



ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ИЗМЕНЕНИЙ РОСТА, ПОДВИЖНОСТИ, МЕТАБОЛИЗМА И СЕКРЕЦИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК

PROBE MICROSCOPY IN THE STUDY OF CHANGES IN GROWTH, MOBILITY, METABOLISM AND SECRETION OF CANCER CELLS

И.В.Яминский^{1, 2, 3} д.ф.-м.н., профессор МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, генеральный директор Центра перспективных технологий, директор Энергоэффективных технологий, вед. науч. сотр. ИНЭОС РАН, (ORCID: 0000-0001-8731-3947), А.И.Ахметова^{1, 2, 3}, инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0001-6363-8202) / yaminskiy@nanoscopus.ru

I.V.Yaminskiy^{1, 2, 3}, Doctor of Sc. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center, Director of Energy Efficient Technologies, Leading Sci. of INEOS RAS, A.I.Akhmetova^{1, 2, 3}, Engineer of A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies

DOI: 10.22184/1993-8578.2020.13.5.298.302

Получено: 21.08.2020 г.

Современные методы сканирующей зондовой микроскопии позволяют получить детальную картину топологии живых клеток, в том числе раковых клеток, с нанометровым пространственным разрешением в процессе их роста. Развитие методов высокоскоростной атомно-силовой микроскопии дало возможность получать изображение клеток с миллисекундным пространственным разрешением. Вместе с тем сканирующая капиллярная (ион-проводящая) микроскопия позволяет исследовать шероховатую поверхность живых клеток за счет изменения протекающего ионного тока, при этом практически исключая силовое воздействие на клетку. Использование сканирующей капиллярной микроскопии в исследовании раковых клеток открывает новые возможности для скрининга лекарств, для получения новых данных о влиянии изменения внешних условий на кинетику роста опухоли, данных о жизнедеятельности клеток.

Modern methods of scanning probe microscopy make it possible to obtain a detailed pattern of the vital cells topology including cancer cells with a nanoscale spatial resolution during their growth. The development of high-speed atomic force microscopy enabled to produce images of cells with millisecond spatial resolution. Besides, it is possible to study a rough surface of vital cells by changing the ion current flow without force action on a cell using scanning capillary microscopy (ion-conducting microscopy). The use of scanning capillary microscopy in the study of cancer cells opens up new opportunities for drugs screening in order to obtain new data on the influence of external conditions changes on the kinetics of tumor growth and the new data on the vital activity of cells.

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments.

² ООО НПП "Центр перспективных технологий" / Advanced Technologies Center.

³ ООО "Энергоэффективные технологии" / Energy Efficient Technologies.

⁴ ИНЭОС РАН, Москва, Россия / INEOS RAS, Russia.



В настоящее время существует множество вопросов в области антираковой медицины. В частности, среди нерешенных, но очень важных задач стоят следующие:

- обнаружение опухолевых маркеров в клетках или в жидкости, таких как микроРНК в сыворотке;
- выявление фенотипов раковых клеток в ответ на микроэнвайрентальные стимулы *in vitro*, такие как рост клеток, подвижность клеток, метаболизм клеток, секреция клеток и т.д.;
- определение клеточного ответа на низкомолекулярные лекарственные средства, которые недавно были разработаны в соответствии с патологическими механизмами;
- изучение механизма лекарственной устойчивости при лечении рака.

Появляющиеся данные свидетельствуют о том, что многие типы раковых клеток имеют повышенный уровень активных форм кислорода (АФК) по сравнению с нормальными клетками [1, 2]. Перекись водорода (H_2O_2) является одной из наиболее важных АФК и связана с различными патологическими и физиологическими процессами. Кроме того, чрезмерное количество H_2O_2 может вызвать повреждение белков, липидов и ДНК в клетках, вызывая различные заболевания, такие как рак, болезнь Альцгеймера, сердечные приступы и болезнь Паркинсона [3, 4]. Кроме

того, из-за того, что раковые клетки генерируют чрезмерное количество H_2O_2 по сравнению с нормальными клетками, H_2O_2 может использоваться в качестве биомаркера для оценки способности окислительного стресса в различных клетках и выявления раковых клеток [5]. Следовательно, эффективное и точное обнаружение H_2O_2 необходимо для мониторинга его концентрации в живых клетках и понимания соответствующих биологических процессов.

Особенность капиллярной микроскопии заключается в неконтактном методе сканирования для получения топографии поверхности клеток, тем самым можно практически исключить влияние метода измерения на результаты эксперимента. В капиллярной микроскопии, в отличие от атомно-силовой, используется капилляр, который наполняется электролитом. В него помещается Ag/AgCl электрод, второй электрод помещается в буфер с образцами клеток. С помощью прецизионной электроники осуществляется перемещение капилляра над поверхностью клетки, изменение ионного тока, проходящего через кончик капилляра, позволяет контролировать положение капилляра над образцом. Тем самым исключается вероятность касания клетки капилляром, поскольку, когда ионный ток минимален, капилляр располагается на максимально близком расстоянии от клетки. Благодаря данной методике

Nowadays there exist a large number of problems in the field of anti-cancer medicine. In particular, the most important, but unsolved tasks are the following:

- detection of tumor markers in cells or in fluid, such as microRNA in serum;
- identification of the phenotypes of cancer cells in response to microenvironmental stimuli *in vitro*, such as cell growth, cell mobility, cell metabolism, cell secretion, etc.;
- determination of the cellular response to small molecule drugs that have recently been developed in accordance with pathological mechanisms;

- studying the mechanism of cancer development, such as drug resistance in cancer treatment.

The emerging data indicate that many types of cancer cells have an elevated level of reactive oxygen species (ROS) compared to normal cells [1, 2]. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is one of the most important ROS that is associated with various pathological and physiological processes. Besides, overstock amount of H_2O_2 can damage proteins, lipids and DNA in cells that causes various diseases such as cancer, Alzheimer's, heart attacks and Parkinson's disease [3, 4]. Moreover, cancer cells generate an excessive amount of H_2O_2 comparing to normal cells, so H_2O_2 can be used as a biomarker

to estimate the ability of oxidative stress in various cells and to detect cancer cells [5]. Hence, an efficient and accurate detection of H_2O_2 is essential for monitoring its concentration in vital cells and understanding the corresponding biological processes.

Peculiarity of capillary microscopy consists in the contactless scanning method used to obtain the cell surface topography thereby practically eliminating influence of the measuring method on the experimental results. In contrast to the atomic force microscopy, the capillary microscopy uses a capillary filled with an electrolyte. The first Ag/AgCl electrode is inserted into it and the second one is placed in a buffer

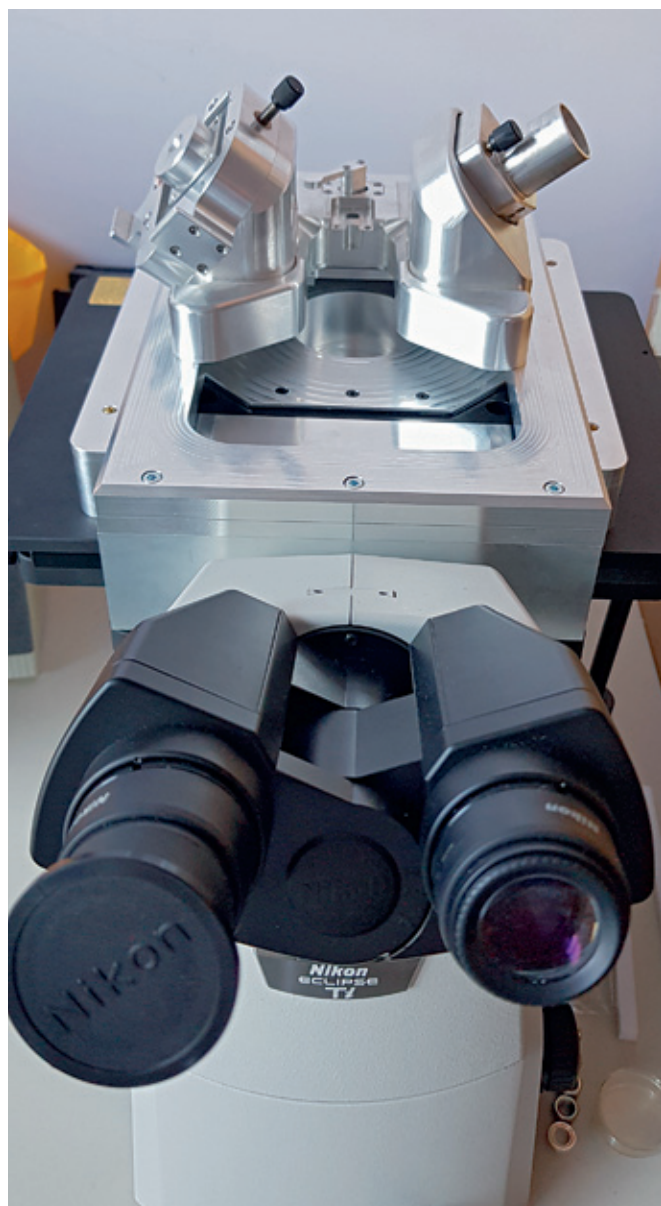


Рис.1. "ФемтоСкан Xi" с установленным модулем для зондовой микроскопии

Fig.1. FemtoScan Xi with installed probe microscopy module

возможно осуществлять сканирование живых объектов в естественной среде и получать изображения без опасения нанести вред образцу, особенно если это касается таких мягких образцов, как живые клетки.

В англоязычной литературе данный метод получил название ион-проводящая микроскопия (SICM). При использовании двухканальных капилляров можно получать не только данные о топографии, но и проводить электрохимический анализ. Второй канал может использоваться как

сенсор или как средство доставки. В этом случае мы имеем дело с электрохимической микроскопией (scanning electrochemical microscopy, SECM). Один канал заполняется электролитом и доставляемыми молекулами, через этот канал также осуществляется позиционирование капилляра над образцом. Второй канал представляет собой углеродный электрод, который измеряет локальную концентрацию и поток подаваемых через канал молекул [6]. Локальная доставка осуществляется за счет управления подаваемым напряжением, что позволяет увеличивать или уменьшать количество подаваемых через капилляр молекул. В работе [7] представлена методика изготовления углеродных наноэлектродов для внутриклеточных электрохимических исследований, в частности, модификация наноэлектрода с помощью платины позволила зарегистрировать концентрацию активных форм кислорода вблизи и внутри клеток гиппокампа. Изменения уровней активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS) и активных форм азота (reactive nitrogen species, RNS) являются индикаторами раковых клеток в популяции. Очевидно, что данная методика имеет большие перспективы для доставки лекарств и скрининга. Встречается применение углеродных капилляров, где ток, возникающий при электрохимическом окислении / восстановлении окислительно-восстановительных молекул на поверхности углерода, реагирует на перемещение частиц [8].

Ozel и коллеги [9] использовали капилляры, функционализированные в качестве сенсоров на глюкозу путем ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы (GOx) на кончике капилляра. Взаимодействие глюкозы с GOx приводит к каталитическому окислению β -D-глюкозы до D-глюконовой кислоты, что может быть измерено как изменение импеданса из-за падения pH-среды на кончике капилляра. Сенсор на глюкозу количественно определял внутриклеточные уровни глюкозы в фибробластах человека, а также в метастатических линиях рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF7. Было обнаружено, что раковые клетки демонстрировали воспроизводимое и точное повышение уровня глюкозы по сравнению с незлокачественными клетками. С помощью капиллярной микроскопии был разработан сенсор на pH для исследования окисления внеклеточного пространства обычными и раковыми клетками [10].

Капиллярная микроскопия может быть использована в качестве платформы для исследования рака и клинического скрининга, помочь



объяснить роль гетерогенности в тканях первичной опухоли и систематически определить критические параметры в прогрессирующем заболевании и потенциальных метастатических состояниях [11, 12].

Капиллярная микроскопия может быть использована для измерения плотности поверхностного заряда и электрохимической активности, а также для доставки веществ. Фаза переменного тока чувствительна к поверхностному заряду, поэтому сдвиг фазы может дать полезную информацию для визуализации заряда одновременно с топографией. Визуализация *in vitro* морфологии раковых клеток в процессе их роста, подвижности, метаболизма и секреции дает прямую информацию о процессе развития раковых заболеваний. Силовое картирование поверхности с помощью механического воздействия со стороны зонда атомно-силового микроскопа или индуцированного механического давления на клетку, создаваемое потоком жидкости через капилляр ион-проводящего микроскопа, дает детальную информацию об изменении локальных механических свойств клеток под воздействием различных внешних факторов, в том числе химических и биомедицинских препаратов.

Успехи капиллярной микроскопии в исследовании живых клеток и их метаболизма подтверждают необходимость продолжения исследований влияния лекарств на единичные раковые клетки для разработки наиболее перспективной стратегии лечения. Благодаря трехмерной

визуализации *in vitro* морфологии раковых клеток с нанометровой точностью и синхронным измерением локальных свойств: жесткости, способности к адгезии, метаболической активности и других – появляется новый актуальный и высшей степени информативный метод изучения раковых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-12-00389), и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-32-90036).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Disco.* v.8. (2009) 579–591.
2. Alexandre J., Batteux F., Nicco C., Chereau C., Laurent A., Guillevin L. et al., Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both *in vitro* and *in vivo*, *Int. J. Cancer* 119 (2006) 41–48.
3. Li Z., Xin Y., Zhang Z. New photocathodic analysis platform with quasi-core/shellstructured $\text{TiO}_2@Cu_2O$ for sensitive detection of H_2O_2 release from living cells, *Anal. Chem.* 87 (2015) 10491–10497.
4. Gao C., Tian Y., Zhang R., Jing J., Zhang X. Endoplasmic reticulum-directed Ratiometric fluorescent probe for quantitative detection of basal H_2O_2 , *Anal. Chem.* 89 (2017) 12945–12950.
5. Liu F., Bing T., Shangguan D., Zhao M., Shao N. Ratiometric fluorescent biosensing of

with cell samples. With the help of precision electronics, the capillary moves over the cell surface; the change in the ion current passing through the capillary tip makes it possible to control the position of the capillary over the sample. This eliminates the possibility of touching the cell with the capillary, because when the ion current is minimal, the capillary is located as close as possible to the cell. Thanks to this technique, it is possible to scan living objects in their natural environment and obtain images without fear of harming the sample, especially when it comes to soft samples such as living cells.

In English literature, this method is called scanning ion-conductance microscopy (SICM). When using two-channel capillaries, not only topography data can be obtained, but also electrochemical analysis can be performed. The second channel can be used as a sensor or as a delivery vehicle. In this case we are dealing with scanning electrochemical microscopy (SECM). One channel is filled with electrolyte and delivered molecules; through this channel, the capillary is also positioned over the sample. The second channel is a carbon electrode that measures the local concentration

and flow of molecules supplied through the channel [6]. Local delivery is carried out by controlling the applied voltage, which allows increasing or decreasing the number of molecules supplied through the capillary. The work [7] presents a technique for the manufacture of carbon nanoelectrodes for intracellular electrochemical studies, in particular, the modification of the nanoelectrode with platinum made it possible to register the concentration of reactive oxygen species near and inside hippocampal cells. Changes in reactive oxygen species (ROS) and reactive



- hydrogen peroxide and hydroxyl radical in living cells with lysozyme-silver Nanoclusters: lysozyme as stabilizing ligand and fluorescence signal unit, *Anal. Chem.* 88 (2016) 10631–10638.
6. **Page A., Kang M., Armitstead A., Perry D., and Unwin P.R.** "Quantitative visualization of molecular delivery and uptake at living cells with self-referencing scanning ion conductance microscopy-scanning electrochemical microscopy," *Analytical Chemistry*. 89, (2017) 3021.
 7. **Paolo A., Sergiy T., Jan C.** et al. Electrochemical nanoprobes for single-cell analysis. *ACS Nano*. V. 8, no. 1, pp. (2014) 875–884.
 8. Resistive-Pulse Sensing Inside Single Living Cells. Rongrong Pan, Keke Hu, Rui Jia, Susan A. Rotenberg, Dechen Jiang, and Michael V. Mirkin. *J. Am. Chem. Soc.*, Just Accepted Manuscript. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b13796>.
 9. **Nascimento R.A.S., Ozel R.E., Mak W.H., Mulato M., Singaram B., Pourmand N.** Single cell "glucose nanosensor" verifies elevated glucose levels in individual cancer cells. *Nano Lett.* 16, (2016) 1194–200.
 10. Measurement of the Extracellular pH of Adherently Growing Mammalian Cells with High Spatial Resolution Using a Voltammetric pH Microsensor. Raluca-Elena Munteanu, Luciana Staanica, Mihaela Gheorghiu, and Szilveszter Gaspar. *Anal. Chem.* 90, (2018) 6899–6905.
 11. **Clark I.E., Dodson M.W., Jiang C., Cao J.H., Huh J.R., Seol J.H., Yoo S.J., Hay B.A., Guo M.** Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, 441, (2006) 1162–1166.
 12. **Ståhlberg A., Thomsen C., Ruff D., Åman P.** Quantitative PCR analysis of DNA, RNAs, and proteins in the same single cell. *Clin. Chem.* 58, (2012) 1682–1691.

nitrogen species (RNS) levels are indicators of cancer cells in the population. Obviously, this technique holds great promise for drug delivery and screening. There is the use of carbon capillaries, where the current arising during the electrochemical oxidation / reduction of redox molecules on the carbon surface reacts to the movement of particles [8].

Ozel and colleagues [9] used capillaries as glucose sensors by covalent immobilization of glucose oxidase (GOx) at the capillary tip. Interaction of glucose with GOx leads to catalytic oxidation of β -D-glucose to D-gluconic acid, which can be measured as a change in impedance due to a drop in the pH of the medium at the capillary tip. A glucose sensor quantified intracellular glucose levels in human fibroblasts as well as in metastatic breast cancer lines MDA-MB-231 and MCF7. Cancer cells were found to show reproducible and accurate increases in glucose levels compared to non-cancerous cells. With the aid of capillary microscopy,

a pH sensor was developed to study the oxidation of the extracellular space by normal and cancer cells [10].

Capillary microscopy can be used as a platform for cancer research and clinical screening, to help explain the role of heterogeneity in primary tumor tissues, and to systematically identify critical parameters in disease progression and potential metastatic conditions [11, 12].

Capillary microscopy can be used to measure surface charge density and electrochemical activity, as well as to deliver substances. The AC phase is sensitive to surface charge, so the phase shift can provide useful information for visualizing charge at the same time as topography. *In vitro* visualization of the cancer cell morphology during their growth, motility, metabolism and secretion provides direct information on the development of cancer. Force mapping of the surface using mechanical action from the probe of an atomic force microscope or induced mechanical pressure on the cell created by the fluid

flow through the capillary of the ion-conducting microscope provides detailed information on the change in the local mechanical properties of cells under the influence of various external factors, including chemical and biomedical drugs.

The successes of capillary microscopy in the study of living cells and their metabolism confirm the need to continue research on the effect of drugs on single cancer cells in order to develop the most promising treatment therapy. A new-to-date and highly informative method for studying cancer cells appears thanks to three-dimensional *in vitro* visualization of the morphology of cancer cells with nanometer precision and simultaneous measurement of local properties – rigidity, adhesion ability, metabolic activity and others. ■

This work was supported by the Russian Science Foundation, project No. 20-12-00389, and the Russian Foundation for Basic Research, project No. 20-32-90036.

pharmtech
& ingredients



a Hyve event

Международная
выставка оборудования,
сырья и технологий
для фармацевтического
производства

10-13
НОЯБРЯ
2020

Россия, Москва
МВЦ «Крокус Экспо»

Получите
бесплатный билет
на сайте
по промо-коду:

pha20N



pharmtech-expo.ru

+7 (495) 799-55-85
pharmtech@hyve.group

