

Новейшие достижения в области сканирующей ион-проводящей микроскопии и нанокapиллярных систем для анализа единичных клеток в физиологических условиях

Д.А. Шергин,^{1,*} А.П. Яковлев,^{1,†} П.В. Горелкин,^{1,‡} С.В. Салихов,¹ А.С. Ерофеев¹

¹ Университет науки и технологий МИСИС,
научно исследовательская лаборатория биофизики
Россия, 119049, Москва, Ленинский пр-кт, д. 4, стр. 1

(Поступила в редакцию 01.10.2023; после доработки 05.11.2023; подписана в печать 07.11.2023)

Изучение единичных клеток открывает возможности для понимания многих биологических процессов и, как следствие, играет важную роль в развитии биомедицины. Сканирующая ион-проводящая микроскопия (СИПМ) и нанокapиллярные системы для анализа единичных клеток представляют собой мощный инструмент для исследования морфологических, механических и биохимических особенностей живых клеток с нанометровым пространственным разрешением в условиях, близких к естественным. За последние десятилетия СИПМ показала большие успехи в изучении и манипулировании единичными клетками, а бесконтактный режим работы такой системы совместно с уникальными особенностями нанокapилляров, использующихся в качестве зонда, открыл новые возможности применения таких систем для биомедицинских приложений. В настоящем обзоре отражены новейшие тенденции и направления развития СИПМ и нанокapиллярных систем для анализа единичных клеток.

PACS: 87.18. Nq УДК: 577.359

Ключевые слова: нанокapилляр, анализ единичных клеток, СИПМ, автоматизированные системы, АСМ.

DOI: [10.55959/MSU0579-9392.78.2360701](https://doi.org/10.55959/MSU0579-9392.78.2360701)

ВВЕДЕНИЕ

Анализ единичных клеток открывает новые возможности и пути понимания развития широкого круга заболеваний [1–3]. Традиционные методы биохимического анализа предоставляют информацию о молекулярных и морфологических особенностях клеток, которые играют существенную роль в понимании физиологических и патологических процессов, протекающих в клетках [4–6]. Эти методы предоставляют усредненную информацию о клеточной популяции, но не демонстрируют незначительные изменения, протекающие в единичных клетках [7]. Такое усреднение не отражает шанс развития патологий в единичной клетке, что может сыграть ключевую роль при ранней диагностике заболеваний [8, 9]. Даже у генетически идентичных клеток могут наблюдаться серьезные фенотипические различия [10]. Именно поэтому исследование единичных клеток с высоким пространственным разрешением способствует развитию понимания механизмов клеточной деятельности.

За последнее десятилетие множество методов было адаптировано для анализа единичных клеток: сюда можно отнести атомно-силовую микроскопию (АСМ) [11], микрофлюидные технологии [12], на-

нокapиллярные системы [13], оптические и магнитные пинцеты [14, 15], СИПМ [16] и т.д. СИПМ выделяется на фоне других методов и имеет большой вклад в изучение единичных клеток за счет своей уникальности: бесконтактного метода сканирования, объема предоставляемых параметров для изучения, работы в нативных условиях. Одной из основных отличительных особенностей СИПМ является возможность одновременного сканирования образца с получением электрохимических или механических данных, а бесконтактный режим работы такой системы позволяет проводить исследования непосредственно на единичной клетке без прямого механического воздействия на нее [17–19]. Детальное сравнение СИПМ и других техник анализа единичных клеток было проведено в обзорах [20–22]. За последние несколько лет данный метод применялся для задач изучения влияния терапевтических агентов на различные компартменты опухолевых клеток методом локального измерения механических свойств [23], для электрохимического анализа [24], для детекции метаболитов [25]. Важным отличием СИПМ от сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и АСМ является малая инвазивность, что позволяет применять его для изучения таких сложных объектов как живая клетка, а высокая скорость сканирования позволяет наблюдать динамически протекающие процессы. В сравнении же с микроскопией визуализации времен жизни флуоресценции (FLIM) и оптической микроскопии СИПМ обладает гораздо большим разре-

* E-mail: Shergin-da@mail.ru

† E-mail: Iakovlev.ap@phs.misis.ru

‡ E-mail: Gorelkin.pv@phs.misis.ru

шением и к тому же не требующим дополнительных проб подготовки. Таким образом, СИПМ как метод изучения единичных клеток занимает одну из лидирующих позиций, предоставляя широкий спектр возможностей использования. Принцип работы «классического» СИПМ (рис. 1) подразумевает следующее: образец помещается на чашку Петри или культуральный планшет, размещенный на XY-сканере. Нанокapилляр с электролитом, в качестве которого выступает фосфатно-солевой буфер, устанавливается в Z-позиционер, размещенный над поверхностью образца. Во внутреннюю полость нанокapилляра помещается AgCl-электрод, в то время как второй AgCl-электрод сравнения помещается в чашку Петри (культуральный планшет). К электродам прикладывается разность потенциалов, создающая ионный ток, протекающий через острие нанокapилляра. Система обратной связи, основанная на изменении ионного тока, протекающего в системе, предотвращает прямой механический контакт между нанокapилляром и образцом. Регистрация перемещений нанокapилляра при сканировании образца позволяет строить топографическое изображение образца [26].

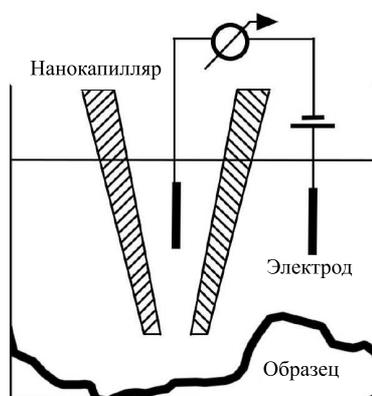


Рис. 1. Схема работы СИПМ

Поскольку СИПМ и нанокapиллярные системы имеют важное значение для исследования единичных клеток, в данном обзоре рассмотрены особенности применения и достижения в этих областях, в части: визуализации клеточной морфологии, анализа локальных механических свойств, а также изучения внутриклеточных биохимических процессов при помощи нанокapилляров.

1. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МОРФОЛОГИИ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТК ПРИ ПОМОЩИ СИПМ

Сканирующая ион-проводящая микроскопия является методом визуализации живых организмов в условиях, близких к физиологическим. Во-первых, СИПМ обладает очень высоким пространственным разрешением. Во-вторых, в отличие от

СЭМ СИПМ может исследовать живые объекты в условиях, близких к физиологическим. В-третьих, в отличие от АСМ СИПМ позволяет измерять легко деформируемые объекты с получением их физических характеристик [27], а также имеет большее пространственное разрешение, чем оптическая микроскопия.

Такие особенности помогают более детально изучать морфологию объектов, а условия проведения эксперимента позволяют наблюдать за динамикой процессов в реальном времени [28–30].

Одно из применений СИПМ — это визуализация морфологических особенностей, так, например, СИПМ был использован для визуализации живых тромбоцитов [31] и получения последовательности высокоскоростных топографических изображений U2OS-клетки остеосаркомы [32]. При помощи данного метода были осуществлены: количественный анализ наноразмерной динамики микроворсинок [33], динамика внеклеточных везикул, полученных из плазматической мембраны [34], архитектура пептидогликанов бактериальной стенки [35], пористые структуры клеток млекопитающих [36], визуализация немеченого секреторного белка в живых клетках [37], изучение антимикробной активности противогрибковых препаратов при кандидозном парапилезе [38].

В 2009 г. Pavel Novak и др. представили *hopping mode* — СИПМ, благодаря которому может быть получено топографическое изображение сложных объемных структур в полностью бесконтактном режиме с высоким пространственным разрешением (более 20 нм) [39]. Отличительной особенностью *hopping mode* является достижение вариативности разрешения: участки с низким распределением профиля имеют меньшее разрешение (меньше физически измеренных точек на один пиксель изображения), чем с высоким. Физический принцип метода (рис. 2) заключается в постоянном отводе-подводе (*hopping*) нанокapилляра к поверхности образца с варьирующимся числом измеряемых точек в зависимости от рельефа поверхности.

Уже в 2010 г.У. Takahashi с коллегами показали возможность получения топографических изображений объектов методом, похожим на *hopping mode*.

Принцип получения топографического изображения заключался в регистрации изменений ионного тока вследствие подвода нанокapилляра к поверхности образца: в тот момент, когда ионный ток уменьшался на заранее заданную величину (обычно 0.25–1% от начального значения) производилось измерение текущей позиции Z-координатного привода, а также отвод нанокapилляра от поверхности на исходную позицию. Далее производился расчет пройденного пути с дальнейшим составлением топографической карты поверхности и перемещением зонда к следующей измеряемой точке.

Masato Nakajima и др. в 2018 г. применили СИПМ в режиме *hopping mode* для получения топографических изображений тканей, взятых из тра-


 Рис. 2. Блок-схема принципа работы *hopping mode*

хеи и почки мышей [40]. Авторами было показано, что топография поверхности, получаемая методом СИПМ в режиме *hopping mode*, имеет высокое пространственное разрешение и позволяет осуществлять изучение морфологии объемных структур на поверхности живых (рис. 3, а). Более того, СИПМ-изображения были сопоставлены с СЭМ-изображениями, полученными от зафиксированных образцов (рис. 3, б). В работе было показано, что такие тонкие структуры, как реснички, находящиеся на поверхности мембраны клеток, гораздо лучше визуализируются методом СИПМ.

Авторами также была показана возможность получения топографии такой сложной структуры, как срез почечного клубка мыши. За счет развитой морфологии данной ткани применение «классического» СИПМ-метода является затруднительным, однако в режиме *hopping mode* появляется возможность детально изучить морфологические особенности данного объекта (рис. 4) [40].

В 2019 г. S. Watanabe и другими был продемонстрирован СИПМ с возможностью получения изображений с высокой скоростью и высоким разрешением (ВС СИПМ). Скорость передачи изображения была улучшена приблизительно в 100 раз по сравнению с «классическим» СИПМ [41]. Такое увеличение скорости было достигнуто за счет двух улучшенных характеристик: быстрого позициони-

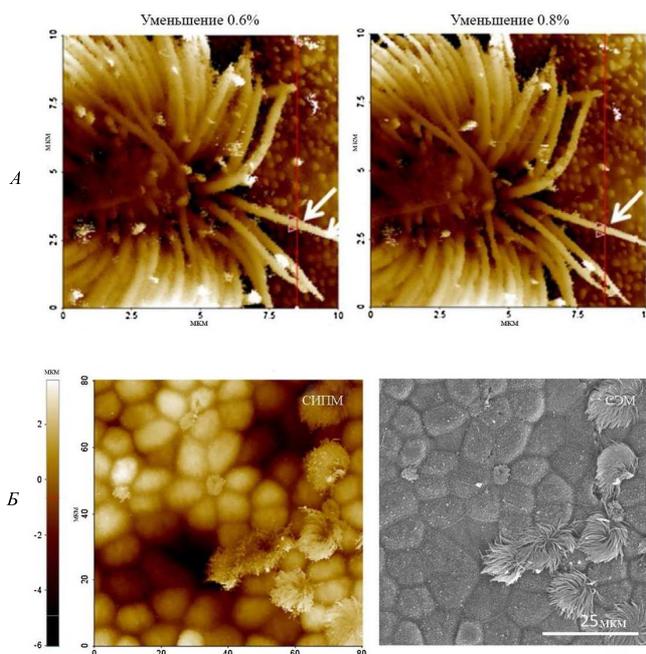


Рис. 3. Изображения, полученные при помощи СИПМ; А — Реснички, находящиеся на поверхности мембраны клеток, визуализированные методом СИПМ; Б — сравнение изображений, полученных методом СИПМ и СЭМ [40]

рования капилляра при помощи пьезопозиционера, а также улучшенного отношения значений сигнала и шумов. Первое было достигнуто благодаря разработанным технологиям быстрого сканирования и подавления вибрации, второе — за счет снижения электрического сопротивления внутри капилляра. Улучшенная конфигурация Z-сканера привела к тому, что время механического отклика составило приблизительно 3 мкс, что соответствует примерно 100-кратному улучшению по сравнению с обычными системами СИПМ. Отношение сигнала к шумам при обнаружении тока было улучшено приблизительно в 8 раз. Было продемонстрировано, что система ВС СИПМ способна получать топографические изображения биологических образцов со скоростью 0.9–5 с/кадр и живых клеток со скоростью 20–28 с/кадр.

Для изучения применимости ВС СИПМ к биологическим образцам было проведено несколько тестов. Первым тестируемым образцом являлась живая клетка рака шейки матки HeLa человека. Визуализация была проведена в *hopping*-режиме с использованием капилляра с радиусом острия, равным 5–7.5 нм, частотой колебаний Z-сканера в 100 кГц и разностью потенциалов, равной –0.1 В. Топографические изображения периферической краевой области клетки HeLa, перемещающейся по стеклянной подложке в физиологическом растворе фосфатного буфера (PBS), были сняты со скоростью 20–28 с/кадр-с, 200×100 пикселей для области сканирования 12×12 мкм² (рис. 5) [42, 44].

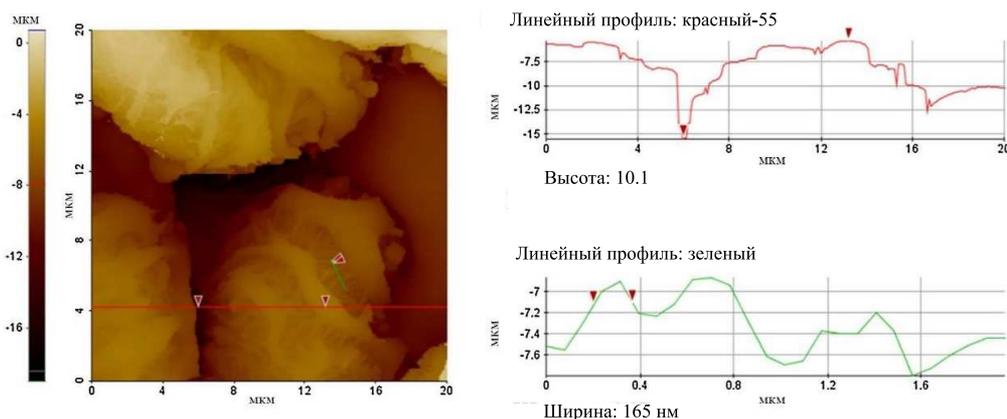


Рис. 4. Профили срезов изображения сканирующей ион-проводящей микроскопии (почка крысы) [40]

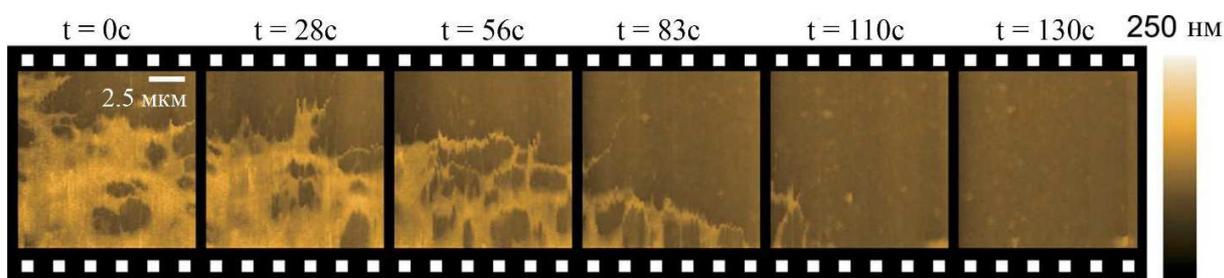


Рис. 5. Топографические изображения краевой области клетки HeLa на стеклянной подложке [41]

Т. Н. Тихоновой вместе с группой ученых были проведены исследования по взаимодействию чувствительных клеток с пептидным гидрогелем *in situ* посредством сканирующей ион-проводящей микроскопии [45]. В этой работе было показано, что гидрогели, основанные на пептидах, являются хорошими матрицами для 3D-культивирования клеток и могут применяться в области регенеративной медицины. Изучение взаимодействия клетки с подложкой важно для понимания связывания клеток, пролиферации и миграции. Для изучения роста клеток на самособирающихся гидрогелях, основанных на пептидах, был использован СИПМ. Топография поверхности гидрогеля, которая изменяется при его формировании в водном растворе, была изучена с наноразмерным разрешением и сопоставлена с данными, полученными микроскопией визуализации времен жизни флуоресценции (FLIM).

Кроме того, СИПМ продемонстрировал способность отображать живые клетки внутри гидрогеля. Двухканальный нанокапилляр для измерения pH [44] без меток с чувствительностью > 0.01 единицы был применен для исследования картирования pH в гидрогеле с целью оценить применимость гидрогеля для роста клеток [45].

Был проведен сравнительный анализ изображений оптической микроскопии (традиционной флуоресцентной конфокальной микроскопии и FLIM), а также СИПМ для измерения морфологических

изменений, сопровождающих самосборку Fmoc-FF в водном растворе (рис. 6).

Структурные изменения в процессе формирования гидрогеля Fmoc-FF в водном растворе были исследованы методом СИПМ в реальном времени (рис. 6, б). В отличие от FLIM-измерений переход от сферических структур (стадия I) к фибриллярному гидрогелю (стадия IV) не наблюдался, а процесс гидрогелеобразования был представлен ростом фибрилл. Стоит отметить, что СИПМ позволяет получить изображение фибрилл пептидных агрегатов за счет прохождения нанокапилляра через гель, где сканирует сформированные фибриллы. Таким образом, гидрогелеобразование, наблюдаемое при помощи СИПМ, демонстрирует 2D самосборку пептидов на поверхности. Данные, полученные при помощи СИПМ, согласуются с механизмом роста, состоящим из зарождения, роста и формирования фибрилл пептидных агрегатов и формирования фибрилл пептидных агрегатов в процессе гидрогелеобразования.

Таким образом, СИПМ позволяет увидеть легко деформируемые объекты. Полученные результаты также показывают, что СИПМ может быть использован и для визуализации самосборки *in situ* в 2D, что делает ее идеальным инструментом для исследования агрегации биомолекул на поверхности.

В области визуализации единичных клеток с использованием СИПМ имеется множество достиже-

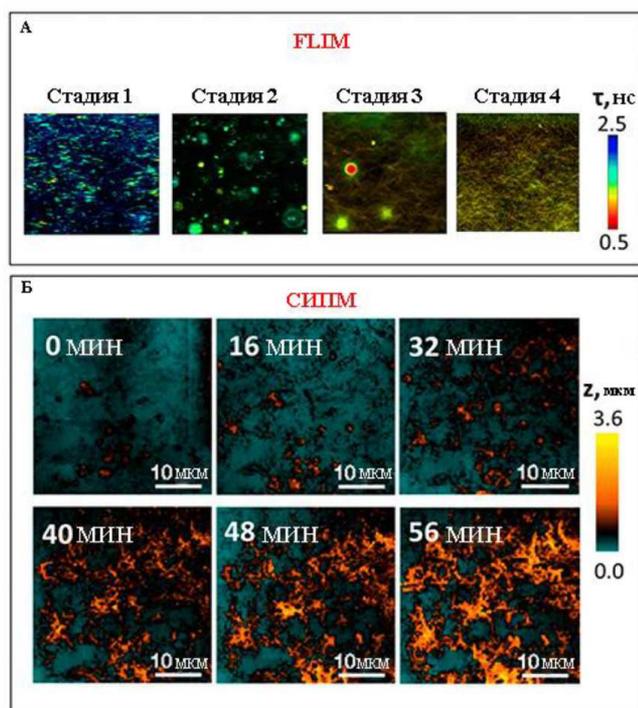


Рис. 6. FLIM- и СИПМ-изображения формирования гидрогеля Fmoc-FF [45]

ний. Одно из таких — увеличение уровня производительности, что позволяет получать более высокое разрешение и детализацию при сканировании клеток. Высокоскоростной режим также является значимым прорывом в данной области. Это позволяет быстро получать изображения клеток, что особенно полезно при динамических исследованиях и измерениях в реальном времени. Более точное изучение формы, структуры и свойства клеток способствует лучшему пониманию их функций и механики. Важным также является то, что СИПМ является наименее инвазивным для живой клетки методом сканирования, в отличие от СЭМ и АСМ.

2. ИЗМЕРЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ ПОМОЩИ СИПМ

Благодаря СИПМ можно не только получать топографию поверхности образца, не оказывая прямого механического воздействия на него, но и проводить измерения локальных механических свойств исследуемого объекта. В процессе измерений СИПМ сканирует поверхность образца при помощи зонда и получает данные о механических свойствах исследуемого объекта. СИПМ реализует несколько различных подходов для измерения локальных механических свойств объектов [46–48]. Например:

1. Измерение модуля Юнга. Небольшая сила прикладывается к образцу, а затем измеря-

ется величина прогиба или деформации, что позволяет оценить локальный модуль Юнга образца [49].

2. Измерения сил адгезии между клетками и субстратом. Путем приложения силы и регистрации отклика клетки на нее можно получить информацию о силе адгезии клетки с поверхностью с целью понимания физиологии клеток и их взаимодействия с окружающей средой [50].
3. Измерение эластичности клеток, то есть их способности деформироваться и восстанавливать форму. Данные исследования проводят для изучения механических свойств клеток при различных условиях или патологиях [51].

СИПМ применяется для решения большого количества задач, связанных с изучением механических свойств клеток, как, например, для исследования специфических подобластей клеточной мембраны был использован бесконтактный метод механо-сканирующей ион-проводящей микроскопии (механо-СИПМ) с высоким разрешением (рис. 7). Это бесконтактный метод, который позволяет одновременно получать топографию клетки и карты модуля Юнга клеточной мембраны. Локальный модуль Юнга образца является расчетом величины изменения ионного тока [52].

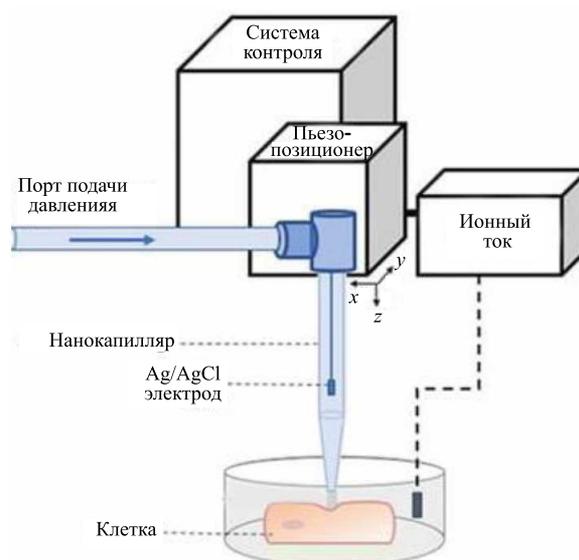


Рис. 7. Схема механо-СИПМ [52]

Система обратной связи СИПМ регистрирует положение зонда по изменению ионного тока, протекающего через острие нанокapилляра, в процессе сканирования, вследствие чего воссоздается карта деформации образца, на основе которой рассчитывается локальный модуль Юнга в каждой точке клетки. Карта деформации и топография записываются одновременно, позволяя собирать большее количе-

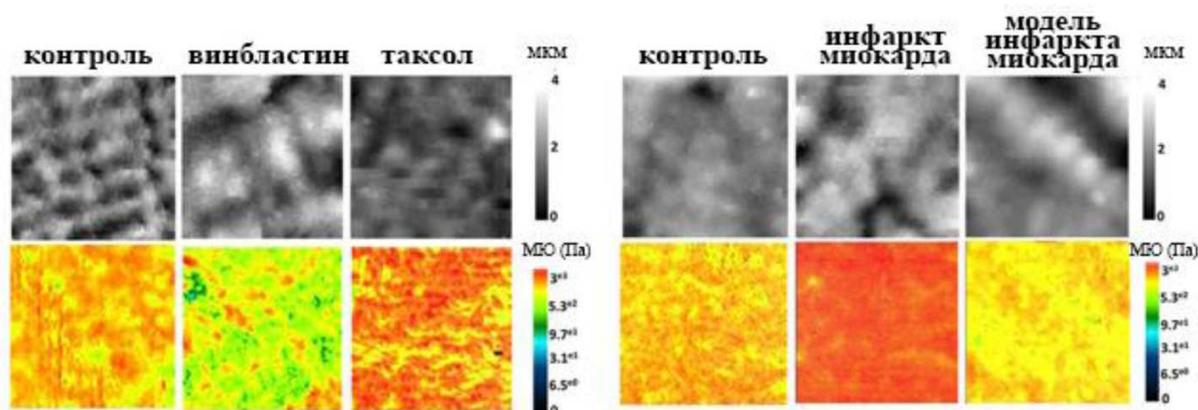


Рис. 8. СИПМ-изображения топографии клеток и карт модуля Юнга [52]

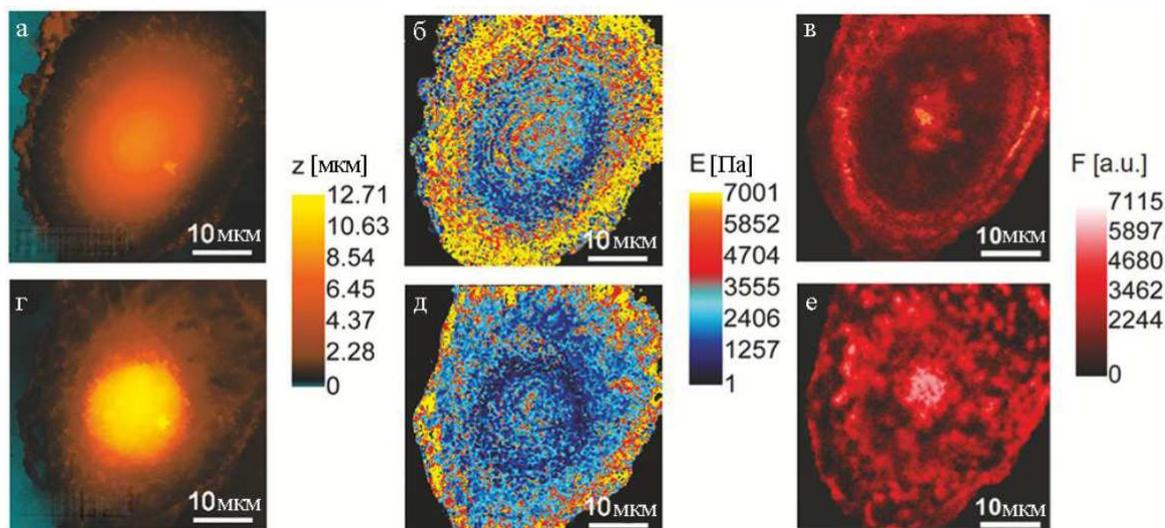


Рис. 9. КНК изображения локализации дестабилизированных микротрубочек клетки РС3, полученная при помощи СИПМ до (а, б, в) и после (г, д, е) введения Цитохалазина-Д [46]

ство данных за единицу времени, тем самым позволяя наблюдать динамически протекающие процессы [52]. Таким образом были получены топография поверхности и карта распределения модуля Юнга для кардиомиоцитов крысы (рис. 8).

В. С. Колмогоровым и коллегами было проведено исследование по картированию механических свойств живых клеток в наномасштабе с использованием взаимодействий между нанокapилляром и образцом [46]. Группой был рассчитан модуль Юнга цитоскелета клеток РС3 (рак предстательной железы человека) при помощи СИПМ, а также проведено его сравнение с состоянием после добавления препарата, дестабилизирующего микротрубочки — основные элементы цитоскелета. Эти результаты были сопоставлены с данными, полученными при помощи конфокальной микроскопии (рис. 9).

Корреляционная визуализация (рис. 10) показывает значительные изменения в топографии кле-

ток, а также изменения модуля Юнга и структуры актиновых филаментов на конфокальных изображениях. В случае топографии клетки (рис. 10, а, г) наблюдается уменьшение высоты периферии клетки, но не центральной части после разрушения актиновых филаментов, что объясняется большей концентрацией актина, находящегося на периферии клетки.

Благодаря малому индентированию и бесконтактному режиму при измерении КНК методом СИПМ возможно использование этого метода для длительного мониторинга динамических процессов, связанных с изменением механических свойств живых клеток. Это подтверждается примером с клетками РС-3, обработанными монометил-ауристатином Е (рис. 10, а).

Было проведено исследование как изменение цитоскелета, индуцированное веществами, регулирующими микротрубочки, влияет на механиче-

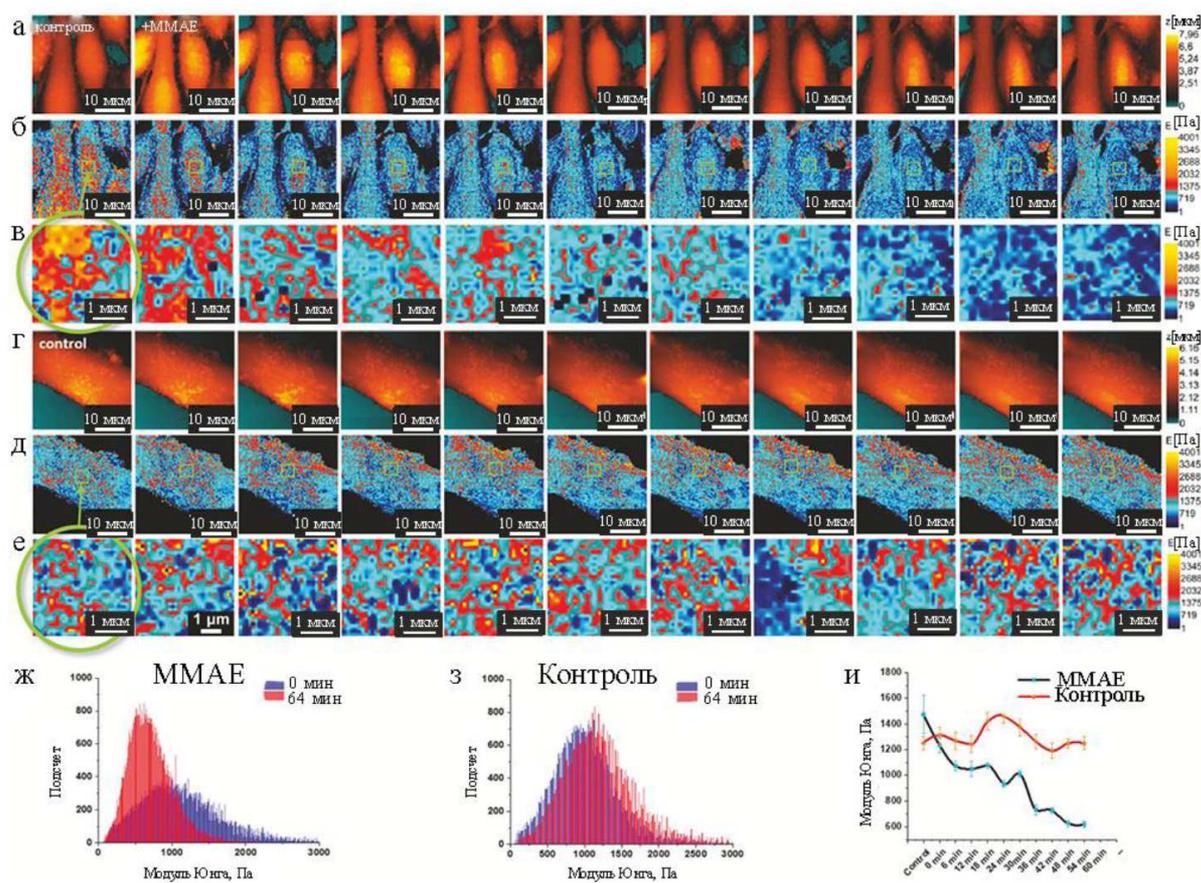


Рис. 10. Непрерывное скайрирование живых клеток РС-3 при помощи СИПМ [46]

ские свойства живой клетки с течением времени (рис. 10, б). СИПМ-изображения живых клеток РСЗ, инкубированных в ММАЭ, были получены с промежутком в 6 мин. На них можно проследить, что вся клетка стала мягче, включая периферийную и центральную области, но в основном в центральной части. СИПМ является уникальным методом анализа единичных клеток, и с его помощью измерения КНК могут быть высоко локализованы в интересующей области на поверхности живой клетки (рис. 10, б). Также наблюдается, что механические свойства контрольной клетки не претерпели существенных изменений с течением времени (рис. 10, з) по сравнению с клеткой РС-3 с нарушенным микротубулином, индуцированным ММАЭ (рис. 10, е), что может свидетельствовать, что индентирование нанокapилляром не влияет на жизнеспособность клеток.

При анализе единичных клеток после обработки ММАЭ (рис. 10, ж) отмечается значительное увеличение не только модуля Юнга, но и однородности механических свойств по всей клетке. Это можно установить при сравнении распределения модуля Юнга в контрольной клетке (рис. 10, з) без введения препарата и обработанной клетке. Авторами была проведена работа по непрерывному локализованному измерению КНК клеток после добавления ММАЭ (рис. 10, и).

Таким образом, преимущество СИПМ заключается в возможности сканировать живые клетки в режиме реального времени, при этом не нанося вреда самой клетке, в то время как АСМ позволяет просканировать образец лишь единожды.

Существуют различные аналитические модели, разработанные в последние годы для изучения механических свойств клеток и их структуры. В настоящее время начинает успешно использоваться инновационный метод малоинвазивного наномеханического картирования с помощью СИПМ [53] для открытия новых лекарств, действующих на клеточную стенку дрожжей и плазматическую мембрану. Так, были рассмотрены модели двухстороннего сжатия образца между двух плоских пластин [54], модель клетки, которая представляет собой тонкостенные жидкие заполненные сферы, чьи характеристики определяются коэффициентом Пуассона и толщиной клеточной стенки, при этом авторы принимают во внимание асимметричность распределения деформации. Разработанные модели были подтверждены экспериментальными данными, полученными при помощи кривых зависимости сила–деформация, полученных методом АСМ. Однако некоторые модели имеют ряд упрощений, которые заключаются в пренебрежении проницаемости клеточной стенки, объема клетки, параметров зонда, скорости деформации объекта [53].

Одной из проблем расчёта механических свойств клеток является недооцененность сил притяжения, обусловленных взаимодействием клетки с подложкой, однако была выявлена корреляция между «активными» силами сцепления клеток и «пассивной» жесткостью клеток на межклеточном уровне [55]. Благодаря работе J. Rheinlaender и др. [56] получилось одновременно измерить механическую жесткость клетки, а также силу притяжения, обусловленную взаимодействием клетки с подложкой. Схема такой комбинированной установки изображена на рис. 11, где t — обозначение направления сил притяжения, u — обозначение направления смещения подложки. Нанокapилляр, к которому приложено дополнительное давление p_0 , подводится к живой клетке, адгезировавшей на эластичной подложке, которая содержит флуоресцентные маркеры.

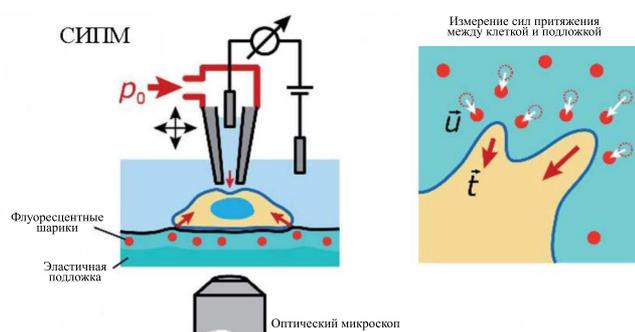


Рис. 11. Комбинированный метод СИПМ и МТУ [56]

Комбинированный метод продемонстрировал, что увеличение силы притяжения сопровождается повышением периферийной жесткости клеток, что, соответственно, приводит к корреляции локальной жесткости. На топографическом изображении клетка имеет характерную шарообразную форму, а карта распределения жесткости показывает мягкое тело клетки и немного более жесткую периферию (рис. 12). У поляризованной клетки имеются области с высокими силами притяжения, данные области могут совпадать с областями высокой жесткости клетки, и наоборот.

Группой ученых были проведены клинические исследования по получению трехмерных (3D) топографических изображений методом СИПМ, позволяющих, к примеру, раскрыть критическую роль тромбоцитарной высокомолекулярной группы (HMGb1) при травме и геморрагическом шоке [57]. В этом случае трехмерные топографические изображения с использованием СИПМ показали, что тромбоциты с дефицитом рецептора анафилатоксина С3aR демонстрируют уменьшенную площадь распространения фибриногена после стимуляции тромбином по сравнению с нормальными тромбоцитами (рис. 13) [58, 59].

Понимание того, каким образом клетки ведут себя на границе раздела фаз, имеет большое значение для ключевых биологических приложений, та-

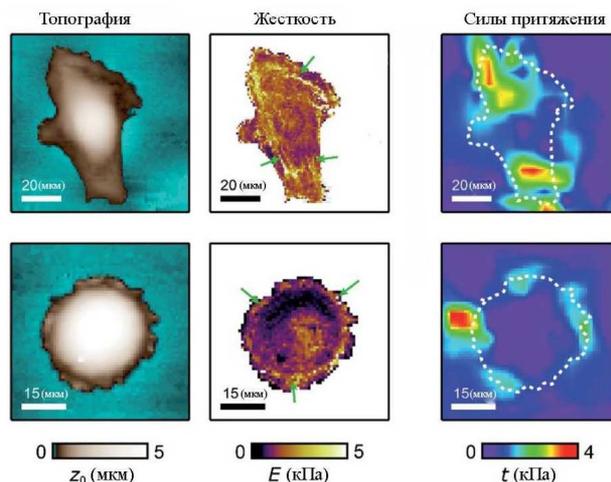


Рис. 12. Топография, карта жесткости, карта сил притяжения клетки, полученные комбинированным методом [56]

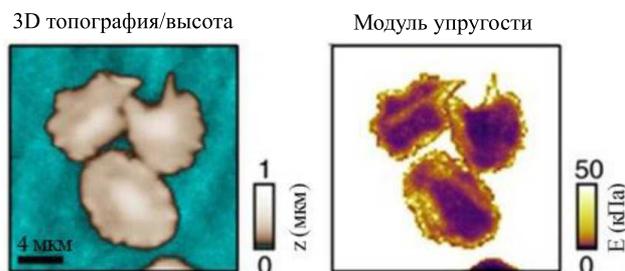


Рис. 13. СИПМ топография и карта модуля Юнга распространяющихся тромбоцитов [58]

ких как взаимодействие клетки с поверхностью имплантата [60], механобиология [61] и расширенный клеточный анализ [62]. Один из наиболее практичных и широко используемых в биологии методов — фиксация клеток, которая является важным процессом для гистологического анализа в клинической диагностике. Понимание подробного процесса фиксации клеток в различных состояниях, от живых клеток до полностью фиксированных, дает возможность оптимизировать протоколы фиксации и получить полезные знания о самом процессе.

Были исследованы механические свойства структур клеточной поверхности в зависимости от концентрации ПФД (параформальдегид) с помощью атомно-силовой микроскопии АСМ и СИПМ [63, 64]. Эти методы позволяют измерять модуль упругости и амплитуду поверхностных флуктуаций клеток как в свободном, так и в фиксированном состояниях [65]. На рис. 14 показана топография одиночной клетки L929 (жировой фибробласт), полученная с помощью СИПМ, до и после обработки 4% PFA, что является обычной концентрацией PFA для фиксации. Хотя четкой разницы между необработанными и обработанными клетками не наблюдалось, была очевидна небольшая разница в форме. Живая клетка имеет максимальную высоту

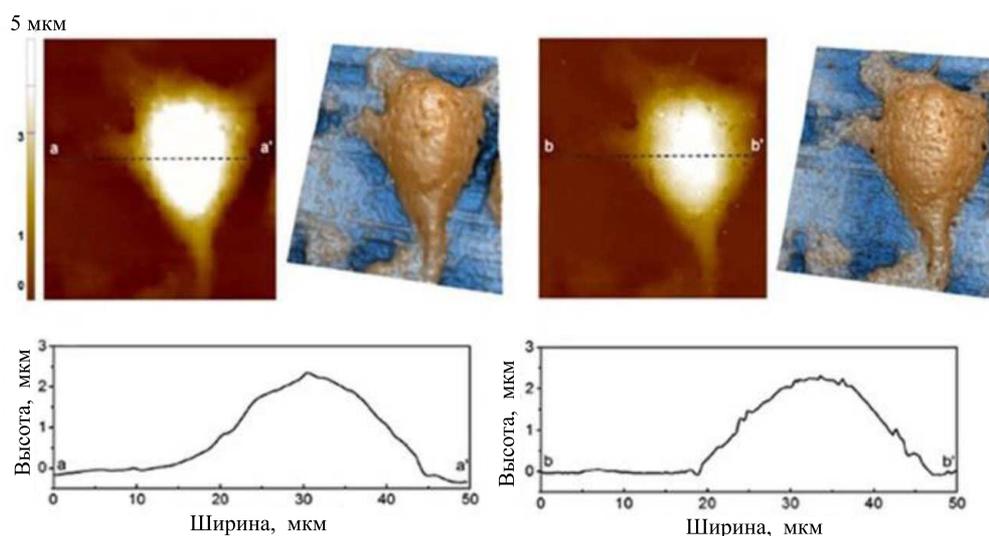


Рис. 14. Изображение поверхности клеток L929 с использованием СИПМ [65]

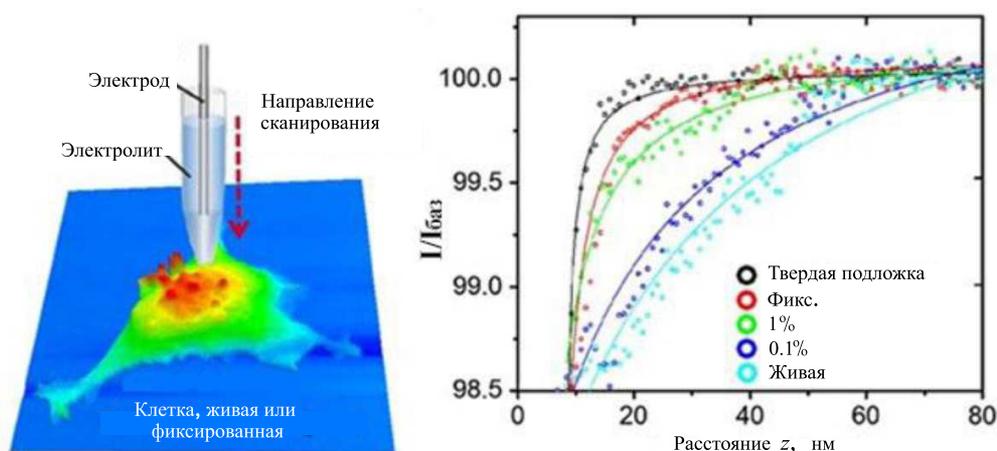


Рис. 15. Схематическое изображение колебаний клеточной поверхности, изображенное при помощи СИПМ, где $I_{\text{баз}}$ — базовый ток, возникший далеко от образца [65]

2.5 мкм, высота обработанных 4% PFA составила также около 2.5 мкм.

Также были измерены кривые зависимости тока от подвода (I–D) СИПМ применительно к клеточным поверхностям при различных CPFA (рис. 15). Для оценки флуктуаций клеточной поверхности время измерения I–D-кривой проверяли по известному эталону [64]. В твердом субстрате (чашке Петри) кривая I–D имеет самый крутой наклон, тогда как в необработанном состоянии кривая I–D имеет самый широкий наклон. В клетках с PFA кривые I–D существуют между ними. Клетка, обработанная 4% PFA, имела почти ту же I–D-кривую, что и I–D-кривые твердого субстрата.

Исследования при помощи СИПМ показали, что амплитуда поверхностных колебаний и модуль упругости клеток претерпевают изменения при воздействии концентраций PFA от 0.1 до 4%. После полной фиксации PFA флуктуация клеточной по-

верхности уменьшилась до 71% от живой клетки, а модуль Юнга увеличился в пять раз по сравнению с таковым у живых клеток. Эти результаты обеспечивают понимание того, как клетки реагируют на химическую обработку PFA, что учитывает не только традиционное химическое понимание воздействия PFA на клетку, но теперь и механические свойства поверхности клетки [65].

Измерение механических свойств единичных клеток с использованием СИПМ является важным инструментом для понимания физиологических и патологических процессов в клеточных системах, с его помощью можно оценить параметры, необходимые для понимания механизмов клеточной миграции, дифференцировки и ответов на биомеханические сигналы [66, 67]. Он также может использоваться для изучения влияния внешних факторов, таких как медикаменты или патологические процессы, на механические свойства клеток. Совершен-

ствуются методы по способам измерения механических свойств, позволяющие более детально оценить состояние клеток.

3. МАНИПУЛЯЦИИ С ЕДИНИЧНЫМИ КЛЕТКАМИ С ПОМОЩЬЮ СИПМ ДЛЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ

Изучение внутриклеточных биохимических процессов при помощи нанокapилляров является важным подходом для описания внутриклеточных структур, что позволяет получать детальную информацию о биохимических процессах [68]. Использование нанокapилляров также позволяет изучать и внутриклеточную гетерогенность. Клетки могут значительно различаться по своим свойствам и функциям, и изучение этой гетерогенности помогает понять различия между здоровыми и больными клетками. Понимание молекулярных механизмов заболеваний и возможность наблюдать их внутри клеток открывает все больше возможностей для разработки эффективных подходов к лечению [69, 70].

Нанокapиллярные системы применяются для детектирования активных форм кислорода (АФК) [71], внутриклеточного pH [72], ионов металлов [73] и т.д. Важность детектирования данных параметров заключается в быстрой, высокоточной и ранней диагностике широкого круга заболеваний [74, 75]. Однако такие методы не стоят на месте и продолжают совершенствоваться: так W. Hu и другие предложили автоматизированную систему позиционирования нанокapилляра, позволяющую в автоматическом режиме детектировать клетки, осуществлять автоматическое пространственное позиционирование и подвод нанокapилляра к поверхности клетки с дальнейшим проникновением через ее мембрану и детектированием уровня внутриклеточных АФК [76]. Основными составляющими устройства являются система электрохимических измерений, система обратной связи, построенная на визуальном наблюдении, а также система контроля перемещений зонда (рис. 16,17).

Детектирование клеток, так же, как и детектирование острия нанокapилляров, с целью автоматизированного процесса сканирования, основано на принципах математической обработки изображений и выделении границ объектов при помощи цветового градиента. Такая особенность позволяет за короткий промежуток времени осуществить автоматический поиск и идентификацию клеток на дне чашки Петри, с дальнейшим контролируемым подводом.

Тем не менее клеточная биопсия, или нанобиопсия, является более трудоемким процессом, чем локальное инъектирование веществ. В первую очередь инъектирование может осуществляться в периферию клетки, без четкой локализации места входа капилляра в клетку [77, 78]. При проведении

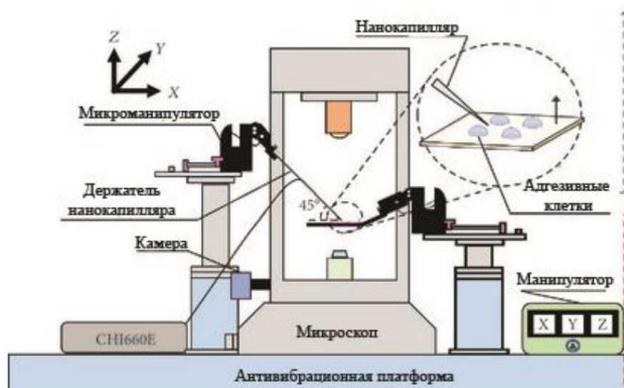


Рис. 16. Автоматизированная система позиционирования нанокapилляра [76]

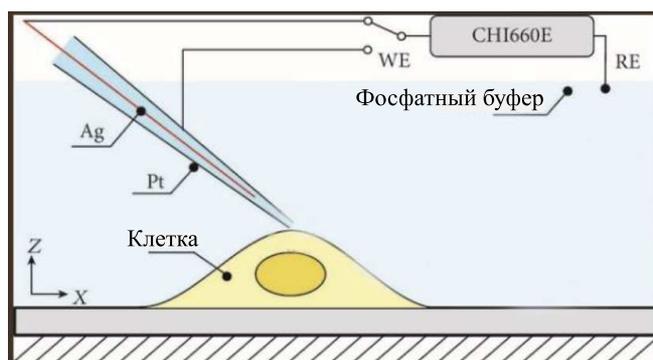


Рис. 17. Схема подвода нанокapилляра в растворе [76]

нанобиопсии острие нанокapилляра должно быть прецизионно введено в ту клеточную органеллу, из которой должен быть получен материал, что является трудоемкой задачей за счет сравнительно небольших размеров органелл для клеток, чьи размеры составляют примерно 20 мкм. Во-вторых, нанобиопсия требует ряда дополнительных операций, таких как контроль аспирации органелл внутри нанокapилляра и удержание исследуемой клетки в статичном положении во время проведения процедуры.

Так, коллектив авторов, возглавляемый M. Ruan, продемонстрировал систему взятия нанобиопсии на основе электросмачивания [79]. Такая система позволяет решать задачи цитоплазматической экстракции с высокой эффективностью. В основе метода также лежит компьютерный алгоритм вычисления «оптимальной» позиции нанокapилляра для взятия материала из клетки: алгоритм осуществляет детектирование единичных клеток с последующим выбором места для взятия материала. После прохождения острия нанокapилляра через мембрану клетки исследователи подавали отрицательный потенциал для забора материала из цитоплазмы. Было показано, что объем взятого материала может варьироваться от фемтолитров до пиколитров (рис. 18).

Авторами также было показано, что такая система может быть интегрирована вместе с СИПМ, тем самым будет осуществлен одновременный подход

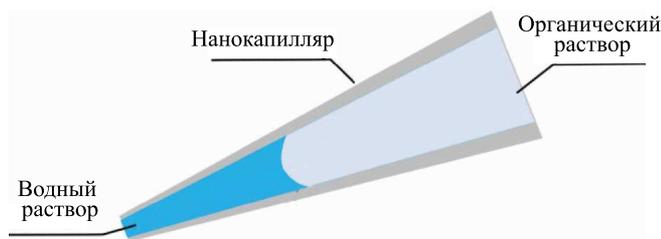


Рис. 18. Содержание нанокпилляра после взятия нано-биопсии [79]

для анализа морфологии и механических свойств единичных клеток с последующим проведением нано-биопсии.

Y. Nashimoto и другие разработали СИПМ-систему, позволяющую одновременно осуществлять экспрессию мРНК совместно с изучением морфологических особенностей единичной клетки [80]. Такая особенность была достигнута благодаря использованию двухканального нанокпилляра, в котором один канал был использован для осуществления топографического сканирования образца, а другой — для локальной экспрессии мРНК.

Группа, возглавляемая А. Shakoор, продемонстрировала свою работу [81], в которой ими была разработана система взятия нано-биопсии из единичных клеток. В их следующей работе [82] система была дополнена высокопрецизионной системой позиционирования, позволяющей осуществлять детектирование единичных клеток, их органелл, аспирацию и дальнейшее инжектирование взятого материала в указанном месте. Более того, такая система была дополнена микрофлюидным устройством, выстраивающим единичные клетки «в ряд» для более удобной автоматической детекции. Процесс взятия биопсии осуществлялся в несколько этапов (рис. 19):

1. Единичная клетка и острие нанокпилляра помещаются в канал микрофлюидного чипа и располагаются в одной и той же фокальной плоскости.
2. Нанокпилляр автоматизировано подводится в клетку.
3. Производится забор биоматериала (расположение нанокпилляра остается неизменным на протяжении всего процесса).
4. Производится отвод нанокпилляра с взятым биоматериалом.
5. Нанокпилляр подводится к области экстракции.
6. Стол горизонтального позиционирования, управляемый программным алгоритмом, производит экстракцию органеллы.

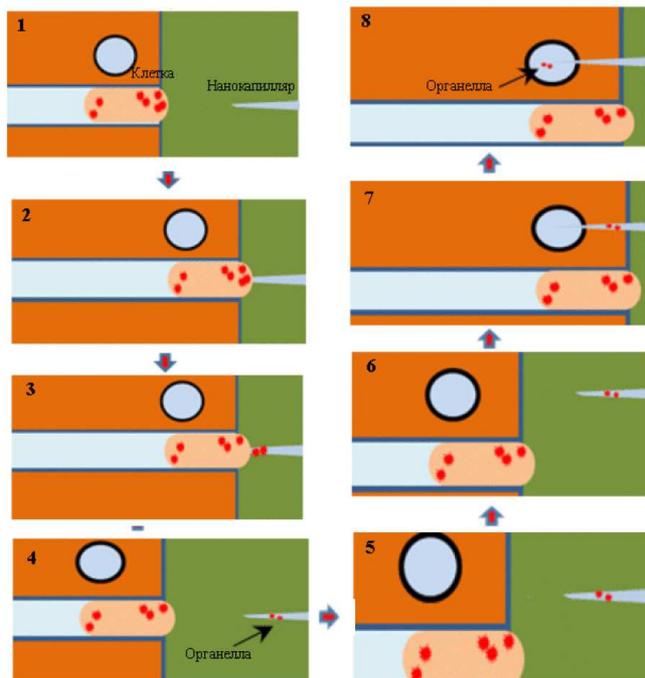


Рис. 19. Микрофлюидная нано-биопсия [82]

Методы, связанные с СИПМ, используют средство доставки заряженных частиц на интересующую поверхность, и эта возможность была продемонстрирована с использованием ДНК и белков [83] для местной доставки флуоресцентных молекулярных зондов в клетки [84].

В 2019 г. Minkyung Kang с соавторами представили, как простые в изготовлении нанокпилляры диаметром примерно 30 нм могут быть расположены на платформе сканирующей ион-проводящей микроскопии для одновременной визуализации электрохимической активности и топографии с высоким пространственным разрешением. Это позволяет провести детальную корреляцию между структурой (топографией) и функцией (электрохимической реакционной способностью) на наноуровне.

На рис. 20 схематически показана экспериментальная установка, применяемая по отношению к квазиэталону противоиэлектрода (QRCE) в объеме раствора электролита/реагента, обозначенному как QRCE1 и создающему ток подложки (I_{sub}). QRCE1 был смещен при потенциале $-V_{tip}$ по отношению к земле для измерений ионной проводимости при помощи острия нанокпилляра через QRCE2 (заземленный квазиэталонный противоиэлектрод). Смещение V_{tip} приводит к появлению тока ионной проводимости (I_{tip}), который контролируется на протяжении всего процесса сканирования и используется как для позиционирования нанокпилляра над подложкой (т.е. для получения топографических данных), так и для получения данных об исследовании ионных потоков над поверхностью с электрохимической реакцией (т.е. данные об электрокаталитической активности) [85].

Использование нанокпилляров помогает изу-

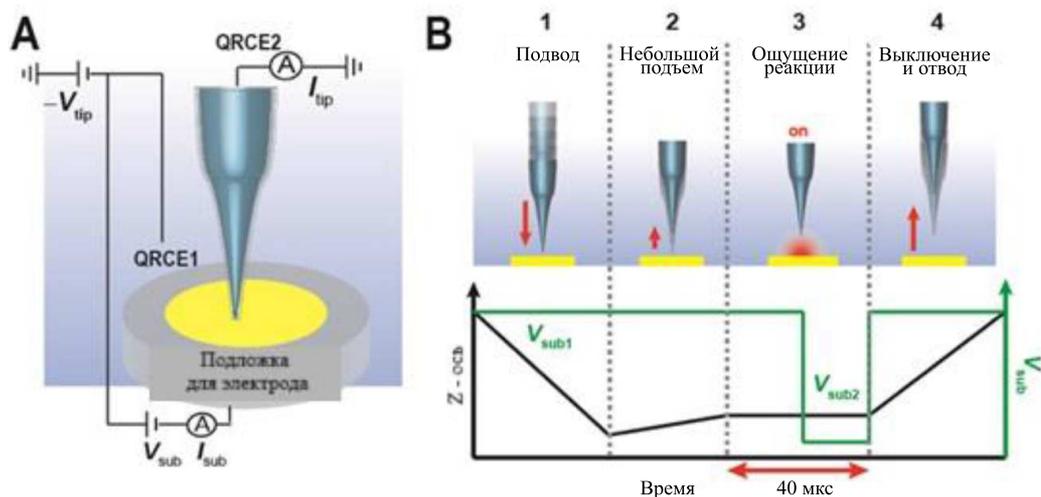


Рис. 20. Схема экспериментальной установки, используемой для одновременного топографического/электрохимического картирования электрода-подложки с использованием СИИМ [85]

чать различные биохимические реакции внутри живых клеток. Исследования с использованием нанокapилляров позволяют обнаруживать и изучать субклеточные структуры и процессы, что позволяет изучать многие аспекты клеточной биологии и может иметь важные практические применения в медицине и фармакологии. Новейшие разработки в данной области значительно упростили такие вещи, как детектирование активных форм кислорода (АФК) и внутриклеточного pH. Исследование внутриклеточных биохимических процессов с использованием нанокapилляров имеет большой потенциал для дальнейшего и более подробного исследования заболеваний, а также развития новых методов диагностики и лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последнее время большое количество методов было применено для анализа единичных клеток. Сюда относятся такие большие разделы, как визуализация морфологии единичных клеток, измерение механических свойств единичных клеток при помощи СИИМ, манипуляции с единичными клетками с помощью СИИМ для физико-химических анализов, а также множество других, не менее важных методов анализа единичных клеток.

Сканирующая ион-проводящая микроскопия дает огромное количество возможностей для анализа единичных клеток. Все вышеперечисленные достижения, такие как создание *hopping mode*, применение *hopping mode* для получения топографических изображений тканей, исследования по взаимодействию чувствительных клеток с пептидным гидрогелем *In Situ* посредством СИИМ, разработка и использование бесконтактного метода механосканирующей ион-проводящей микроскопии с высоким разрешением, исследование по картированию механических свойств живых клеток в наномасштабе с использованием взаимодействий между нанокapилляром и образцом, исследования по получению трехмерных топографических изображений методом СИИМ, создание автоматизированной системы позиционирования нанокapилляра, разработка системы взятия нанобиопсии и т.д., играют важную роль в понимании основных биологических процессов и имеют потенциал для развития новых методов диагностики и лечения различных заболеваний.

Данная работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (постановление Правительства Российской Федерации от 9 апреля 2010 г. № 218, соглашение № 075-11-2023-018 от 10.02.2023 между ООО «НТ-МДТ» и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации).

- [1] Korchev Y.E. et al. // *Biophysical journal*. **78**, N 1. 451. (2000).
- [2] Gorelkin P. et al. // *Microscopy and Microanalysis*. **26**, N S2. 1968. (2020).
- [3] Shevchuk A. et al. // *Biophysical journal*. **110**, N 10. 2252. (2016)..
- [4] Zhuang X. et al. // *Science*. **288** N 5473. 2048. (2000)..
- [5] Xie X.S., Yu J., Yang W.Y. // *Science*. **312**, N 5771. 228. (2006)..
- [6] Sanders B.J., Kim D.C., Dunn R.C. // *Analytical Methods*. **8**, N 39. 7002. (2016)..
- [7] Altschuler S.J., Wu L.F. // *Cell*. **141**, N 4. 559. (2010)..
- [8] Srinivas P.R., Kramer B.S., Srivastava S. // *The lancet oncology*. **2**, N 11. 698. (2001).
- [9] Schiffman J.D., Fisher P.G., Gibbs P. // *American*

- Society of Clinical Oncology Educational Book. **35**, N 1. 57. (2015).
- [10] *Pelkmans L.* // *Science*. **336**, N 6080. 425. (2012).
- [11] *Li M.* et al. // *Nano Research*. **12**, 703. (2019).
- [12] *Yin H., Marshall D.* // *Current opinion in biotechnology*. **23**, N 1. 110. (2012).
- [13] *Actis P., Mak A.C., Pourmand N.* // *Bioanalytical reviews*. **1**, 177. (2010).
- [14] *Zhang H., Liu K.K.* // *Journal of the Royal Society interface*. **5**, N 24. 671. (2008).
- [15] *Alenghat F.J.* et al. // *Biochemical and biophysical research communications*. **277**, N 1. 93. (2000).
- [16] *Zheng X.T., Li C.M.* // *Chemical society reviews*. **41**, N 6. 2061. (2012).
- [17] *Rheinlaender J.* et al. // *Langmuir*. **27**, N 2. 697. (2011).
- [18] *Anariba F.* et al. // *Modern Physics Letters B*. **26**, N 05. 1130003. (2012).
- [19] *Happel P., Thatenhorst D., Dietzel I.D.* // *Sensors*. **12**, N 11. 14983. (2012).
- [20] *Колмогоров В. С.* и др. Изучение локальных механических свойств живых клеток методом сканирующей ион-проводящей микроскопии // *Биотехнология: состояние и перспективы развития*. (2020). 154.
- [21] *Zhang J.* et al. // *Current Opinion in Electrochemistry*. **22**, 178. (2020).
- [22] *Sahota A.* et al. // *Chemical Communications*. (2023).
- [23] *Колмогоров В.С.* и др. Изучение влияния терапевтических агентов на различные компартменты опухолевых клеток методом локального изменения механических свойств с применением сканирующей ион-проводящей микроскопии / II объединенный научный форум. VI съезд физиологов СНГ. VI съезд биохимиков России. IX российский симпозиум «Белки и пептиды». 246. (2019). <https://elibrary.ru/item.asp?id=44123781>
- [24] *Takahashi Y.* et al. // *Journal of the American Chemical Society*. **132**, N 29. 10118. (2010).
- [25] *Lin T.E.* et al. // *Chemical science*. **9**, N 20. 4546. (2018).
- [26] *Li P., Li G.* // *IEEE Nanotechnology Magazine*. **15**, N 1. 17. (2020).
- [27] *Feng C.* et al. // *ACS Chemical Neuroscience*. **13**, N 24. 3547. (2022).
- [28] *Hansma P.K., Drake B., Marti O.* et al. // *Science*. **243**, 641. (1989).
- [29] *Korchev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M.* et al. // *Biophys. J.* **73**, 653. (1997).
- [30] *Korchev Y.E., Milovanovic M., Bashford C.L.* et al. // *Microsc.* **188**, 17 (1997).
- [31] *Simeonov S., Schäffer T.E.* // *Nanoscale*. **11**, N 17. 8579. (2019).
- [32] *Rheinlaender J.* et al. // *Thrombosis and haemostasis*. **114**, N 02. 305. (2015).
- [33] *Ida H.* et al. // *Analytical chemistry*. **89**, N 11. 6015. (2017).
- [34] *Wang K.* et al. // *Nano Letters*. **20**, N 9. 6313. (2020).
- [35] *Cremin K.* et al. // *Analytical chemistry*. **92**, N 24. 16024. (2020).
- [36] *Böcker M.* et al. // *Nanotechnology*. **18**, N 14. 145505. (2007). 10.1088/0957-4484/18/14/145505
- [37] *Nashimoto Y.* et al. // *Analytical chemistry*. **87**, N 5. 2542. (2015).
- [38] *Savin N.* et al. // *Biophysical Journal*. **120**, N 3. 361a. (2021).
- [39] *Novak P.* et al. // *Nature methods*. **6**, N 4. 279. (2009).
- [40] *Nakajima M.* et al. Scanning ion conductance microscopy for visualizing the three-dimensional surface topography of cells and tissues // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **73**, 125. (Academic Press, 2018).
- [41] *Watanabe S.* et al. // *Review of Scientific Instruments*. **90**, N 12. (2019).
- [42] *Novak P., Shevchuk A., Ruenraroengsak P.* et al. // *Nano Lett.* **14**, 1202 (2014).
- [43] *Shevchuk A.I., Novak P., Taylor M.* et al. // *J. Cell Biol.* **197**. 499 (2012).
- [44] *Zhang Y.* et al. // *Nature Communications*. **10**, N 1. 5610. (2019).
- [45] *Tikhonova T. N.* et al. // *Cells*. **11**, N 24. 4137. (2022).
- [46] *Kolmogorov V. S.* et al. // *Nanoscale*. **13**, N 13. 6558. (2021).
- [47] *Rheinlaender J., Schäffer T.E.* // *Soft Matter*. **9**, N 12. 3230. (2013).
- [48] *Sánchez D.* et al. // *Biophysical journal*. **95**, N 6. 3017. (2008).
- [49] *Rheinlaender J., Schöffer T.E.* // *Applied Physics Letters*. **117**, N 11. (2020).
- [50] *Cremin K.* et al. // *Analytical chemistry*. **92**, N 24. 16024. (2020).
- [51] *Seifert J.* et al. // *Langmuir*. **31**, N 24. 6807. (2015).
- [52] *Swiatlowska P.* et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **117**, N 6. 2764. (2020).
- [53] *Savin N., Erofeev A., Gorelkin P.* // *Cells*. **12**, N 15. 1946. (2023).
- [54] *Stenson J.D.* et al. // *Biotechnology progress*. **27**, N 2. 505. (2011).
- [55] *Schierbaum N., Rheinlaender J., Schäffer T.E.* // *Soft Matter*. **15**, N 8. 1721. (2019).
- [56] *Rheinlaender J., Wirbel H., Schäffer T.E.* // *RSC advances*. **11**, N 23. 13951. (2021).
- [57] *Vogel S.* et al. // *The Journal of clinical investigation*. **125**, N 12. 4638. (2015).
- [58] *Sauter R. J.* et al. // *Circulation*. **138** N 16. 1720. (2018).
- [59] *Sachs L.* et al. // *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. **4**, N 3. e12313. (2020).
- [60] *Minami K.* et al. // *Advanced Materials*. **27**, N 27. 4020. (2015).
- [61] *Ariga K.* et al. // *Polymer journal*. **48**, N 4. 371. (2016).
- [62] *Kikuchi K.* // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **88**, N 4. 518. (2015).
- [63] *Cappella B., Dieltier G.* // *Surface science reports*. **34**, N 1-3. 1. (1999)..
- [64] *Mizutani Y.* et al. // *Applied Physics Letters*. **102**, N 17. (2013).
- [65] *Kim S. O.* et al. // *Nano convergence*. **4**, N 1. 1. (2017).
- [66] *Janney P.A.* // *Physiological reviews*. **78**, N 3. 763. (1998).
- [67] *Pollard T.D., Borisy G.G.* // *Cell*. **112**, N 4. 453. (2003).
- [68] *Sciurti E.* et al. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 117125. (2022).
- [69] *Ho V.T.T.X.* et al. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. **344**. 130271. (2021).
- [70] *Stanley J., Pourmand N.* // *APL Materials*. **8**, N 10. (2020).
- [71] *Ozel R.E.* et al. // *Acs Sensors*. **3**, N 7. 1316. (2018).
- [72] *Guo J.* et al. // *Analyst*. **145**, N 14. 4852. (2020).
- [73] *Shi X.M.* et al. // *CCS Chemistry*. **3**, N 9. 2359. (2021).

- [74] *Temiz E.* et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. **22**, N 11. 6098. (2021).
- [75] *Casciari J.J., Sotirchos S.V., Sutherland R.M.* // *Journal of cellular physiology*. **151**, N 2. 386. (1992).
- [76] *Hu W.* et al. // *Cyborg and Bionic Systems*. (2022).
- [77] *Chow Y.T.* et al. // *IEEE/ASME Trans. Mechatronics*. **21**, N 2, 838. (2016).
- [78] *Chow Y.T.* et al. // *Sci. Rep.* **6**. (2016).
- [79] *Ruan M.* et al. *Automated Electrowetting-based Nanobiopsy System for Adherent Cells / 2023 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation (ICMA)*. IEEE. 2442. (2023).
- [80] *Nashimoto Y.* et al. // *ACS nano*. **10**, N 7. 6915. (2016).
- [81] *Shakoor A.* et al. A high-precision robot-aided single-cell biopsy system // *2017 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA)*. IEEE 5397. (2017).
- [82] *Shakoor A.* et al. // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. **66**, N 8. 2210. (2018).
- [83] *Fu Z.G., Santore M.M.* // *Colloids and Surfaces a Physicochemical and Engineering Aspects* **135**, 63. (1998).
- [84] *Milosevic M.* // *Applied Spectroscopy Reviews* **39**, 365. (2004).
- [85] *Kang M.* et al. // *ACS nano*. **11**, N 9. 9525. (2017).

Latest Advances in Scanning Ion-Conductance Microscopy and Nanopipette Systems for Single-Cell Analysis under Serial Conditions

D.A. Shergin^a, A.P. Yakovlev^b, P.V. Gorelkin^c, S.V. Salikhov, A.S. Erofeev

¹*Research Laboratory of Biophysics, National University of Science and Technology MISiS
Moscow 119049, Russia*

E-mail: ^aShergin-da@mail.ru, ^bIakovlev.ap@misis.ru, ^cGorelkin.pv@misis.ru

Studying single cells opens opportunities for understanding many biological processes and, as a consequence, plays an important role in the development of biomedicine. Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) and nanopipette systems for the analysis of single cells represent a powerful tool for investigating the morphological, mechanical, and biochemical features of living cells with nanometer spatial resolution under near-natural conditions. Over the last decades, SICM has shown great success in studying and manipulating single cells, and the non-contact nature of the system, combined with the unique features of nanopipettes used as probes, has opened new possibilities for the application of such systems in biomedical applications. This review reflects the latest trends and directions in the development of SICM and nanopipette systems for the single-cell analysis.

PACS: 87.18.Nq.

Keywords: nanopipette, single cell analysis, SICM, automated systems, AFM.

Received 01 October 2023.

English version: *Moscow University Physics Bulletin*. 2023. **78**, No. 6. Pp. 729–743.

Сведения об авторах

1. Шергин Данила Андреевич — лаборант-исследователь; e-mail: Shergin-da@mail.ru.
2. Яковлев Алексей Павлович — инженер научного проекта; e-mail: Iakovlev.ap@misis.ru.
3. Горелкин Петр Владимирович — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник; e-mail: Gorelkin.pv@misis.ru.
4. Салихов Сергей Владимирович — канд. физ.-мат. наук, доцент; e-mail: salikhov@misis.ru.
5. Ерофеев Александр Сергеевич — канд. физ.-мат. наук, зав. лабораторией биофизики; e-mail: Erofeev.as@misis.ru.