

Сканирующая капиллярная микроскопия в исследовании опухолевых клеток и клеток крови

И. В. Яминский^{1,4,*}, Т. О. Советников^{1,4,†}, А. И. Ахметова^{2,4,‡}, М. А. Тихомирова^{2,3,§}

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
физический факультет, кафедра физики полимеров и кристаллов.*

Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А. Н. Белозерского
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40*

*Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова РАН. Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26
ООО НПП «Центр перспективных технологий». Россия, 119311, Москва, ул. Строителей, 4-5-47*

(Поступила в редакцию 21.05.2022; подписана в печать 02.06.2022)

Сканирующая ион-проводящая микроскопия или сканирующая капиллярная микроскопия (СКМ) — одна из методик сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), основанная на использовании нанокapилляров. Основными преимуществами СКМ перед остальными методами СЗМ являются несиловое воздействие на объект исследования в процессе измерения, а также возможность проводить измерения в естественной среде — в жидкости, вследствие чего эта методика стала активно использоваться в биологических и медицинских исследованиях.

Сегодня СКМ может использоваться для мультипараметрического анализа поверхности вещества и проходящих вблизи нее процессов. В биоприложениях СКМ самыми актуальными направлениями работ являются изучение живых систем с широким временным разрешением (от минут до дней) и разработка методик адресной доставки веществ к поверхности исследуемого объекта с целью изучения его отклика на внешнее воздействие.

В данной работе представлены результаты исследования морфологии клеток карциномы человека и жизненного цикла эритроцитов крови человека с помощью капиллярной микроскопии. Капиллярная микроскопия при этом позволяет не только визуализировать исследуемые объекты, но и дает возможность получать и использовать ряд экспериментальных данных в диагностических целях.

PACS: 87.57.-s.

УДК: 576.314.

Ключевые слова: капиллярная микроскопия, сканирующая ион-проводящая микроскопия, морфология клеток, карцинома человека, раковые клетки, клетки крови.

ВВЕДЕНИЕ

Впервые методика сканирующей капиллярной микроскопии была представлена в статье Пола Хансмы и соавторов [1], где помимо непосредственного описания устройства прибора отмечаются некоторые важные аспекты перспектив его дальнейшего использования: отсутствие силового воздействия на образец при сканировании, перспектива в достижении разрешения в масштабе внутреннего диаметра капилляра (порядка десятков нанометров) и возможность измерения локальных ионных токов из пор на поверхности клеток.

Эти факты вызвали большой интерес в применении методики СЗМ, однако существенные ограничения накладывала методика сканирования в эквидистантном режиме, которая оказывалась неприспособленной к значительным резким перепадам высоты, приводя к возможному столкновению капилляра с образцом. Прогресс в развитии и применении СКМ произошел в связи с разработкой прыжкового режима (англ. «hopping mode»).

Несиловая (неконтактная) природа СКМ в сочетании с широким спектром измеряемых параметров образца сделали ее особенно актуальной при изучении живых клеток. Пол Хансма с соавторами исследовали области высокой проводимости для выявления пор в мембране [1], в последующих работах рассматривали визуализацию синтетических [2] и биологических [3] нанопор и их количественные измерения.

Первые исследования морфологии клеток были проведены в 1997 г. [4]. Впоследствии появилось все больше работ, посвященных этой теме: рассматриваются не только морфологические свойства, но и их связь с физиологией для различных типов клеток [5]. В центре внимания процессы регуляции объема, генерируемые гипертоническим или гипотоническим стрессом, а также изменения формы клеток и топографии мембран, возникающие в результате молекулярной или фармацевтической стимуляции [6]. СКМ использовалась для исследования механических реакций живых клеток, таких как влияние хронического гетерогенного напряжения сдвига на морфологию эндотелиальных клеток [7] и жесткость плазматической мембраны при приложенном гидростатическом давлении [8].

Продолжается активное изучение клеточных мембран, где особую роль играет их временное наблюдение [9]. Недавно была предложена модернизация схе-

* yaminsky@nanoscopy.ru

† sovetnikov.to18@physics.msu.ru

‡ assel1505@yandex.ru

§ mariiatikh@gmail.com

мы СКМ [10], значительно улучшающая ее производительность как для высокоскоростной, так и для длительной покадровой визуализации.

Работы по широкому временному разрешению в наблюдении жизнедеятельности клеток и сопровождающих их процессов на сегодняшний день играют одну из ключевых ролей в развитии биоприложений СКМ.

1. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Рассмотрим схему капиллярного микроскопа (рис. 1). В качестве зонда в СКМ используется стеклянный капилляр, диаметр отверстия в котором имеет нанометровый масштаб и обычно составляет от нескольких десятков до нескольких сот нанометров. Капилляр и среда с образцом заполняются электролитом. Внутри капилляра помещают хлор-серебряный электрод (серебряную проволоку, покрытую хлоридом серебра), второй электрод помещается в чашку Петри с исследуемым образцом.

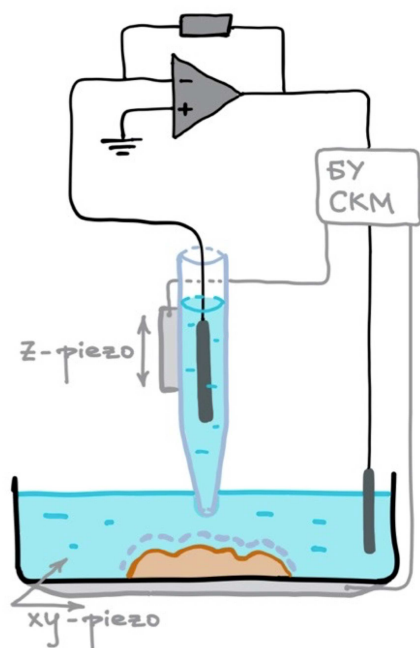


Рис. 1. Схема работы СКМ (БУ — блок управления, piezo — пьезоэлектрические подвижки)

Между электродами создается и поддерживается постоянная разность потенциалов (порядка нескольких сот милливольт), при этом система обратной связи анализирует величину протекающего между ними ионного тока (обычно составляющую несколько нА и отслеживаемую высокоточным усилителем). По изменению величины тока, проходящего через кончик капилляра, осуществляется аккуратное позиционирование зонда над образцом, что исключает деформацию объекта в процессе сканирования.

На сегодняшний день при работе на СКМ в подавляющем большинстве случаев используется прыжковый режим (или хоппинг мода, hopping mode), при котором ионный ток регистрируется при вертикальном перемещении капилляра, последовательно опускающегося к поверхности образца в различных точках (амплитуда перемещения капилляра при этом может достигать нескольких мкм, а контрольная точка падения величины ионного тока составляет около 1 % от величины тока на удалении от образца).

Установка СКМ собирается на базе инвертированного оптического микроскопа, что дает возможность наблюдения исследуемого образца и позволяет удобно позиционировать зонд при выборе области сканирования.

2. СКАНИРОВАНИЕ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

2.1. Подготовка образца и параметры сканирования

Клетки карциномы человека (HeLa, Российская коллекция клеточных культур человека, животных и растений, Институт цитологии, Санкт-Петербург, Россия) выращивали в среде ДЕМ (ПанЭко, Москва, Россия) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Logan, UT, США), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Москва, Россия) и раствора антибиотика-антимикотика (Gibco, Waltham, MA, USA). Фиксация клеток проводилась в 3.7 % параформальдегиде (PFA) в течении 10 мин, далее клетки отмывались в физрастворе (0.9 М NaCl), который в дальнейшем служил и в качестве электролитической среды в процессе сканирования.

Капилляры изготавливались на лазерном пуллере (P-1000, Sutter Instruments), диаметр отверстия капилляра около 90–110 нм.

Сканирование проводилось в прыжковом режиме, величина тока находилась в пределах 1.8–2.2 нА при напряжении 200 мВ, амплитуда и частота колебаний 1 мкм и 15 Гц, соответственно. Контрольная точка падения величины ионного тока составляла 1.2% от величины тока на удалении от образца. Размер кадра 10.3×10.3 мкм², разрешение 512×512 точек.

Постобработка снимков проводилась в ПО Фемто-Скан Онлайн [11] (Центр перспективных технологий, Россия) посредством трехпиксельной медианной фильтрации и выравнивания подложки на части снимков.

2.2. Результаты

В инвертированном оптическом микроскопе можно наблюдать самоорганизацию клеточных структур на подложке: они собираются в островки по несколько клеток, при этом заметны характерные отростки в местах присоединения клеток к подложке (рис. 2).

Таблица 1. Характеристики отростков HeLa клеток

Отросток	L , нм	$d(1/2)$, нм	$h(1/2)$, нм	Угол, °
O1	5170	≈ 300	≈ 80	62
O2	3180	≈ 380	≈ 90	94
O3	1504	≈ 320	≈ 235	137
O4	1920	≈ 285	≈ 330	146
O5	2850	≈ 170	≈ 670	142

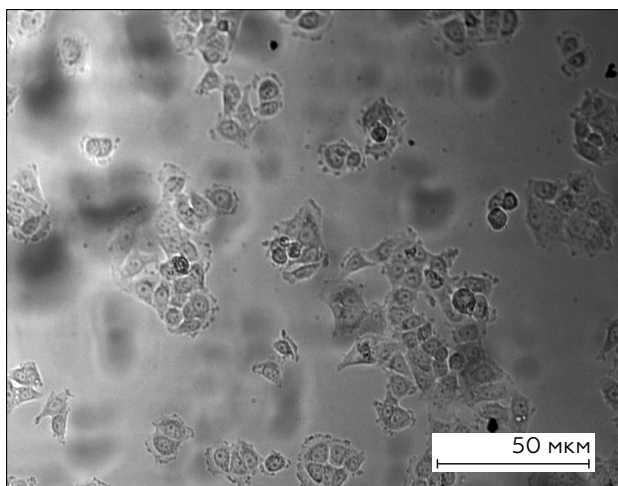


Рис. 2. Образец клеток HeLa на подложке с увеличением 10х, оптическая микроскопия

Далее оптические снимки получены при сорокакратном увеличении (40х).

Для изучения в капиллярном микроскопе были выбраны характерные структуры клеток.

Получена топография поверхности в различных областях одной группы клеток (рис. 3). Здесь и далее выделены контуры полученных на СКМ кадров.

На рис. 4 показана морфология клеточной поверхности, которая также прямо указывает на организацию субмембранных структур: различимо ядрышко клетки (показано желтым градиентом), что соотносится с данными оптической микроскопии (рис. 3, В).

Области клеточных ядер были дополнительно просканированы в участках значительных скоплений клеток (рис. 6). Аналогично предыдущим снимкам область ядрышка характеризуется повышением высот и хорошо соотносится с данными оптической микроскопии (рис. 5).

Также получены снимки клеточных отростков (рис. 7). Оптические снимки отростков в области прилегания клеточных структур к подложке представлены на рис. 8. В области «В» получено два кадра, при постобработке объединенные в один (рис. 7, В и Е).

СКМ, однако, позволяет не только визуализировать объекты в трехмерном масштабе, но и дает возможность получать и использовать ряд экспериментальных

данных в диагностических целях. Так, на основе полученных изображений измерена средняя шероховатость поверхности клеток, которая в области клеточных ядер составляет по показателю R_a 0.4 мкм, по среднеквадратичному отклонению R_q 0.5 мкм, а в области отростков 0.045 мкм и 0.06 мкм соответственно, что практически в 10 раз меньше.

Показатель R_a определяется как среднее арифметическое отклонение профиля от средней наклонной плоскости, проведенной методом наименьших квадратов. R_q показывает среднеквадратичное отклонение профиля поверхности относительно средней линии.

Количественно охарактеризованы и клеточные отростки. Их длина варьируется от 1.5 мкм (O3 на рис. 7, В) до 5 мкм (O1 на рис. 7, А), средняя высота отростков по данным сечения составляет 0.5 мкм.

Для каждого из отростков также измерены параметры длины L , ширины $d(1/2)$ и высоты $h(1/2)$ на половине длины и угла в направлении роста от родительского клеточного отростка. Результаты измерений приведены в табл. 1.

Отметим схожесть углов отрастания трех близких отростков O3-O5 на рис. 7, В.

3. СКАНИРОВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ

3.1. Подготовка образца и параметры сканирования

Препарат клеток собственной крови приготовлен путем помещения крови, забранной из пальца с использованием ланцета, в изотонический буфер Алена, который в дальнейшем служил и в качестве электролитической среды. Далее препарат наносился на свежеисколотую слюду, предварительно модифицированную полилизинном, нейтрализующим отрицательный заряд поверхности слюды и позволяющим «приклеить» живые клетки к подложке.

Сканирование проводилось капилляром с диаметром отверстия около 80 нм, частота колебаний в hopping mode составляла привычные 15 Гц, в то время как амплитуда была увеличена до 3 мкм вследствие значительного перепада высот на исследуемых клетках. Контрольная точка падения величины ионного тока составляла 1.2% от величины тока на удалении от образца. Размер кадра 10.3×10.3 мкм², разрешение 512×512 точек.

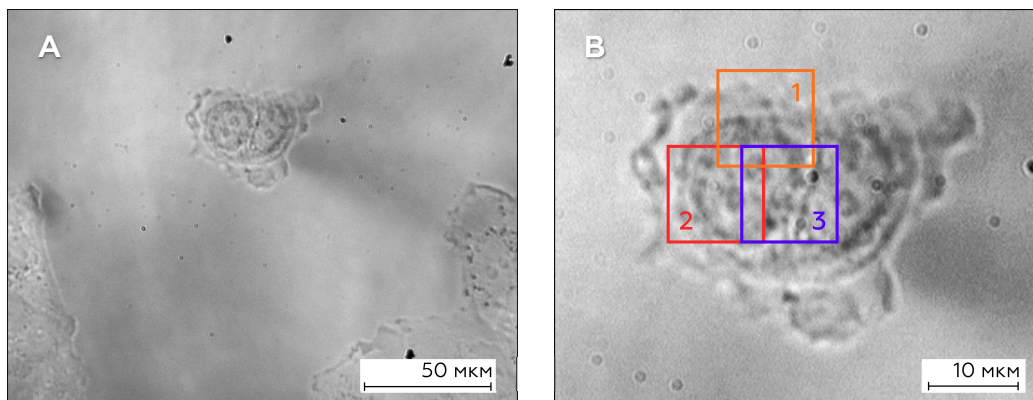


Рис. 3. Оптические снимки сканируемой группы четырех клеток HeLa (А) и три выбранные для сканирования в капиллярном микроскопе области (В), цветом выделены контуры трех разных кадров, которые соответствуют рис. 4

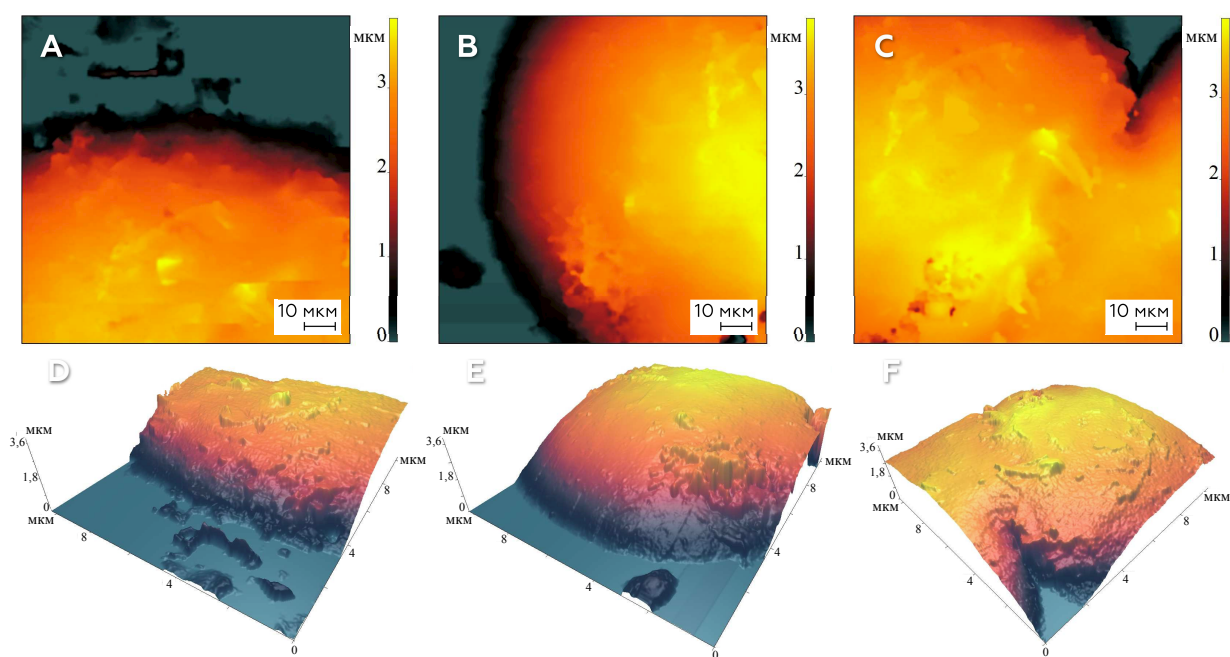


Рис. 4. 2D и 3D топография сканируемых областей: область 1 — А и D, область 2 — В и Е, область 3 — С и F

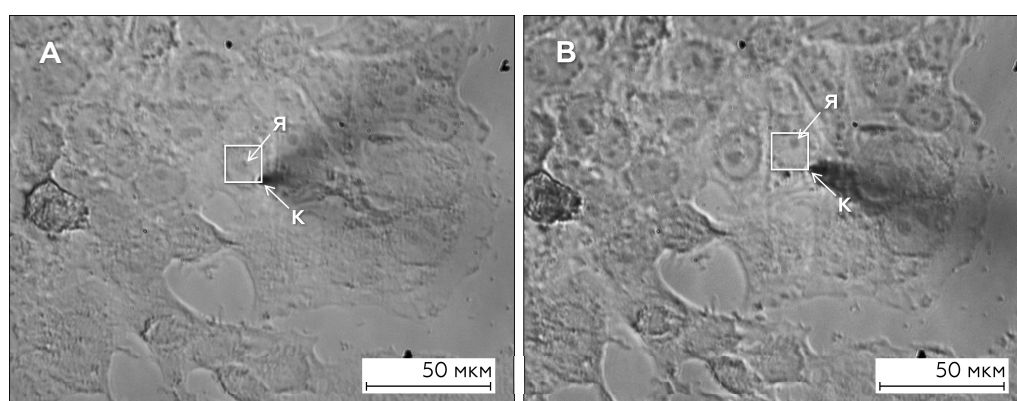


Рис. 5. Оптические снимки А и В сканируемых областей клеточных ядер с увеличением 40х. Стрелками К и Я отмечены кончик капилляра, который виден сквозь образец, и клеточное ядрышко соответственно

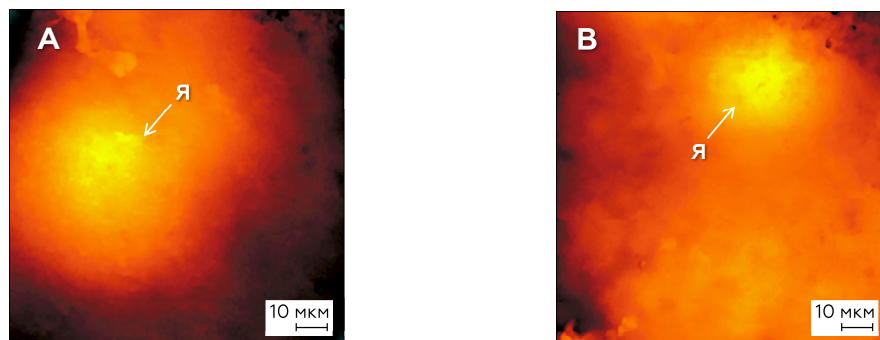


Рис. 6. 2D топография сканируемых областей, стрелкой Я показана область клеточного ядрышка

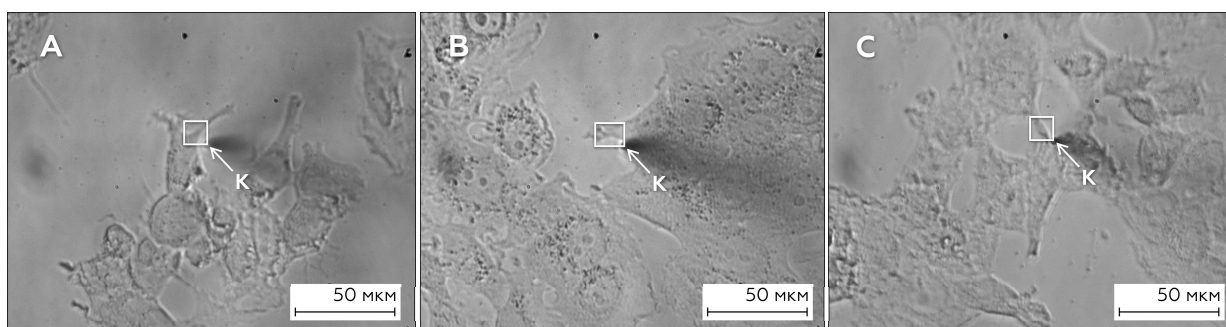


Рис. 7. 2D и 3D топография сканируемых областей, отмеченных на рис. 8: области А соответствуют А и D (рис. 8), области В соответствуют В и Е (рис. 8), области С — С и F (рис. 8). Стрелками О1 — О5 обозначены отростки клеток

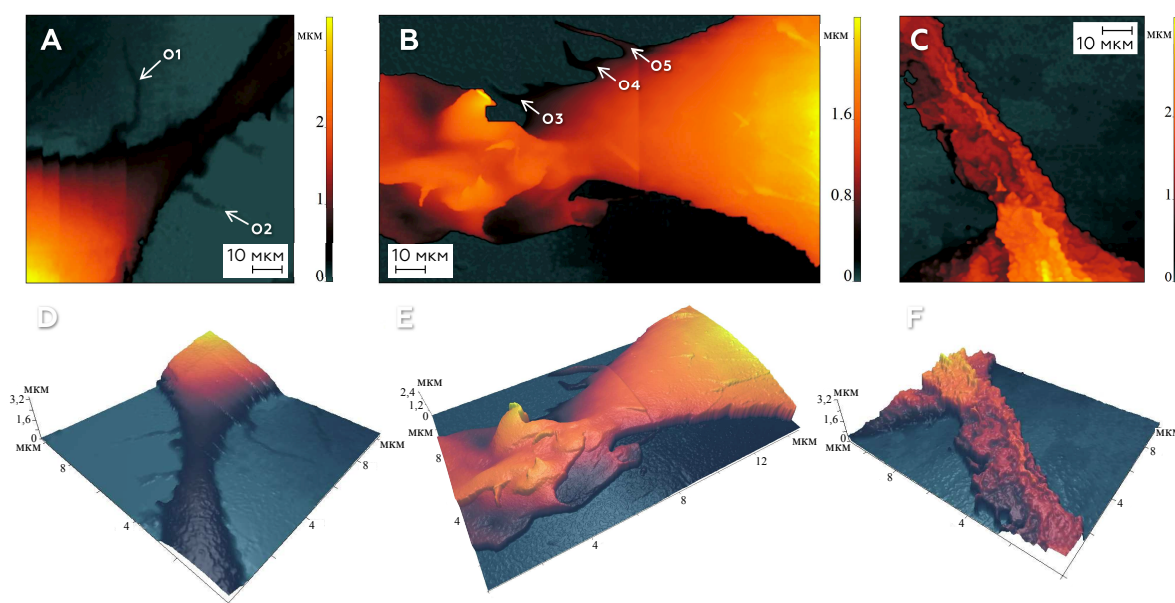


Рис. 8. Оптические снимки областей с отростками и выделенными областями сканирования на капиллярном микроскопе. Стрелкой (К) отмечен кончик капилляра

3.2. Результаты

В инвертированном оптическом микроскопе можно наблюдать превращение клеток крови от начального состояния дискоцитов в эхиноциты и далее в сформировавшиеся эхиноциты или сфероциты (рис. 9).

Исследовался жизненный цикл эхиноцитов крови: получены снимки дискоцита, переходящего в эхиноцит (рис. 10, А и D, снимок получен через 1 час после нанесения образца), формирующегося эхиноцита (рис. 10,

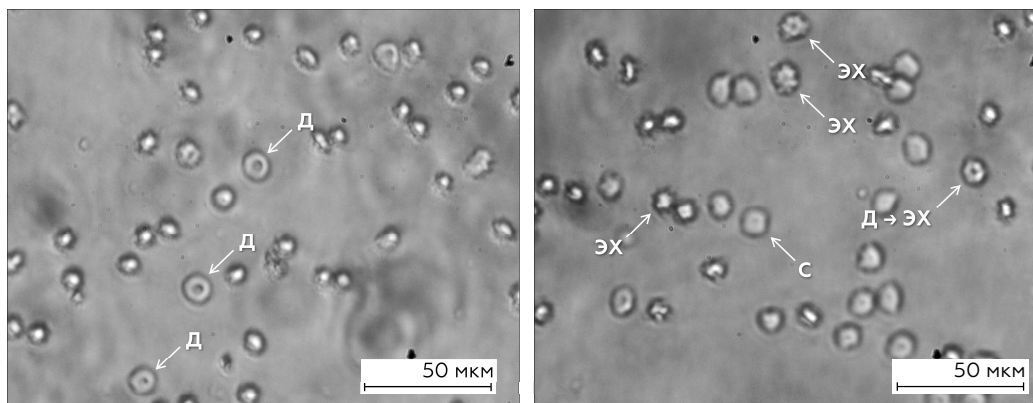


Рис. 9. Оптические снимки клеток крови в процессе сканирования. Стрелками отмечены дискоциты (Д), наблюдаемые сразу после нанесения, эхиноциты (ЭХ) и сфероцит (С). На правом кадре также можно наблюдать дискоцит, переходящий в эхиноцит (Д→ЭХ)

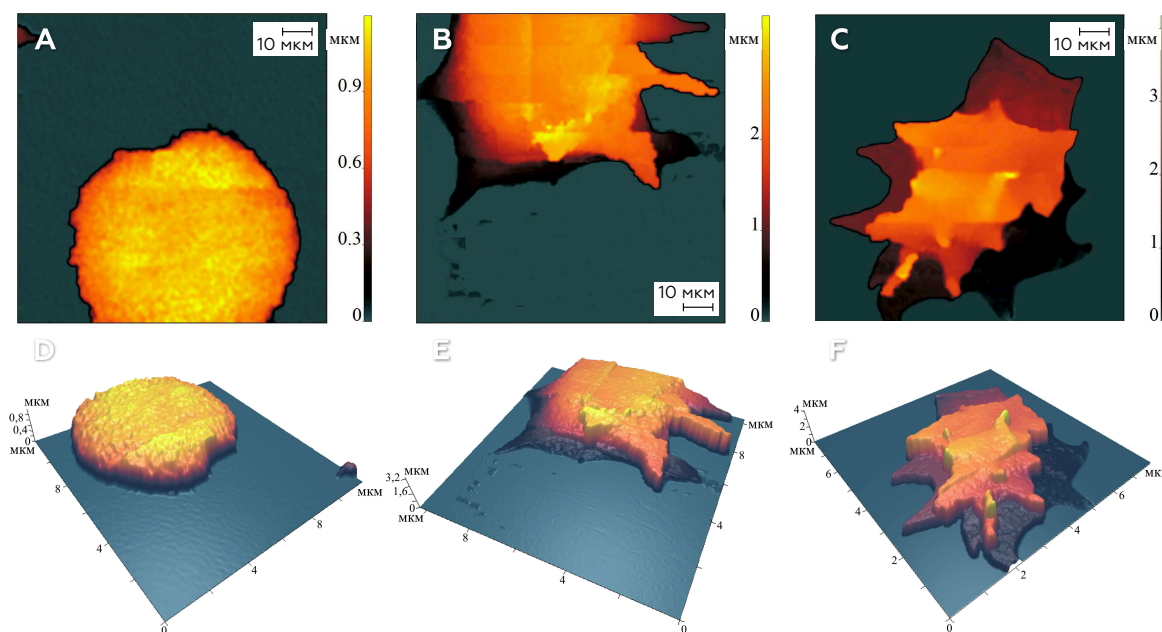


Рис. 10. 2D и 3D топография исследуемых клеток крови в различные моменты времени: начало формирования эхиноцита через 1 час после нанесения образца (А и D), формирующийся эхиноцит через 2 часа после нанесения (В и Е) и сформировавшийся эхиноцит через 3.5 часа (С и F)

В и Е, 2 часа после нанесения) и сформировавшегося эхиноцита (рис. 10, С и F, 3.5 часа после нанесения).

На этапах жизненного цикла хорошо видны изменения морфологии клеток. Происходит уменьшение латеральных размеров и заметное вытягивание клетки в высоту, что хорошо отражают характерные сечения клеток (рис. 11). При переходе в эхиноцит уходит углубление в центре клетки и на поверхности начинают образовываться шипы (рис. 11, А), средняя шероховатость составляет 0.25 мкм, среднеквадратичная 0.3 мкм. В процессе дальнейшего формирования эхиноцита образуются отростки в области прилегания к подложке и происходит укрупнение шипов (рис. 11, В), шероховатость снижается до 0.20 мкм

и 0.25 мкм соответственно. У сформировавшегося эхиноцита присутствуют уже характерные отростки и крупные шипы (рис. 11, С), шероховатость повышается до 0.33 и 0.45 мкм.

Совокупные данные измерений характерных продольных размеров, высот и шероховатости поверхности клеток приведены в табл. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сканирование клеток карциномы человека с последующей визуализацией и интерпретацией

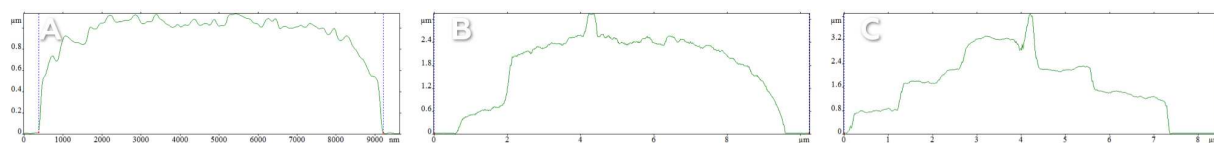


Рис. 11. Характерные сечения исследуемых клеток крови, соответствующие рис. 10 (А–С)

Таблица 2. Характеристики исследуемых клеток крови

Время с момента нанесения, часы	Латеральный размер, мкм	Высота, мкм	R_a , мкм	R_q , мкм
1	8.8	1.1	0.25	0.3
2	7–9	0.5–2 (отростки), 2.4 (средняя), 2.8 (шипы)	0.2	0.25
3.5	4.3–7.8	0.5–1 (отростки), 2.7 (средняя), 3–4 (шипы)	0.33	0.45

снимков: измерены шероховатости поверхностей и геометрические параметры характерных структур.

С помощью капиллярной микроскопии зарегистрирована кинетика трансформации эритроцита в эхиноцит с нанометровым пространственным разрешением.

Капиллярная микроскопия является в высшей степени полезным инструментом для визуализации топографии поверхности живых и фиксированных клеток с наноразмерным разрешением в жидкости. СКМ позволя-

ет бесконтактно визуализировать топографию сложных биологических образцов, определять дифференцировку клеток, связанную с диагностикой рака, а также осуществлять комплексную характеризацию клеток в процессе их жизненного цикла.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества (проект № 21-58-10005), Фонда содействия инноваций (проект №71108, договор 0071108) и Российского научного фонда (проект № 20-32-90036).

- [1] Hansma P.K., Drake B., Marti O., Gould S.A., Prater C.B. // Science. 1989. **243**, P. 641.
- [2] Pastre D., Iwamoto H., Liu J., Szabo G., Shao Z. // Ultramicroscopy. 2001. **90**, P. 13.
- [3] Korchev Y.E., Negulyaev Y.A., Edwards C.R., Vodyanoy I., Lab M.J. // Nat. Cell Biol. 2000. **2**, P. 616.
- [4] Korchev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M., Vodyanoy I., Lab M.J. // Biophys J. 1997. **73**, P. 653.
- [5] Perry D., Al Botros R., Momotenko D., Kinnear S.L., Unwin P.R. // ACS Nano. 2015. **9**(7), P. 7266.
- [6] Korchev Y.E., Gorelik J., Lab M.J., Soiderskaya E.V., Johnston C.L., Coombes C.R., Vodyanoy I., Edwards C.R. // Biophys. J. 2000. **78**, P. 451.
- [7] Potter C.M.F., Lundberg M.H., Harrington L.S., Warboys C.M., Warner T.D. // Arter. Thromb. Vasc. Biol. 2011. **31**, P. 384.
- [8] Sanchez D., Johnson N., Li C., Novak P., Rheinlander J. // Biophys. J. 2008. **95**, P. 3017.
- [9] Ubelmann F., Robine S., Louvard D. // In Cellular Domains. ed. IR Nabi. 2011. P. 213.
- [10] Leitao S.M., Drake B., Pinjusic K., Pierrat X., Navikas V., Nievergelt A.P., Brillard C., Djekic D., Radenovic A., Persat A. et al. // ACS Nano. 2021. **15**(11), P. 17613.
- [11] Ахметова А.И., Яминский И.В. // Медицина и высокие технологии. 2019. **1**, P. 16.

Scanning capillary microscopy in the study of tumor and blood cells

I.V. Yaminsky^{1,4,a}, T.O. Sovetnikov^{1,4,b}, A.I. Akhmetova^{2,4,c}, M.A. Tikhomirova^{2,3,d}

¹Physics of Polymers and Crystals Department, Faculty of Physics, Moscow State University. Moscow 119991, Russia

²Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119234, Russia

³Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences. Moscow 119334, Russia

⁴Advanced Technologies Center, Moscow, 119311, Russia

E-mail: ^ayaminsky@nanoscopy.ru, ^bsovetnikov.to18@physics.msu.ru, ^cassel1505@yandex.ru, ^dmariiatikh@gmail.com

Scanning ion-conductance microscopy or scanning capillary microscopy (SICM) is one of the methods of scanning probe microscopy (SPM) based on the use of nanocapillaries. The main advantages of SICM over other SPM methods are a non-violent

action on an object under study in the course of measurements and a possibility to conduct studies in the natural environment (in liquid). Therefore, this method has become widely used in biological and medical research.

Today SICM can be used for multiparametric analysis of the object's surface and processes occurring near it. In SICM bioapplications the most relevant areas of work are studies of living systems with a wide time resolution (from minutes to days) and development of methods for targeted agent delivery to the surface of the subject in order to study its response to external influences.

This paper presents the results of a study of the morphology of human carcinoma cells and the life cycle of human blood cells using ion-conductance microscopy. SICM allows not only the visualization in a three-dimensional scale, but also provides an opportunity to process a number of experimental data for diagnostic purposes.

PACS: 87.57.-s.

Keywords: scanning ion-conductance microscopy, cell morphology, human carcinoma, cancer cells, blood cells.

Received 21 May 2022.

Сведения об авторах

1. Яминский Игорь Владимирович — доктор физ.-мат. наук, профессор, ген. директор ООО НПП «Центр перспективных технологий», директор ООО «Энергоэффективные технологии»; email: yaminsky@nanoscopy.ru.
2. Советников Тимофей Олегович — студент, инженер; email: sovetnikov.to18@physics.msu.ru.
3. Ахметова Ассель Иосифовна — инженер, вед. специалист Центра перспективных технологий; email: assel1505@yandex.ru.
4. Тихомирова Мария Андреевна — мл. науч. сотрудник; email: mariiatikh@gmail.com.