Получено: 3.05.2022 г. | Принято: 11.05.2022 г. | DOI: https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.3-4.168.173
Научная статья

СКАНИРУЮЩАЯ КАПИЛЛЯРНАЯ МИКРОСКОПИЯ: ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

И.В.Яминский[1, 2, 3], д.ф.-м.н., проф. МГУ им. М.В. Ломоносова, физический и химический факультеты, генеральный директор Центра перспективных технологий, директор Энергоэффективных технологий, *ORCID: 0000-0001-8731-3947* / ***yaminsky@nanoscopy.ru***
А.И.Ахметова[1, 2, 3], инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий, *ORCID: 0000-0002-5115-8030*
Т.О.Советников[1, 2], инженер, *ORCID: 0000-0001-6541-8932*
М.А.Тихомирова[1, 5] м.н.с., *ORCID: 0000-0001-5675-9188*
Шуанг Янг[4], проф., *ORCID: 0000-0002-4779-8553*

Аннотация. Сканирующая капиллярная микроскопия (или сканирующая ион-проводящая микроскопия) – одна из методик сканирующей зондовой микроскопии, основанная на использовании нанокапилляров. Важным преимуществом СКМ перед остальными методами является несиловое воздействие на объект исследования в процессе измерения, а также возможность проводить исследования в естественной среде – в жидкости, вследствие чего эта методика стала активно использоваться в биологических и медицинских исследованиях. Еще одним оригинальным преимуществом СКМ является использование двухканальных капилляров, что позволяет применять эту методику в качестве сенсора, например, для измерения активных форм кислорода вблизи клетки.

Ключевые слова: сканирующая капиллярная микроскопия, мезенхимальный и мезенхимоподобный фенотип, морфологический портрет, раковые клетки, карцинома человека

Для цитирования: И.В. Яминский, А.И. Ахметова, Т.О. Советников, М.А. Тихомирова, Шуанг Янг. Сканирующая капиллярная микроскопия: визуализация опухолевых клеток. НАНОИНДУСТРИЯ. 2022. Т. 15, № 3–4. С. 168–173. https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.3-4.168.173

Received: 3.05.2022 | Accepted: 11.05.2022 | DOI: https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.3-4.168.173
Original paper

SCANNING CAPILLARY MICROSCOPY: TUMOUR CELLS VISUALISATION

I.V.Yaminsky[1, 2, 3], Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center, Director of Energy Efficient Technologies, *ORCID: 0000-0001-8731-3947* / ***yaminsky@nanoscopy.ru***
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, *ORCID: 0000-0002-5115-8030*
T.O.Sovetnikov[1, 2], Engineer, *ORCID: 0000-0001-6541-8932*
M.A.Tikhomirova[1, 5], Junior Researcher, *ORCID: 0000-0001-5675-9188*
Shuang Yang[4], Prof., *ORCID: 0000-0002-4779-8553*

1 МГУ им. М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Moscow, Russia
2 ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia
3 ООО "Энергоэффективные технологии", Москва, Россия / Energy Efficient Technologies, Moscow, Russia
4 Нанькайский университет, медицинский факультет, Нанькай, Китай / Nankai University, School of Medicine, Nankai, China
5 Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН / Koltzov Institute of Developmental Biology of RAS

Abstract. Scanning capillary microscopy (or scanning ion-conductance microscopy) is a scanning probe microscopy technique based on the use of nanocapillaries. Important advantages of SCM over other methods are its non-violent action on a studied objects during 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. Another unique advantage of SCM is the use of dual-channel capillaries which allows the technique to be used as a sensor, e.g. for measuring reactive oxygen species close to a cell.

Keywords: scanning capillary microscopy, mesenchymal and mesenchymal-like phenotype, morphological profile, cancer cells, human carcinoma

For citation: I.V. Yaminsky, A.I. Akhmetova, T.O. Sovetnikov, M.A. Tikhomirova, Shuang Yang. Scanning capillary microscopy: tumour cells visualisation. NANOINDUSTRY. 2022. V. 15, no. 3–4. PP. 168–173. https://doi.org/10.22184/1993-8578.2022.15.3-4.168.173

ВВЕДЕНИЕ

Сканирующая капиллярная микроскопия (СКМ) успешно используется для исследования механических реакций живых клеток, например, для оценки объема живых эндотелиальных клеток под влиянием гемодинамического сдвигового напряжения в кровеносных сосудах [1] и для оценки жесткости плазматической мембраны при приложенном гидростатическом давлении [2].

Использование капилляра в качестве резервуара имеет потенциальное применение для доставки определенных молекул и терапевтических средств в конкретную клетку или субклеточную область. В этом отношении двухканальные капилляры уже использовались для доставки микрочастиц [3] и полимеров [4] в живые клетки корней растений.

В работе [5] представлена методика изготовления углеродных наноэлектродов для внутриклеточных электрохимических исследований, в частности, модификация наноэлектрода с помощью платины позволила зарегистрировать

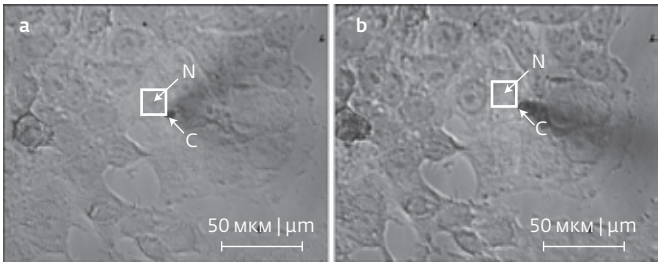


Рис.1. Оптические снимки сканируемых областей ядер клеток HeLa (A) и (B) с увеличением 40x. Стрелками (C) и (N) отмечены кончик капилляра, который виден сквозь образец, и клеточное ядрышко соответственно

Fig.1. Optical images of scanned regions of HeLa cell nuclei (A) and (B) at 40x magnification. Arrows (C) and (N) mark the capillary tip visible through the sample and cell nucleous, respectively

INTRODUCTION

The scanning capillary microscopy (SCM) has been successfully used to study mechanical response of living cells, e.g., to assess the living endothelial cells volume under hemodynamic shear stress in blood vessels [1] and to evaluate plasma membrane stringency under applied hydrostatic pressure [2].

Use of the capillary as a reservoir has potential applications for delivery of certain molecules and therapeutic agents to a specific cell or subcellular region. In this respect, double-channel capillaries have already been used to deliver microparticles [3] and polymers [4] to living plant root cells.

In [5] the technique of making carbon nanoelectrodes for intracellular electrochemical studies is presented, in particular, for modification of nanoelectrode with platinum allowed to register concentration of reactive oxygen species near and inside hippocampal cells.

Precise deposition of biotinylated DNA on a streptavidin-coated glass substrate and protein G on a positively charged glass substrate were carried out [6]. It is also possible to precisely apply femto- and attolitre drops of water onto a substrate whereby a high uniformity of the feed rate is achieved and, consequently, addition of the equal portions of water is possible; furthermore, addition of reagent from a capillary is possible while maintaining the volume of the drop [7].

In addition to material delivery to the surface, the capillary also allows single-cell nanobiopsy by extracting a small amount of material from inside the cell, which is then subjected to further analysis [8, 9]. Such extraction is valuable because the subsequent analysis can be linked to the cell location or used to compare properties of a number of cells in a group.

When applied to cancer cell research, capillary microscopy can provide essential information for further treatment.

Cancer has the ability to develop resistance to conventional treatments, and the increasing prevalence of these

концентрацию активных форм кислорода вблизи и внутри клеток гиппокампа.

С высокой точностью осуществлялось нанесение биотинилированной ДНК на стеклянную подложку, покрытую стрептавидином, и протеина G на положительно заряженную стеклянную подложку [6]. Также возможно прецизионное нанесение на подложку фемто- и аттолитровых капель воды, при котором достигается высокая равномерность величины подачи, и, как следствие, возможно добавление одинаковых порций воды; более того, возможно добавление реагента из капилляра при сохранении объема капли [7].

Помимо возможности доставки материала на поверхность, капилляр также позволяет выполнять одноклеточную нанобиопсию путем извлечения небольшого количества материала изнутри клетки, которая затем подвергается дальнейшему анализу [8, 9]. Такое извлечение является ценным, поскольку последующий анализ может быть привязан к местоположению клетки или использоваться для сравнения свойств ряда клеток в группе.

Применимо к исследованию раковых клеток капиллярная микроскопия может дать существенную информацию для дальнейшего лечения.

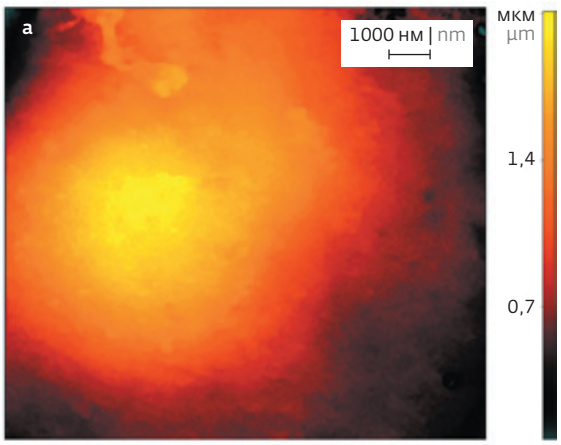
Раковое заболевание обладает способностью развивать устойчивость к традиционным методам лечения, и растущая распространенность этих лекарственно-устойчивых форм онкологии требует дальнейших углубленных исследований и разработки эффективных методов лечения.

Хотя многие виды онкологии изначально подвержены химиотерапии, со временем они могут развить резистентность с помощью мутации ДНК и метаболических изменений, которые способствуют ингибированию и деградации лекарственного средства.

При исследовании людей с раком молочной железы было показано, что пациенты с опухолями, экспрессирующими высокие уровни ZEB1 (белок цинкового пальца), плохо реагировали на химиотерапию [10]. В данном случае СКМ позволяет исследовать мезенхимальный или мезенхимоподобный фенотип и сформировать морфологический портрет опухолевых клеток, определить такие признаки, как форма, шероховатость, размеры клеток и ядра, расположение ядер (наличие скученности ядер), количество внутриклеточного вещества и др.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установка СКМ собрана на базе инвертированного оптического микроскопа Nikon Ti-U. В схеме самого микроскопа задействованы:



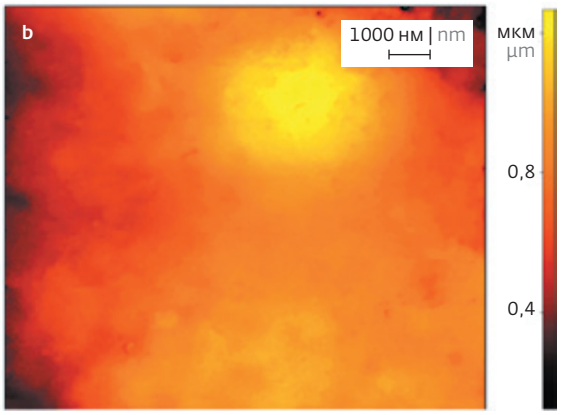


Рис.2. 2D-топография сканируемых областей, ярко-желтым цветом показана область клеточного ядрышка клетки HeLa

Fig.2. 2D topography of scanned areas, bright yellow shows HeLa cell nucleous

drug-resistant forms of cancer requires further in-depth research and effective treatments development.

Although many cancers are initially susceptible to chemotherapy, over time they can develop resistance through DNA mutation and metabolic changes that contribute to inhibition and degradation of the drug.

When examining people with breast cancer, it has been shown that patients with tumours expressing high levels of ZEB1 (zinc finger protein) responded poorly to chemotherapy [10]. In this case, SCM makes it possible to examine the mesenchymal or mesenchymal-like phenotype and form a morphological portrait of tumour cells, to determine features such as shape, roughness, cell and nucleus size, nuclear arrangement (presence of nuclear crowding), amount of intracellular substance, etc.

высоковольтный усилитель, подающий сигнал на пьезокерамические подвижки; высокочувствительный усилитель ионного тока, создающий разницу потенциалов между электродами и измеряющий напряжение текущего ионного тока (усилитель имеет регулятор, позволяющий подстраивать коэффициент преобразования ток-напряжение от 0.5 до 1000 мВ/пА) и цифровой контроллер (блок управления) микроскопа, принимающий сигнал с усилителя тока и подающий управляющие сигналы на выходной усилитель, для подачи напряжения на пьезокерамический манипулятор.

Клетки карциномы человека (HeLa, Российская коллекция клеточных культур человека, животных и растений, Институт цитологии, Санкт-Петербург, Россия) выращивали в среде ДМЕМ (ПанЭко, Москва, Россия) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Logan, UT, США), 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Москва, Россия) и раствора антибиотика-антимикотика (Gibco, Waltham, MA, USA). Фиксация клеток проводилась в 3,7 % параформальдегиде (PFA) в течение 10 минут, далее клетки отмывались в физрастворе (0,9 М NaCl), который в дальнейшем служил и в качестве электролитической среды в процессе сканирования.

Сканирование проводилось капилляром с выходным отверстием около 100 нм, амплитуда и частота колебаний в режиме прерывистого контакта (hopping-mode) составляли 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 мкм^2, разрешение 512×512 точек.

Постобработка снимков проводилась в ПО ФемтоСкан Онлайн [11] посредством медианной фильтрации и выравнивания уровня подложки по выбранным участкам подложки на полученном изображении.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В инвертированном оптическом микроскопе наблюдалась организация клеточных структур на подложке: клетки собираются в островки, при этом заметны характерные отростки в местах присоединения клеток к подложке (Рис.1).

На рис.2 представлены изображения клеток, полученные с помощью сканирующего капиллярного мироскопа. Наблюдается морфология клеточной поверхности, которая также прямо указывает на организацию субмембранных структур: различимо ядрышко клетки (показано желтым градиентом), что отчетливо соотносится с данными оптической микроскопии.

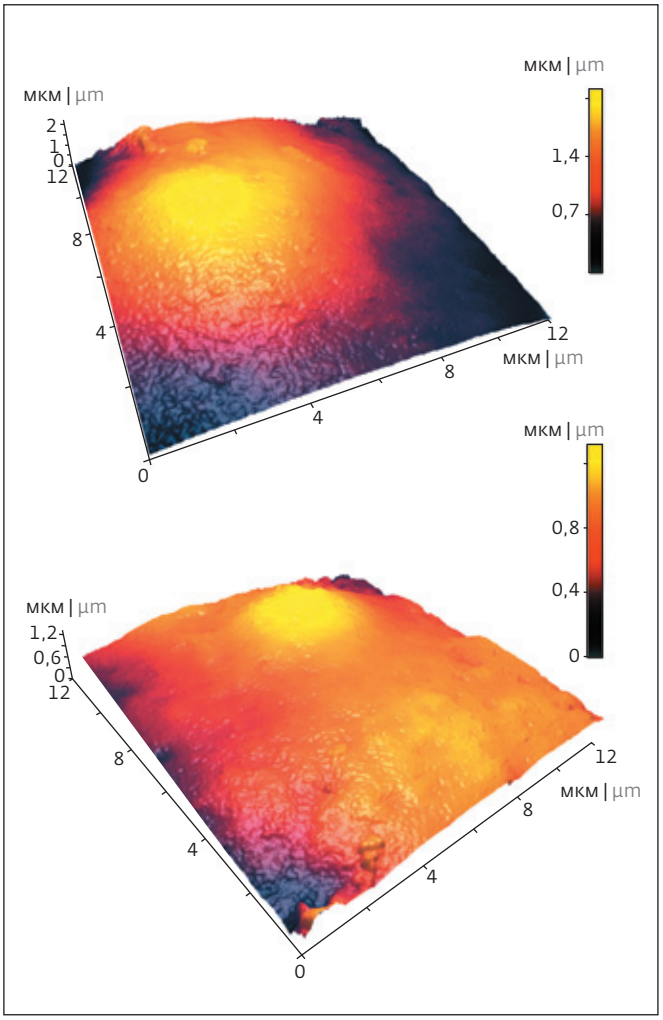


Рис.3. 3D-топография сканируемых областей, соответствующая рис.2

Fig.3. 3D topography of scanned areas corresponding to Fig.2

RESEARCH METHODS AND MATERIALS

The SCM is based on a Nikon Ti-U inverted optical microscope. The microscope circuit itself includes a high voltage amplifier that supplies a signal to the piezoceramic slides, a high sensitivity ion current amplifier that creates a potential difference between the electrodes and measures voltage of the ion current (amplifier has a regulator that allows to adjust the current-voltage conversion coefficient from 0.5 to 1000 mV/pA) and a digital controller (control unit) of the microscope that receives a signal from the ion-current amplifier and supplies control signals to an output amplifier to supply voltage to the piezoceramic manipulator.

Human carcinoma cells (HeLa, Russian collection of human, animal and plant cell cultures, Institute of Cytology, St. Petersburg, Russia) were grown in DMEM medium (PanEco, Moscow, Russia) with

На рис.4 представлены изображения отростков клетки в 2D и 3D виде.

Сканирующая капиллярная микроскопия позволяет не только визуализировать объекты в трехмерном масштабе, но и дает возможность получать и использовать ряд экспериментальных данных в диагностических целях. На основе полученных изображений измерена средняя шероховатость поверхности клеток, которая в области клеточных ядер составляет по показателю $R_a = 0{,}4$ мкм (среднее по модулю), по среднеквадратичному отклонению шероховатость R_q составила 0,5 мкм, а в области отростков 0,045 и 0,06 мкм соответственно, что практически в 10 раз меньше.

ВЫВОДЫ

СКМ имеет особую значимость в исследовании живых систем. В биоприложениях интерес могут представлять не только получение информации о морфологии объектов, измерение локальных биотоков и т.д., но и методики адресной доставки агентов к исследуемому образцу, что позволяет изучать его реакцию на внешнее воздействие и, как следствие, получать качественно новую и более значимую информацию о процессе его жизнедеятельности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества № 21-58-10005, РФФИ, проект № 20-32-90036. Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям, проект № 71108, договор 0071108. Работа выполнена при содействии компании ООО "Эндор" (Москва).

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

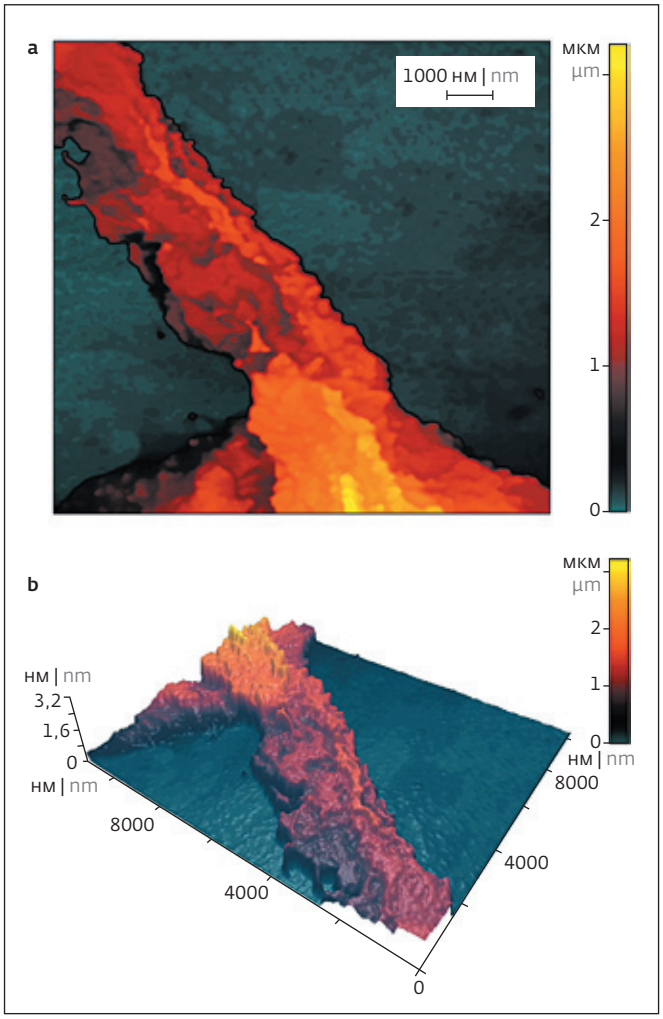


Рис.4 a – 2D и b – 3D-топография отростка клетки HeLa
Fig.4 a – 2D and b – 3D topography of the HeLa cell filopodia

the addition of 10% thermoinactivated fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT, USA), 2 mM L-glutamine (PanEco, Moscow, Russia) and an antimicrobial solution (Gibco, Waltham, MA, USA). Cell fixation was performed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) for 10 min, then the cells were washed in saline (0.9 M NaCl), which further served as electrolytic medium during scanning.

The scanning was carried out with 100 nm tip openning capillary, the amplitude and frequency of the hopping-mode were 1 µm and 15 Hz, respectively. The control point of the ion current drop was 1.2 % of the value at the distance from the sample. Image size is 10.3×10.3 µm^2, and resolution 512×512 pixels.

The images were post-processed in FemtoScan Online software [11] using median filtering and substrate level alignment to the selected areas in the resulting image.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Potter C.M.F., Lundberg M.H., Harrington L.S., Warboys C.M., Warner T.D.** Role of shear stress in endothelial cell morphology and expression of cyclooxygenase isoforms. Arter. Thromb. Vasc. Biol. 31:384–414. 2011. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.214031
2. **Sanchez D., Johnson N., Li C., Novak P., Rheinlander J.** Noncontact measurement of the local mechanical properties of living cells using pressure applied via a pipette. Biophys. J. 95:3017–27. 2008. https://doi.org/10.1529/biophysj.108.129551

3. **O'Connell M.A., Snowden M.E., McKelvey K., Gayet F., Shirley I., Haddleton D.M., Unwin P.R.** Positionable vertical microfluidic cell based on electromigration in a theta pipet. Langmuir 30:10011–10018. 2014. https://doi.org/10.1021/la5020412
4. **McKelvey K., O'Connell M.A., Unwin P.R.** Meniscus confined fabrication of multidimensional conducting polymer nanostructures with scanning electrochemical cell microscopy (SECCM). Chem. Comm. 49:2986–2988. 2013. https://doi.org/10.1039/C3CC00104K
5. **Paolo A., Sergiy T., Jan C.** et al. Electrochemical nanoprobes for single-cell analysis. ACS Nano. 2014. Vol. 8, no. 1. PP. 875–884. https://doi.org/10.1021/nn405612q
6. **Bruckbauer A., Ying L., Rothery A.M., Zhou D., Shevchuk A.I., Abell C., Korchev Y.E., Klenerman D.** Writing with DNA and Protein Using a Nanopipet for Controlled Delivery. J. Am. Chem. Soc. 124 (30):8810–8811. 2002. https://doi.org/10.1021/ja026816c
7. **Rodolfa K.T., Bruckbauer A., Zhou D., Shevchuk A.I., Korchev Y.E., Klenerman D.** Nanoscale Pipetting for Controlled Chemistry in Small Arrayed Water Droplets Using a Double-Barrel Pipet. Nano Lett. 6(2) 252–257. 2006. https://doi.org/10.1021/nl052215i
8. **Actis P., Maalouf M.M., Kim H.J., Lohith A., Vilozny B., Seger R.A., Pourmand N.** Compartmental genomics in living cells revealed by single-cell nanobiopsy. ACS Nano 8:546–553. 2014. https://doi.rg/10.1021/nn405097u
9. **Nashimoto Y., Takahashi Y., Zhou Y., Ito H., Ida H., Ino K., Matsue T., Shiku H.** Evaluation of mRNA localization using double barrel scanning ion conductance microscopy. ACS Nano 10:6915–6922. 2016. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02753
10. **Zhang X.** et al. ZEB1 confers chemotherapeutic resistance to breast cancer by activating ATM. Cell Death and Disease 9:57. 2018. https://doi.org/10.1038/s41419-017-0087-3
11. **Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B.** FemtoScan Online software and visualization of nanoobjects in high resolution microscopy. NANOINDUSTRY. 2018. V. 11. 6 (85). PP. 414–416. http://dx.doi.org/10.22184/1993-8578.2018.11.6.414.416

Декларация о конфликте интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.*

RESULTS

In an inverted optical microscope the cellular structures organization on the substrate was observed: cells clumped together in islands, with characteristic filopodia visible where cells were attached to the substrate (Fig.1).

Figure 2 shows images of cells obtained with a scanning capillary microscope. Morphology of the cell surface is observed, which also directly indicates the organisation of the sub-membrane structures: the cell nucleous (shown in yellow gradient) is distinguishable, which clearly correlates with optical microscopy data.

Figure 3 shows images of cell filapodia in 2D and 3D views.

The scanning capillary microscopy allows of not only visualisation of objects in three-dimensional scale but also gives an opportunity to obtain and use a number of experimental data for diagnostic purposes. Based on the obtained images, the average roughness of the cell surface was measured, which in the area of cell nuclei is R_a =0.4 μm (modulo average), in the area of cell nuclei R_q roughness was 0.5 μm, and in the area of filapodia 0.045 μm and 0.06 μm respectively, which is almost 10 times less.

CONCLUSIONS

The SCM is of particular importance in living systems study. In bio-applications it may be interesting not only to obtain information on the object morphology, to measure local biocurrents, etc., but also to targetedly deliver agents to the studied sample, that allows studying its response to external influence and, consequently, obtain qualitatively new and more meaningful information on its vital activity process.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was completed with the financial support of the RFBR, the London Royal Society No. 21-58-10005, RFBR, Project No. 20-32-90036, and from the Foundation for the Promotion of Innovation, Project No. 71108, Agreement 0071108, and with the support of Endor LLC, Moscow.

PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

Declaration of Competing Interest. *The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.*