 2013. – № 1(165). – С. 136–143.

22. **Сабанцев, А.В.** Модернизация флуоресцентного микроскопа для исследования биологических структур с субдифракционным разрешением [Текст] / А.В. Сабанцев, Г.Е. Побегалов, С.В. Мурашов [и др.]. // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. – 2012. – № 2. – С. 94–99.

23. **Schneider, C.A.** NIH image to image J.: 25 years of image analysis [Text] / C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri // *Nat. Methods.* – 2012. – Vol. 9. – № 7. – P. 671–675.

24. **Schindelin, J.** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis [Text] / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // *Nat. Methods.* – 2012. – Vol. 9. – № 7. – P. 676–682.

25. **Hochmuth, F.M.** Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones [Text] / F.M. Hochmuth, J.Y. Shao, J. Dai, M.P. Sheetz // *Biophys. J.* – 1996. – Vol. 70. – № 1. – P. 358–369.

26. **Gosgnach, W.** Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: Role of oxidative stress [Text] / W. Gosgnach, D. Messika-Zeitoun, W. Gonzalez [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – № 6. – P. C1880–C1888.

27. **Pontes, B.** Cell cytoskeleton and tether extraction [Text] / B. Pontes, N.B. Viana, L.T. Salgado [et al.] // *Biophys. J.* – 2011. – Vol. 101. – № 1. – P. 43–52.

28. **Batchelder, E.L.** Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization [Text] / E.L. Batchelder, G. Holloper, C. Campillo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – № 28. – P. 11429–11434.

REFERENCES

1. **Schuller A., Solis-Herruzo J.A., Moscat J. et al.** The fluidity of liver plasma membranes from patients with different types of liver injury. *Hepatology*, 1986, Vol. 6, № 4, pp. 714–717.

2. **Schachter D.** Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. D. Schachter *Hepatology*, 1984, Vol. 4, № 1, pp. 140–151.

3. **Gordon L.M., Sauerheber R.D., Esgate J.A.** Spin label studies on rat liver and heart plasma membranes: Effects of temperature, calcium, and lanthanum on membrane fluidity. *J. Supramol Struct*, 1978, Vol. 9, № 3, pp. 299–326.

4. **Gordon L.M., Sauerheber R.D., Esgate J.A. et al.** The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *J. Biol Chem*, 1980, Vol. 255, № 10, pp. 4519–4527.

5. **Sauerheber R.D., Gordon L.M.** Spin label studies on rat liver plasma membrane: Calcium effects on membrane fluidity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 1975, Vol. 150, № 1, pp. 28–31.

6. **Polokoff M.A., Simon T.J., Harris R.A. et al.** Chronic ethanol increases liver plasma membrane fluidity. *Biochemistry*, 1985, Vol. 24, № 13, pp. 3114–3120.

7. **Schuller A., Moscat J., Diez E. et al.** The fluidity of plasma membranes from ethanol-treated rat liver. *Mol. Cell. Biochem*, 1984, Vol. 64, № 1, pp. 89–95.

8. **Shi Q.Y., Kong B.H., Ma K.D. et al.** Effects of ursodeoxycholic acid on the liver plasma membrane fluidity, hepatic glutathione concentration, hepatic estrogen receptors and progesterone receptors in pregnant rats with ethinylestradiol and progesterone induced intrahepatic cholestasis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2003, Vol. 38, № 11, pp. 680–682.

9. **Goldstein D.B.** The effects of drugs on membrane fluidity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 1984, Vol. 24, pp. 43–64.

10. **Hashimoto M., Shahdat M.H., Shimada T. et al.** Relationship between age-related increases in rat liver lipid peroxidation and bile canalicular plasma membrane fluidity. *Exp. Gerontol*, 2001, Vol. 37, № 1, pp. 89–97.

11. **Chen Y., Yao D.K., Shao J.Y.** The constitutive equation for membrane tether extraction. *Ann. Biomed. Eng*, 2010, Vol. 38, № 12, pp. 3756–3765.

12. **Dai J., Sheetz M.P.** Membrane tether formation from blebbing cells. *Biophys. J*, 1999, Vol. 77, № 6, pp. 3363–3370.

13. **Schumacher K.R., Popel A.S., Anvari B. et al.** Computational analysis of the tether-pulling experiment to probe plasma membrane-cytoskeleton interaction in cells. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter. Phys.*, 2009, Vol. 80, № 4, Pt. 1, p. 041905.
14. **Ashkin A., Dziedzic J.M.** Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, Vol. 86, № 20, pp. 7914–7918.
15. **Dai J., Sheetz M.P.** Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers. *Biophys. J.*, 1995, Vol. 68, № 3, pp. 988–996.
16. **Jauffred L., Callisen T.H., Oddershede L.B.** Visco-elastic membrane tethers extracted from *Escherichia coli* by optical tweezers. *Biophys. J.*, 2007, Vol. 93, № 11, pp. 4068–4075.
17. **Li Z., Anvari B., Takashima M. et al.** Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers. *Biophys. J.*, 2002, Vol. 82, № 3, pp. 1386–1395.
18. **Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E., Chu S.** Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 1986, Vol. 11, № 5, p. 288.
19. **Ericsson M., Hanstorp D., Hagberg P.** Sorting out bacterial viability with optical tweezers. et al. *J. Bacteriol.*, 2000, Vol. 182, № 19, pp. 5551–5555.
20. **Liu Y., Cheng D.K., Sonek G.J. et al.** Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers. *Biophys. J.*, 1995, Vol. 68, № 5, pp. 2137–2144.
21. **Pobegalov G.E., Arseniev A.N., Vedyaykin A.D., Sokolova M.L., Fedorova Ya.V., Sabantsev A.V.** Changing of DNA molecule mechanical properties during interaction with YOYO-1 intercalating dye. *St. Petersburg State Polytechnical University Journal: Physics and mathematics*, 2013, № 1(165), pp. 136–143. (rus)
22. **Sabantsev A.V., Pobegalov G.E., Murashov S.V., Mel'nikov A.S., Khodorkovskii M.A.** The fluorescent microscope upgrading to investigate biological structures with subdiffractional resolution. *St. Petersburg State Polytechnical University Journal: Physics and mathematics*, 2012, № 2(146), pp. 94–99. (rus)
23. **Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W.** NIH image to image J.: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 2012, Vol. 9, № 7, pp. 671–675.
24. **Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al.** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 2012, Vol. 9, № 7, pp. 676–682.
25. **Hochmuth F.M., Shao J.Y., Dai J., Sheetz M.P.** Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys. J.*, 1996, Vol. 70, № 1, pp. 358–369.
26. **Gosgnach W., Messika-Zeitoun D., Gonzalez W. et al.** Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: Role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2000, Vol. 279, № 6, pp. C1880–C1888.
27. **Pontes B., Viana N.B., Salgado L.T. et al.** Cell cytoskeleton and tether extraction. *Biophys. J.*, 2011, Vol. 101, No. 1, pp. 43–52.
28. **Batchelder E.L., Hollopeter G., Campillo C. et al.** Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, № 28, pp. 11429–11434.

МОРОЗОВА Наталия Евгеньевна — студентка Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
natashamor@rambler.ru

ВЕДЯЙКИН Алексей Дмитриевич — студент Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
god-fish@mail.ru

САБАНЦЕВ Антон Владимирович — аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
sabantsev.a.v@gmail.com

ПОБЕГАЛОВ Георгий Евгеньевич — аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
lwdrums@gmail.com

МУРАШОВ Сергей Вадимович — кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Проблемной научно-исследовательской лаборатории Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
smurashov@cef.spbstu.ru

ХОДОРКОВСКИЙ Михаил Алексеевич — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Проблемной научно-исследовательской лаборатории Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
khodorkovskii@mail.ru