

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

БИОФИЗИКА

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

МОСКВА

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК: ОБЗОР ДОСТИЖЕНИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

© 2011 г. Ю.М. Ефремов*, Д.В. Багров* **, Е.В. Дубровин**,
К.В. Шайтан*, И.В. Яминский**

*Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Воробьевы горы, 1, стр. 12;

**Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Воробьевы горы, 1, стр. 2

E-mail: dubrovin@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 29.06.10 г.

Представлен обзор достижений и анализ развития метода атомно-силовой микроскопии для исследования животных клеток, причем большое внимание уделено исследованию живых клеток. Рассмотрены особенности и задачи данного метода исследования, проанализирован ряд специальных методик, основанных на использовании атомно-силовой микроскопии. Обсуждены вопросы выбора геометрии зондов для задач, связанных с исследованием животных клеток, определения клеточной адгезии на субстрате, проведения картирования поверхности клеток с использованием химически модифицированных кантилеверов, анализа распределения молекулярных компонентов внутри клетки с использованием микро- и микрохирургических подходов. Рассмотрены особенности совмещения атомно-силовой микроскопии с оптической и лазерной сканирующей конфокальной микроскопией. Обсуждены возможные направления применения указанного метода в биотехнологии и медицине.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, силовая спектроскопия, микрохирургия, живые клетки, животные клетки, клеточная адгезия, модификация кантилевера.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) широко применяется в биологии, с чем связано даже появление такого термина, как биологическая АСМ. Одним из направлений биологической АСМ является изучение клеток, причем живые клетки как объект исследования представляют наибольший интерес. Особенность АСМ живых клеток связана с тем, что они подвижны, и их исследование требует специальных экспериментальных приемов. Необходимо отметить, что одним из неоспоримых преимуществ АСМ по сравнению с другими видами микроскопии высокого разрешения является возможность проводить исследования в водных растворах. Кроме того, на базе АСМ возник ряд новых методик, таких как химическая силовая микроскопия, силовая спектроскопия, наноманипулирование и др. Живые клетки являются объектом, позволяющим максимально использовать весь арсенал АСМ и тем самым

получать уникальную информацию об образце. Принимая также во внимание большую фундаментальную и прикладную значимость прямого исследования живых клеток с высоким разрешением, развитие методик АСМ для этих объектов является чрезвычайно важным.

Целью данного обзора было рассмотрение основных задач, которые ставятся при работе с животными клетками с помощью АСМ, способы решения этих задач, а также особенности экспериментального оборудования, которое требуется для работы с клетками. При этом большое внимание уделено изучению именно живых животных клеток. В обзоре приведены конкретные примеры применения АСМ для исследования животных клеток, которые, в частности, очерчивают круг важных прикладных и фундаментальных задач в этой области.

ОСОБЕННОСТИ И ЗАДАЧИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ КАК МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

Основным методом визуализации в клеточной биологии в настоящее время продолжает

Сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия, ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, GFP (green fluorescent protein) – зеленый флуоресцирующий белок, TrkA – тирозинкиназа А, NGF – фактор некроза нервов, VEGF – васкулярный эндотелиальный фактор роста.

оставаться оптическая микроскопия [1,2]. Это связано с целым рядом причин: используемые в оптической микроскопии методические приемы более тщательно отработаны, чем в других видах микроскопии, с ее помощью сделано колоссальное количество открытий в гистологии и цитологии. Второе место по значимости занимает электронная микроскопия: молодой, по сравнению с оптической микроскопией, метод, обеспечивающий высокое пространственное разрешение и поэтому незаменимый в биологических исследованиях [3,4]. Атомно-силовая микроскопия – относительно недавно возникшая область, которая на данном этапе развития направлена в основном на решение конкретных специфических задач, отвечающих особенностям метода.

В данном обзоре обсуждаются современные достижения и перспективы развития АСМ как метода исследования клеток. Делается акцент на работе с живыми клетками, поскольку эксперименты с ними наиболее актуальны и интересны, при этом сложны и их проведение требует специальных методик и оборудования [5]. Для того чтобы клетки оставались живыми в ходе исследования, необходимо, чтобы они находились в естественном физиологическом окружении. Возможность проведения измерений в жидкой среде является особенностью АСМ, радикально отличающей этот метод от метода электронной микроскопии и повышающей его значимость при работе с клетками.

Следует отметить, что наблюдение живых клеток с помощью АСМ является нетривиальной задачей из-за их подвижности. Поэтому с момента изобретения АСМ до настоящего времени получение качественных изображений живых клеток является важной самостоятельной задачей [6]. Наиболее распространенными объектами исследований являются фибробласты [7], нейроны [8], раковые клетки [9]. По полученным изображениям обычно определяют следующие параметры: форму клеток, диаметр (в общем случае характерный линейный размер), высоту над подложкой, объем (он складывается из объема ядра, которое хорошо заметно, и объема цитоплазмы). Обычно эти параметры обобщаются термином «морфологические», они несут информацию о взаимодействии клетки с субстратом, о взаимодействии клеток между собой, о биологическом состоянии клетки и влиянии на нее различных веществ.

Возможность измерения объема клетки, адсорбированной на подложку, имеет большое значение [10]. Для определения объема клеток в суспензиях можно использовать оптические методы (например, светорассеяние), или кон-

дуктометрические, широко применяемые в гематологии. Однако для определения объема клетки, находящейся на подложке, эти методы неприменимы. Существуют оптические методы (например, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ)), которые позволяют измерить объем адсорбированной клетки, однако метод АСМ имеет перед ними преимущество, поскольку он относительно быстрый, слабо зависит от конкретного типа клеток и позволяет определить морфологию поверхности одновременно с измерением формы и объема.

Изменение морфологических параметров в ответ на биохимические [10] и физические [11] воздействия дает информацию о внутриклеточных процессах. Например, методом АСМ было показано, что в ответ на действие альдостерона увеличивается объем чувствительных к нему клеток (использовались клетки пупочной вены) [10]. Вычитая изображение, полученное после добавления альдостерона, из полученного перед этим, можно локализовать объем, который добавляется в результате набухания. С помощью АСМ было продемонстрировано действие магнитного поля на клетки [11]. Клетки лимфобластомы подвергались действию поля 2 Тл с частотой 50 Гц. Выяснилось, что по мере воздействия уменьшается высота клетки над подложкой, микроворсинки перестают быть видимыми, растет количество углублений на поверхности. Эти морфологические эффекты могут свидетельствовать о возникновении функциональных отклонений (например, в клеточной подвижности и узнавании).

Измерение морфологических характеристик адсорбированных клеток является простейшим способом описания клеточной адгезии [12]. Так, большая площадь контакта между клеткой и субстратом и малая высота говорят о хорошей адгезии, хотя это утверждение не может напрямую применяться к клеткам малого размера.

В данном обзоре многократно будет подчеркиваться важность процесса взаимодействия кантилевера с клеткой. Острый кантилевер может легко проникнуть в клетку, причем это воздействие может быть либо смертельным для нее [8], либо абсолютно обратимым [11,13,14]. С учетом последнего в перспективе появляется возможность выполнения микрохирургических операций с помощью АСМ, которая будет обсуждаться ниже.

С помощью АСМ можно наблюдать деформацию и другие изменения морфологии клетки, поврежденной кантилевером [8]. Это было показано на примере нейронов: после повреждения кантилевером мембраны на теле нейрона цитоплазма клетки вытекает и образует ореол,

в котором контуры клетки слабо различимы. Выяснилось, что при повреждении аксона клетка остается живой: можно перерезать аксон кантилевером множество раз, и это не приведет к гибели клетки. К гибели приводил надрез на теле клетки на глубину ~100 нм и длиной менее 3 мкм.

Влияние кантилевера на морфологию клетки существенно зависит от типа клеток. Это было показано при сопоставлении изображений клеток двух типов: клеток нейробластомы линии SK-N-SH и клеток сирийского хомяка линии AV12 [15]. Было обнаружено, что плотная адгезия является одним из важнейших факторов, влияющих на выживание клеток в процессе сканирования. Для выживания клеток линии AV12 требуется как наличие межклеточных контактов, так и адгезия к межклеточному матриксу. При выращивании на стекле клетки этой линии образуют группы, сцепленные между собой волокнами матрикса. Когда целостность группы нарушается, клетки быстро сметаются кантилевером с подложки. В отличие от них, клетки линии SK-N-SH (она включает в себя клетки двух типов) располагаются на подложке преимущественно поодиночке. Под действием кантилевера в процессе сканирования клетки этой линии начинают деформироваться, для них межклеточные контакты относительно неважны. Отметим, что подвижность клеток является основным фактором, который препятствует получению высокого пространственного разрешения в экспериментах с живыми клетками на АСМ [6].

Кроме измерения топографических характеристик клеток, АСМ позволяет определять локальные неоднородности их механических свойств. Это достигается при использовании таких режимов, как фазовый контраст, микроскопия латеральных сил, метод модуляции силы. Однако наибольшее распространение получила силовая спектроскопия, поскольку, в отличие от других перечисленных методов, она позволяет провести количественные измерения (в рамках теоретической модели взаимодействия зонда с клеткой) таких величин, как сила взаимодействия кантилевера с образцом или модуль упругости изучаемого объекта. В частности, в ряде исследований были измерены значения модуля упругости клеток различных типов. Их величины варьируют от десятых долей до сотен кПа [16].

Известно, что получаемые при измерении методом силовой спектроскопии значения имеют значительные погрешности, которые возникают из-за неопределенности в форме иглы, жесткости кантилевера и т.д. Тем не менее

важно, что АСМ позволяет оценить градиенты жесткости на клетке, соотнести их с внутриклеточными структурами, а также проследить за изменением жесткости в ответ на физические и биохимические воздействия.

Измерения модуля Юнга проводят путем индентации – вдавливания острия зонда в клетку. Как правило, значения модуля Юнга для конкретного типа клеток варьируют в широких пределах (более подробные данные приведены в работах [12,16]). Так, например, модуль Юнга для остеобластов составлял от 0,3 до 20 кПа [17]. Кроме того, разные авторы часто приводят существенно различные значения модуля Юнга для клеток одного и того же типа – это является иллюстрацией к существующим в силовой спектроскопии методическим и метрологическим сложностям. Во-первых, большое значение имеет процедура приготовления образца: необходима надежная адгезия клетки на подложке (как и во всех экспериментах, проводимых с помощью АСМ), но при этом материал подложки часто оказывает влияние на жесткость клетки, как было в приведенном примере с остеобластами [17]. Второй фактор – высота клетки над подложкой. Если глубина, на которую погружается зонд, составляет менее 10% от высоты клетки над подложкой, то влиянием последней можно пренебречь [16]. Однако если это условие не выполняется, влияние подложки необходимо учитывать, вводя поправки в модель, используемую для вычисления модуля Юнга [18]. Третий фактор связан с гетерогенностью механических свойств клеток, т.е. с вариациями локального модуля Юнга клетки в зависимости от расположения субклеточных структур. Так, во многих работах отмечаются разные значения жесткости над ядром, приядерной областью и периферией клетки [16].

Наибольшее влияние на жесткость клетки оказывают элементы цитоскелета. В работе [19] показано, что после добавления к лимфоцитам и клеткам линии Юркат цитохалазина В, дестабилизирующего актиновые филаменты, жесткость клеток снизилась на 60–70%. Кроме вышеназванных факторов, на жесткость клетки влияет ее функциональное состояние. По литературным данным, при изменении внешних условий часто жесткость клетки изменяется намного сильнее, чем ее морфология. Например, тромбоциты способны активироваться в результате механического воздействия, причем активация сопровождается изменением их формы и структуры их цитоскелета [20]. При небольшой силе воздействия тромбоциты, адсорбированные на подложку, можно сканировать длительное время, не вызывая в них изменений. Однако

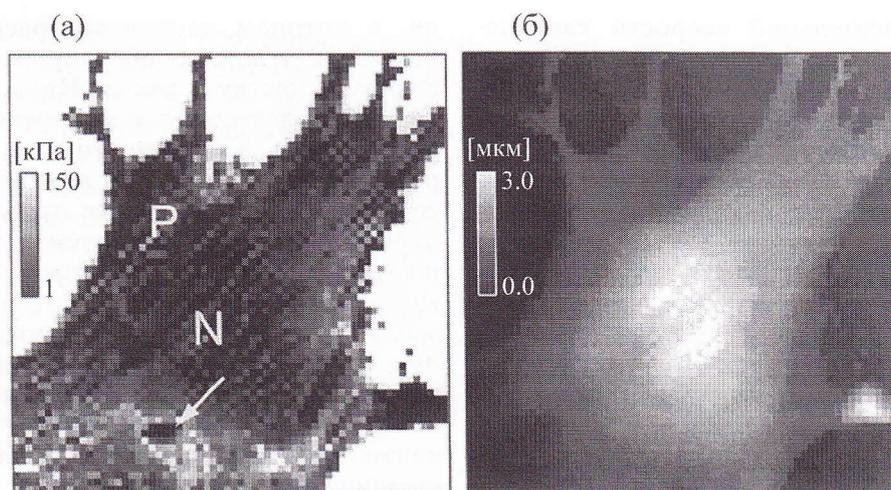


Рис. 1. Распределение локального модуля Юнга (а) и топографическое изображение (б) фибробласта мышцы NIH3T3. На (а): N – ядро, P – наиболее мягкая часть, стрелкой показан относительно мягкий участок в перинуклеарной области. Снимок из работы [7] приведен с любезного разрешения издательства Elsevier.

увеличение силы, с которой осуществляется сканирование, ведет к их активации.

С использованием силовой спектроскопии наблюдалось движение фибробластов по субстрату [21]. Для неподвижных клеток распределение жесткости оставалось постоянным в течение длительного времени, однако у движущихся клеток происходило резкое снижение жесткости в области ядра. При исследовании фибробластов сопоставление данных АСМ и конфокальной микроскопии показало, что основной вклад в жесткость вносят промежуточные и актиновые филаменты, а микротрубочки влияют на нее относительно слабо [7].

Метод АСМ позволяет проследить изменения жесткости клеток, сопровождающие их дифференцировку и старение [16,22]. Например, с помощью силовой спектроскопии было показано (на примере клеток мыши), что развитие миоцитов в мышечные волокна сопровождается ростом модуля Юнга до дифференцировки от $11,5 \pm 1,3$ кПа до $45,3 \pm 4,0$ кПа на восьмой день дифференцировки [22].

Как известно, при проведении силовой спектроскопии по сетке результатом эксперимента является карта распределения значений локального модуля Юнга. Пример такой карты для фибробластов приведен на рис. 1. Отметим, что эти карты обычно имеют низкое разрешение (64×64), по сравнению с обычными АСМ-изображениями (512×512).

При интерпретации данных силовой спектроскопии обычно пользуются моделью Герца. Она дает хорошо известные соотношения для силы взаимодействия зонда и образца [23] для

кантилевера со сферическим острием радиусом R , которое продавливает образец на глубину δ . Эта сила взаимодействия равна:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^{3/2} \sqrt{R}, \quad (1)$$

где E – локальный модуль Юнга, ν – коэффициент Пуассона образца. Для конического острия с углом α при вершине сила вычисляется по формуле:

$$F = \frac{\pi}{2} \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^2 \text{tg}(\alpha). \quad (2)$$

При работе с клетками обычно принимают коэффициент Пуассона $\nu = 0,5$ (деформация с сохранением объема). Отметим, что разные авторы часто модифицируют эти формулы, вводя дополнительные коэффициенты или множители, или применяют другие модели, например модель Димитриадиса, учитывающую влияние толщины образца [24]. Применение модели Герца требует, чтобы исследуемый образец был однородным и изотропным – это условие для клеток, вообще говоря, не выполняется. В то же время она позволяет аппроксимировать силовые кривые с приемлемой точностью и поэтому широко используется для вычисления модуля Юнга.

Прямое использование формул (1) и (2) осложняется тем, что деформация клеток имеет вязкоупругий характер. Это было показано для клеток рака груди двух линий: MCF-7 и MCF-10A [9]. При увеличении частоты прикладываемой силы (в ходе измерений это достигалось

изменением относительной скорости кантилевера и образца) значение модуля Юнга изменялось в 1,4–1,8 раза. Зависимость измеряемого модуля Юнга от скорости деформации относительно редко учитывается в экспериментах.

Ниже будут приведены примеры других применений, однако эти являются основными, поскольку они непосредственно следуют из принципа действия АСМ и не требуют дополнительных модификаций оборудования.

Подводя итог описанию особенностей бионаноскопии клеток млекопитающих, подчеркнем следующее. Основные цели и задачи исследований связаны с

- измерением морфологических характеристик клеток, в том числе изменений этих характеристик, происходящих при физических, химических или биологических воздействиях;

- измерением жесткости и адгезии клеток, в том числе изменений этих характеристик под действием физических, химических или биологических факторов.

Прежде чем перейти к обсуждению современных тенденций в бионаноскопии клеток, отметим некоторые особенности кантилеверов, используемых при работе с клетками млекопитающих. Радиус кривизны кантилевера оказывает решающее влияние на разрешение АСМ. Для работы с биомакромолекулами используются зонды, имеющие радиус кривизны ~ 1 нм [25]. Такие зонды сравнительно дороги и эффективны только на поверхности с малой шероховатостью (перепады высоты менее 20 нм). Для работы с клетками они не применяются. Более того, широко распространенные кремниевые зонды, имеющие угол при вершине $\sim 22^\circ$, часто разрезают клетки. Поэтому для исследования живых клеток во многих случаях применяются зонды из нитрида кремния, имеющие угол при вершине, равный $\sim 45^\circ$ [8,12].

СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДИКИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

Определение клеточной адгезии с помощью АСМ. Выше было сказано, что простейший способ оценки адгезии связан с описанием морфологии клеток (распластывания их по подложке). Однако этот метод носит качественный характер и поэтому применим только для сравнения адгезии клеток на разных подложках. Для количественной оценки адгезии предложены специальные методы, основанные на использовании АСМ или ее модификаций. Например, использование специального держате-

ля, в котором кантилевер располагается под большим углом к образцу, позволяет легко сдвинуть клетку с места. Наклоненный кантилевер используется как микроскопический шпатель: перед экспериментом он располагается рядом с клеткой, затем начинает двигаться в ее сторону и отрывает ее от подложки, после отрыва клетки регистрируемая сила, действующая на кантилевер, становится равной нулю. Достоинство этого метода в том, что он позволяет определить одновременно максимальную силу, необходимую для отрыва клетки, и работу (т.е. энергию сцепления клетки с подложкой). Недостаток этого метода в том, что кантилевер наклонен и не позволяет получить обычное АСМ-изображение.

С помощью описанного метода было показано, что раковые клетки адсорбируются быстрее и прочнее при 37°C , чем при 23°C , кроме того, на гидрофильной подложке они адсорбируются лучше, чем на гидрофобной. Типичная сила, необходимая для того, чтобы оторвать клетку, составляла 100–200 нН [26].

Для измерения адгезии могут использоваться кантилеверы без игл. На кончик такого кантилевера прикрепляется клетка, затем снимаются силовые кривые на подложке или слое клеток. Прикрепление клетки к кантилеверу осуществляется следующим образом: кантилевер подводится к клетке и удерживается над ней в течение приблизительно 30 с. При этом клетка связывается с поверхностью кантилевера и остается на нем при отводе. Другой способ измерения адгезии предполагает прикрепление к кантилеверу микроскопической частицы, покрытой монослоем клеток.

Кантилевер с прикрепленной к нему клеткой (одной или несколькими) можно использовать для измерения взаимодействия клетки с подложкой и для измерения межклеточной адгезии. Кроме того, применяя модель Герца для системы «плоскость–сфера», можно вычислить модуль Юнга клетки. Такой эксперимент был проведен на эритроцитах [27]. Их поверхность обладает относительно низкой адгезией, для того чтобы не препятствовать току крови. Чтобы эритроциты прикреплялись к кантилеверу, рабочую поверхность кантилевера покрывали лектином (белком, обладающим способностью связывать сахара). Адгезия между двумя эритроцитами мала, и зарегистрировать ее в описываемом эксперименте не удавалось. Однако при добавлении лектина (100 мкг/мл) в среду, где находились клетки, адгезия возрастала и становилась заметной. По оценкам, сила разрыва связи между молекулой лектина WGA и гликокаликсом составляет 70 ± 5 пН.

Обсудим технические особенности описанного эксперимента. После того, как клетки приведены в контакт друг с другом, они формируют некоторую контактную площадку. Она, очевидно, зависит от силы, с которой они сжаты. Эта сила неконтролируемо меняется с течением времени под действием двух факторов. Во-первых, клетки стремятся увеличить площадь контакта. Во-вторых, на силу сжатия влияет дрейф кантилевера относительно подложки, причем он может приводить либо к ее увеличению, либо к уменьшению. Поэтому время контролируемого контакта между клетками составляет ~1–10 мин.

Отметим, что для проведения силовой спектроскопии с клетками, закрепленными на кантилевере, необходим большой ход сканера вдоль оси *Z* (авторы работы [27] использовали систему, позволяющую перемещения на 100 мкм). Типичный диапазон перемещений у наиболее распространенных атомно-силовых микроскопов, равный 1–10 мкм, недостаточен для таких измерений.

Для изучения клеточной адгезии большое значение имеет возможность модификации кантилеверов. Известно, что производство кантилеверов – сложный многоступенчатый процесс [28]. Обычно большая часть усилий направлена на то, чтобы сформировать острие кантилевера с нанометровым радиусом закругления. Однако для работы с клетками малый радиус закругления не является оптимальным, наоборот, часто используют кантилеверы с прикрепленными на конце коллоидными частицами [29,30]. На примере мышинных фибробластов было показано, что кантилеверы с микрочастицами на конце позволяют получать лучшее разрешение, чем обычные кремниевые кантилеверы [29]. Это объяснялось тем, что при использовании кантилевера с микрочастицей вязкоупругие свойства клетки оказывают меньшее влияние на изображение. Кроме того, выяснилось, что использование частиц диаметром 3,3 мкм позволяет получать более качественные изображения, чем использование частиц диаметрами 6,84 и 8,2 мкм.

Прикрепление микрочастиц к кантилеверу обычно осуществляется под оптическим микроскопом высокого разрешения с использованием микроманипуляторов. В работе [27] диаметр прикрепляемой к кантилеверу сефакриловой микросферы составлял более 20 мкм. Зонд с такой частицей на конце не может использоваться для получения изображения с высоким разрешением, однако для проведения силовой спектроскопии он хорошо подходит, поскольку

точно задает геометрию контакта с исследуемым объектом.

Микрохирургия. О важности взаимодействия кантилевера с клеткой уже упоминалось выше: острый кантилевер может легко проникнуть в клетку, причем это воздействие может быть для клетки как смертельным [8], так и безвредным [13,14,31,32]. Возможность оказывать локальное воздействие на живые клетки и высокая пространственная точность делает АСМ привлекательным инструментом для проведения микрохирургических операций.

Например, с помощью АСМ было исследовано распределение различных матричных РНК по объему живой клетки [32]. Для этого иглу кантилевера вводили в разные участки клетки, прикладывая силу, равную 150–200 нН. На поверхность иглы сорбировались компоненты цитозоля, включая мРНК, и через некоторое время (~60 с) иглу вынимали. Затем проводили количественный ПЦР-анализ собранного материала и определяли количество исследуемой мРНК (в данном случае мРНК β -актина). Полученные таким способом результаты согласовывали с результатами, полученными FISH-методом (Fluorescent *in situ* Hybridization). Однако, в отличие от FISH-метода, для проведения описанных экспериментов с помощью АСМ не требуется фиксация клеток. Потенциально такая технология позволяет изучать пространственное и временное распределение мРНК в единственной клетке.

С помощью кантилевера также можно проводить трансфекцию клетки. В работе [31] немодифицированный кантилевер выдерживали в растворе плазмид, кодирующих зеленый флуоресцирующий белок (EGFP). Затем кантилевер на одну минуту вводили в клетку. За это время происходила десорбция плазмид, с которых транскрибировалась мРНК, затем синтезировался белок. По флуоресценции EGFP определяли эффективность трансфекции, которая составила около 30%.

Для получения большей эффективности и одновременно повышения воспроизводимости могут использоваться кантилеверы с наноиглами, которые формируются путем вытравливания обычных кремниевых игл фокусированным ионным пучком. Типичные наноиглы, сформированные таким способом, имеют длину 6–8 мкм и диаметр 200–300 нм [13] (рис. 2).

Результаты, полученные методом силовой спектроскопии, с использованием кантилевера с микроиглой на конце по сравнению с обычным кремниевым кантилевером, представлены на рис. 3. Чтобы проникнуть в клетку типичным

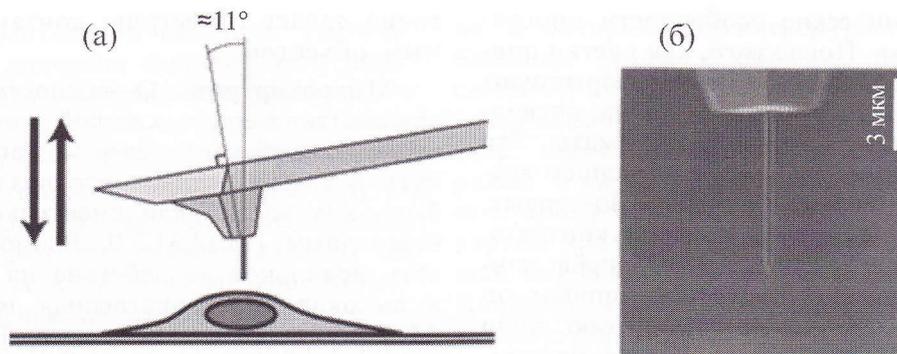


Рис. 2. Схема эксперимента по микрохирургии с использованием АСМ (а); электронная микрофотография кантилевера с наноиглой на конце (б). Рисунок из работы [13] публикуется с разрешения журнала «Nano Letters» (Copyright 2005 American Chemical Society).

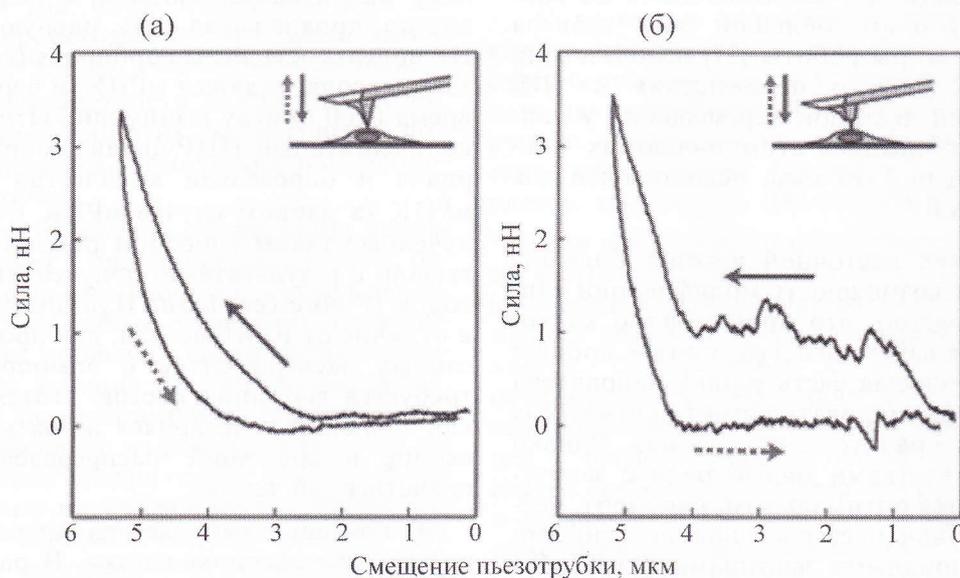


Рис. 3. Зависимости силы от смещения кантилевера в экспериментах по силовой спектроскопии. Верхняя кривая – подвод, нижняя – отвод кантилевера; (а) – типичный результат, получаемый при использовании обычных кантилеверов; (б) – результат, получаемый при использовании кантилевера с наноиглой на конце. Рисунок из работы [13] публикуется с разрешения журнала «Nano Letters» (Copyright 2005 American Chemical Society).

кремниевым кантилевером, требуется приложить силу ~ 10 нН, такое воздействие часто вызывает необратимые повреждения клеточных структур. Для проникновения наноиглы в клетку достаточно усилия ~ 1 нН, о чем свидетельствует характерный скачок силы на кривой подвода, при этом клетка остается жизнеспособной.

Для доказательства того, что наноигла проникает в клетку, применяется метод конфокальной микроскопии. Для контроля за положением микроиглы к ней была прикреплена флуоресцентная метка (рис. 4) и было подтверждено проникновение микроиглы не только в клетку, но и в ядро. Кроме того, этот метод позволяет

визуализировать деформации клетки и ядра в тех случаях, когда проникновения зонда не происходит.

Использование метода АСМ в микрохирургии имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методиками, использующими микроиглы и микрокапилляры. Прежде всего, точность позиционирования АСМ (~ 10 нм) существенно выше, чем у традиционных микроманипуляторов (~ 1 мкм). Возможность контроля силы взаимодействия между иглой и клеткой, малый размер используемых инструментов, а также более высокая пространственная точность обеспечивают менее разрушительное воз-

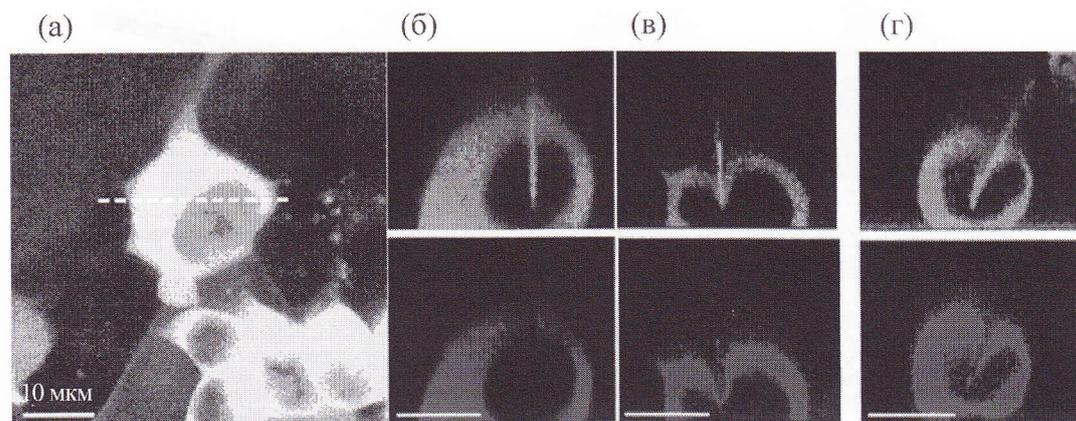


Рис. 4. (а) – Изображение клеток и флуоресцентно меченого кантилевера; (б) – изображения микроиглы, проникшей в ядро клетки; (в) – микроигла не проникает в клетку при недостаточной силе или большом радиусе закругления; (г) – изображения, полученные при индентации клеток обычным кремниевым кантилевером. Микрофотографии из работы [13] публикуются с разрешения журнала «Nano Letters» (Copyright 2005 American Chemical Society).

действие на клетки, чем традиционные методики.

Микрохирургические процедуры с помощью АСМ могут быть применены для доставки ДНК в клетку. Такой эксперимент включал в себя несколько этапов [33]: первый этап состоял в прикреплении молекул ДНК к наноигле. При амплификации ДНК использовали биотинилированные праймеры, т.е. биотин находился на обоих концах фрагмента. Поверхность наноиглы модифицировали авидином, и за счет аффинного взаимодействия одного из концевых биотинов с авидином происходило связывание ДНК. Для доказательства факта прикрепления ДНК к зонду использовали силовую спектроскопию на подложке, модифицированной авидином. Наблюдали аффинное связывание биотина свободного конца фрагмента ДНК с авидином на поверхности, и это указывало на наличие ДНК на кантилевере. На втором этапе наноиглу вводили в клетку. При этом получали силовые кривые, аналогичные представленным на рис. 3. На третьем этапе проверяли, остается ли ДНК на кантилевере после погружения наноиглы в клетку. Для этого кантилевер обрабатывали красителем TO-PRO-3, способным связываться с ДНК.

Наноиглу с ДНК погружали в клетку 10 раз и после этого клетки сохраняли способность к делению, т.е. воздействие наноиглы не привело к необратимому повреждению клетки. Количество ДНК на кантилевере и наноигле, которое оценивали по изображениям с конфокального микроскопа, было приблизительно одинаковым до и после многократного погружения наноиглы в клетку. Хотя по этим изображениям нельзя точно установить, осталась

ли вся ДНК на наноигле, можно утверждать, что ДНК не отделяется от иглы из-за трения при вхождении в клетку.

В дальнейшем эта методика была использована для доставки гена, кодирующего GFP [34,35]. На модифицированную полилизинном наноиглу сорбировали плазмидную ДНК, наноиглу на несколько минут вводили в ядро клетки, при этом происходила частичная десорбция плазмид и диффузия их по ядру (рис. 5). Через 24 ч по интенсивности флуоресценции GFP определяли степень экспрессии гена и эффективность трансфекции плазмид – она составляла ~70%, что намного выше, чем в случае липофекции (~50%) или микроинъекции (~10%).

Было выдвинуто предположение, что при надежной адсорбции ДНК можно добиться того, что она не будет отделяться от наноиглы. В этом случае экспрессия гена будет идти до тех пор, пока наноигла находится в клетке. Это может быть полезно в тех случаях, когда необходимо поддерживать строго определенное время экспрессии гена.

Можно ожидать, что с помощью специально модифицированных наноигл в клетку можно будет доставлять белки и другие химические вещества. Это позволит контролировать экспрессию генов в клетке, что может использоваться в диагностике и при терапии. В целом, использование АСМ для выполнения микрохирургических операций является одним из наиболее перспективных направлений при работе с клетками.

Химическая и функциональная модификация кантилевера. В последнее время получили развитие методики, использующие химическую мо-

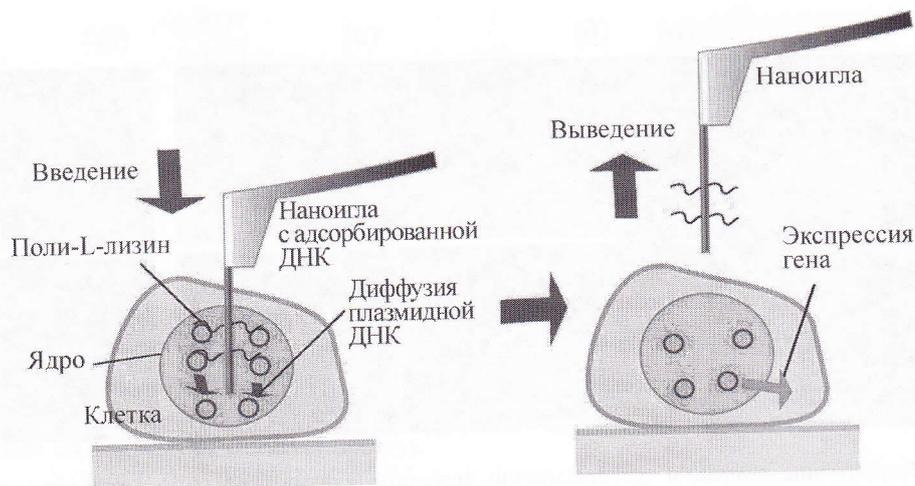


Рис. 5. Схема эксперимента по трансфекции клетки с использованием наноиглы. Рисунок взят из работы [35] с любезного разрешения издательства «Elsevier».

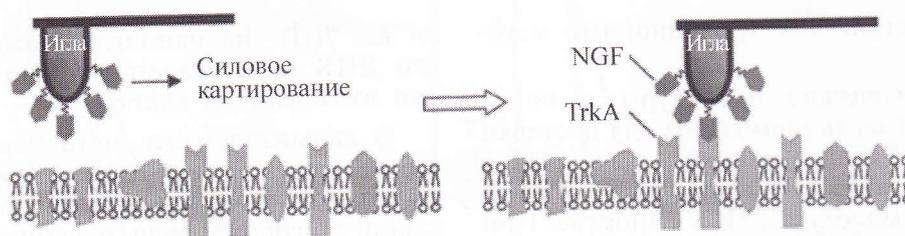


Рис. 6. Схема идентификации рецепторов TrkA на клетке PC12 с помощью модифицированного NGF кантилевера. Рисунок из работы [37] приведен с любезного разрешения издательства «Elsevier».

дификацию поверхности кантилеверов. Это, в частности, химическая силовая микроскопия и одномолекулярная силовая спектроскопия. Первый метод применяют для изучения пространственного распределения по поверхности образца химических групп и их взаимодействие [36]. В этом случае иглу кантилевера модифицируют определенной функциональной группой. Вторым методом используется для характеристики молекулярных взаимодействий: одна или несколько молекул растягиваются между кантилевером и образцом [36–38,40].

Приведем пример эксперимента по исследованию распределения тирозинкиназы A (TrkA) на поверхности нервных клеток (PC12) [37]. TrkA является мембранным рецептором фактора роста нервов (NGF). При связывании с лигандом формируется димерный комплекс, ведущий к функциональному ответу клетки. В эксперименте иглу кантилевера модифицировали NGF. Затем на модельной системе, где TrkA была химически связана с поверхностью, измеряли силу взаимодействия между молекулами, она составила 0,06 нН (схема эксперимента приведена на рис. 6). В контрольном опыте,

где TrkA на поверхности или NGF на игле были адсорбированы физически, такое взаимодействие быстро исчезало. Далее было изучено взаимодействие NGF с рецепторами на клетках PC12, построены адгезионные карты. Пример адгезионной карты, а также топография соответствующего участка и типичные силовые кривые представлены на рис. 7. При этом силы взаимодействия регистрировались как нулевые, так и значительно большие, чем 0,06 нН, что объяснялось множественным связыванием. В контрольном опыте в присутствии NGF в среде связывание отмечалось намного реже. По этим данным был сделан вывод, что TrkA распределена гетерогенно, концентрируясь в определенных областях. Такая агрегация может быть связана с сигнальной функцией рецептора.

Лиганд-рецепторные взаимодействия используют и для выделения группы клеток, несущих данный рецептор. В работе [38] кантилевер модифицировали лектином HPL, который специфически связывается с N-ацетилглюкозаминном гликолипидом, представленным на поверхности эритроцитов группы A, для выделения этих клеток из смешанного слоя с эритро-

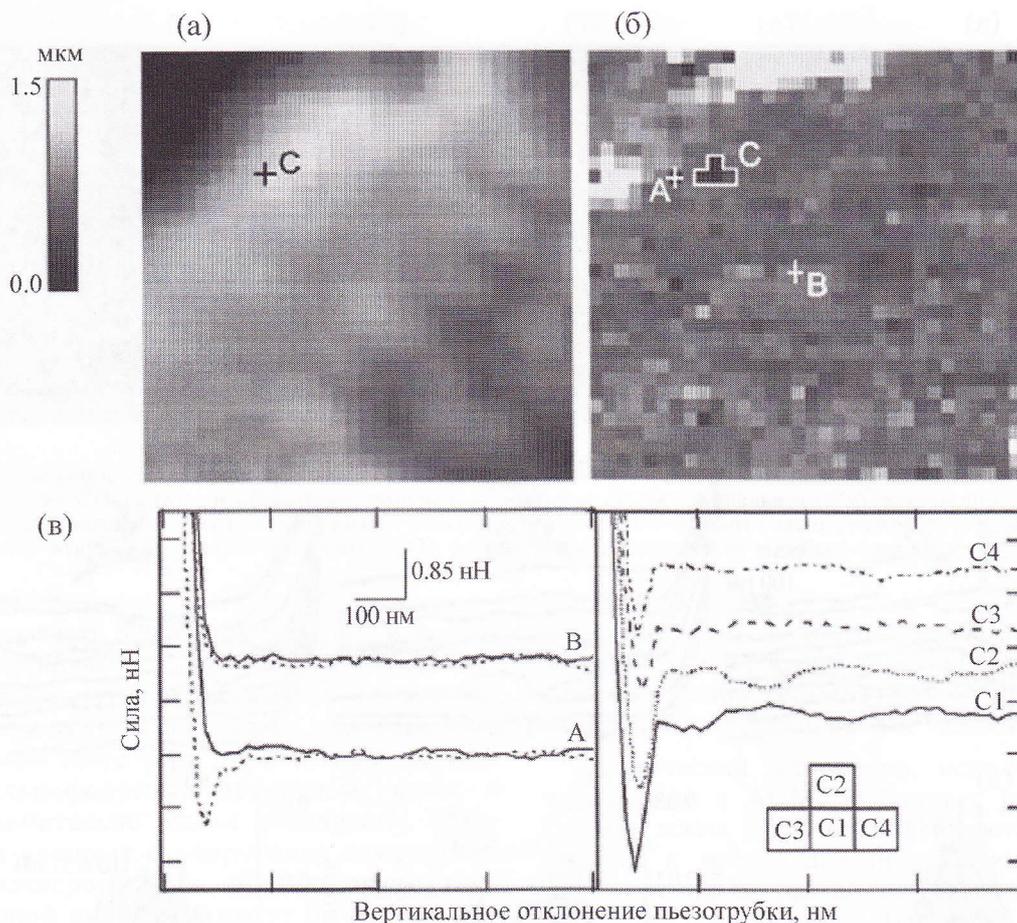


Рис. 7. Топография клетки PC12, полученная модифицированным NGF кантилевером (размер кадра 8×8 мкм) (а); соответствующая адгезионная карта (б); на (в) – слева силовые кривые с точек А и В (сплошные – подвод, пунктирные – отвод), справа кривые отвода в области С. Рисунок из работы [37] приведен с любезного разрешения издательства «Elsevier».

цитами группы В, не имеющих таких гликолипидов. На адгезионных картах заметен сильный контраст между этими группами клеток, что и позволяет разделять их.

Часто используется функционализация кантилевера антителами к мембранным белкам [39]. Например, таким образом было подсчитано количество EP3-рецепторов на поверхности клетки СНО. Предварительно во внеклеточную область рецептора EP3 методами генной инженерии был введен GFP. Для силовой спектроскопии в качестве зонда использовали 10-микронные шарики, покрытые антителами к GFP, что обеспечивало увеличение контактной области между иглой кантилевера и поверхностью. По адгезионным картам смотрели распределение EP3 на клетке, которое согласовалось с иммуногистохимическими данными. Для дальнейших расчетов использовалась «работа разделения», вычисляемая как площадь под силовой кривой. Измерения работы разделения

дали дискретный ряд значений, дискрет принимался за энергию разрыва одной молекулярной пары. Это значение использовали для оценки общего количества рецепторов на клетке.

Подобным способом можно исследовать динамику и поведение поверхностных структур во времени. В эксперименте [40] кантилевер модифицировали антителами к рецептору васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF). Это важный ангиогенный фактор в тканях животных, стимулирующий рост эндотелиальных клеток. К клеткам добавляли VEGF и последовательно через определенные интервалы времени строили силовые и адгезионные карты (рис. 8). Было выявлено, что в течение 10–45 мин после добавления VEGF или антител, которые оказывают аналогичное влияние, происходит кластеризация рецепторов в нескольких областях. Одновременно наблюдается уменьшение жесткости клетки, пропорциональное локальной плотности рецепторов. Возможно, эти

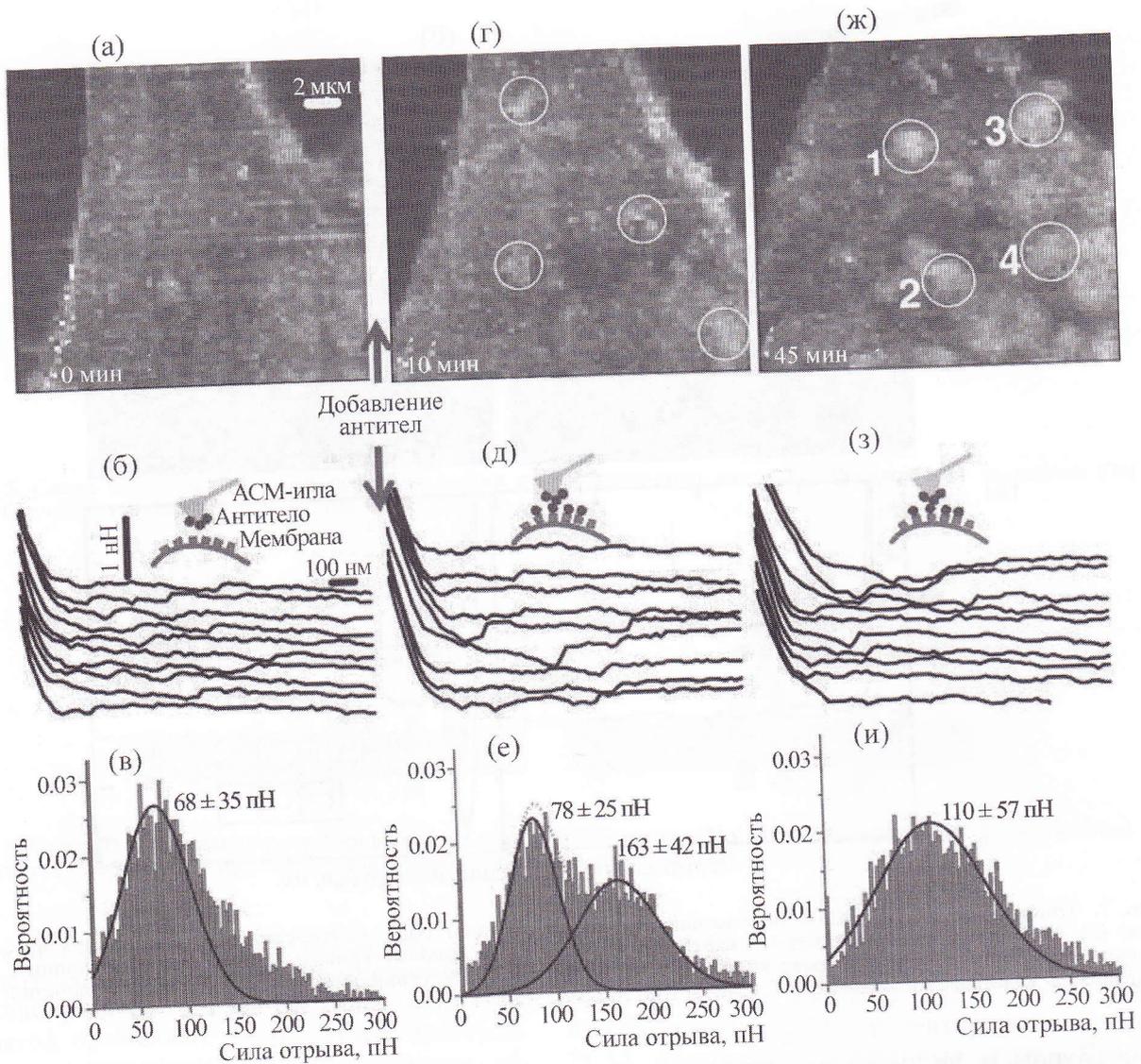


Рис. 8. Силовое картирование эндотелиальных клеток в реальном времени; (а) – (в) – специфическое взаимодействие модифицированного антителами кантилевера с рецепторами клетки; (а), (г), (ж) – адгезионные карты; (б), (д), (з) – силовые кривые, полученные в разных точках соответствующих карт; (в), (е), (и) – гистограммы распределения силы отрыва по данным силовых карт. Гистограммы аппроксимированы гауссовым распределением. Сила отрыва 60 – 70 пН соответствует разрыву единичной связи антитело – рецептор; (г) – (е) – через 10 мин после добавления в среду антител, (ж) – (и) – через 45 мин. Рисунок из работы [40] предоставлен с любезного разрешения издательства «Elsevier».

изменения связаны с подготовкой клетки к росту и ангиогенезу.

Дальнейшее развитие данной области направлено на оптимизацию способов модификации кантилеверов, чтобы избавиться от вклада неспецифических взаимодействий и избежать связывания лигандов, при котором они оказываются нефункциональными. Для этого при связывании лигандов с иглой кантилевера используются различные линкеры [36]. В будущем картирование различных участков связывания на поверхности клетки и их поведения может быть

использовано для решения многих медицинских и физиологических задач.

Совмещение АСМ с оптической микроскопией и ЛСКМ. Типичный размер клеток бактерий составляет ~1 мкм, размер клеток млекопитающих ~10 мкм. На этих масштабах хорошо применимы методы оптической микроскопии, поэтому для работы с клетками часто используются системы, совмещающие атомно-силовой микроскоп с оптическим микроскопом.

Все атомно-силовые микроскопы можно формально разделить на два класса: те, которые сканируют образцом (в англоязычной литера-

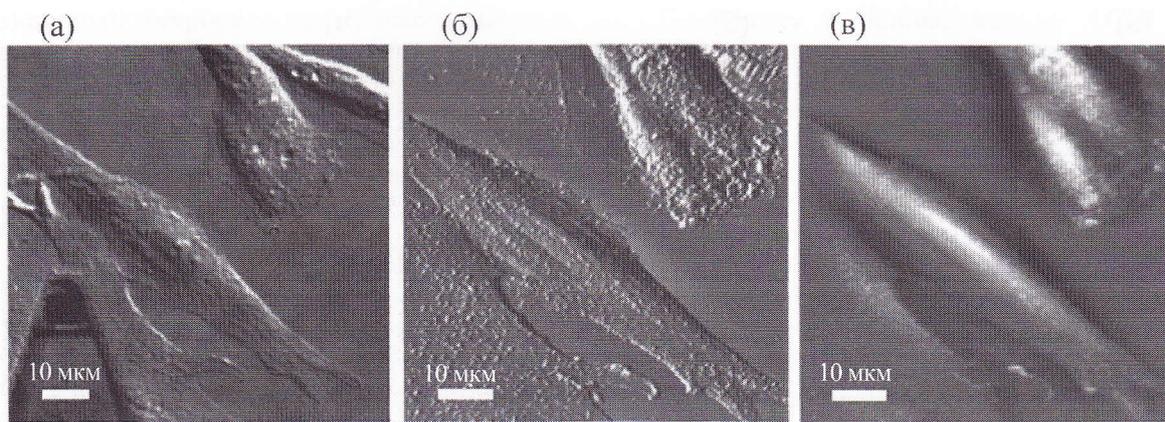


Рис. 9. Совмещение оптической и атомно-силовой микроскопии при исследовании клеток яичников китайских хомяков (линия CHO); (а) – изображение, полученное методом дифференциально-интерференционного контраста; (б) – АСМ-изображение, полученное в режиме измерения контактного сигнала рассогласования; (в) – микрорельеф поверхности. Микрофотография из работы [42], публикуется с разрешения издательства «Elsevier».

туре их называют Scanning Platform), и те, которые сканируют кантилевером (Scanning Head). Первые из них могут быть совмещены только с оптическими системами, работающими в отраженном свете. При этом обычно используются дальнефокусные объективы, которые имеют сравнительно малое увеличение. Микроскопы, в которых сканирование осуществляется кантилевером, если образец расположен на прозрачной подложке, могут быть совмещены с оптическими системами, в которых образец наблюдается в проходящем свете. Это дает возможность использовать короткофокусные и иммерсионные объективы и получать большее увеличение. Требование прозрачности образца при работе с клетками обычно выполняется, поскольку многие образцы клеток готовят на стеклянных или полистирольных чашках Петри. Поэтому для атомно-силовой микроскопии клеток часто используются микроскопы, сканирующие кантилевером, в комбинации с инвертированными оптическими микроскопами, в том числе флуоресцентными и конфокальными. Это, естественно, не отменяет возможности использования микроскопов конструкции Scanning Platform для работы с клетками, однако отражает тенденцию развития АСМ. Отметим, что некоторые современные микроскопы позволяют проводить сканирование и кантилевером и образцом одновременно [41].

При работе с клетками обычно используются атомно-силовые микроскопы с большим (не менее 10×10 мкм) полем сканирования. Для измерения клеточной адгезии, как уже отмечалось выше, иногда используются специальные системы с большим (100 мкм) диапазоном перемещений сканера по оси Z [27]. Для ска-

нирования живых клеток используют ячейки с жидкой средой, которые могут быть либо открытыми, либо герметичными. Часто исследование производится на дне чашки Петри.

Оптический микроскоп, используемый одновременно с АСМ, выполняет ряд функций. Прежде всего, с его помощью кантилевер подводится к клетке для проведения измерений, это особенно актуально, если клетки редко расположены на подложке. На рис. 9 представлен пример оптического изображения и АСМ-изображения, полученных с одной и той же области образца [42]. Оптический микроскоп помогает позиционировать кантилевер над клеткой, что существенно упрощает проведение эксперимента.

Еще более точного позиционирования кантилевера можно добиться с помощью флуоресцентного микроскопа. В уже упоминавшейся работе [42] приведен пример эксперимента по обнаружению рецепторов на поверхности клетки млекопитающего с использованием модифицированного зонда. Исследование было выполнено на клетках яичников китайских хомяков (линия CHO), цель исследования состояла в том, чтобы локализовать рецепторы SRBI в составе клеточной мембраны и измерить силу связывания антитела, прикрепленного к кантилеверу, с рецептором. Клетки были зафиксированы глутаровым альдегидом для предотвращения диффузии SRBI по мембране. Белок SRBI был связан с зеленым флуоресцирующим белком, благодаря этому с помощью флуоресцентной микроскопии легко были найдены участки мембраны с высокой концентрацией SRBI. Антитела к SRBI были химически прикреплены к поверхности кантилевера из нитрида кремния. Важно отметить, что нитрид кремния, в отличие

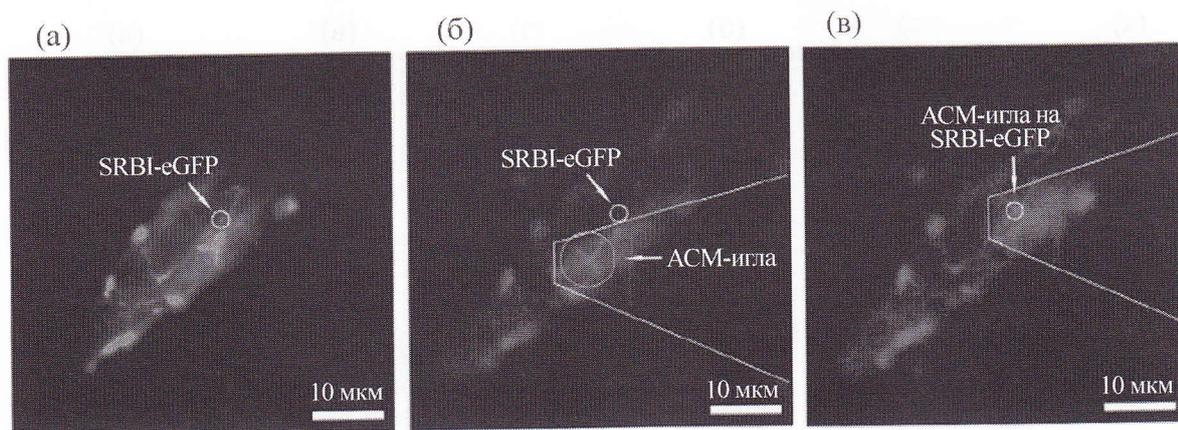


Рис. 10. Позиционирование кантилевера, модифицированного антителами, над клеткой для проведения силовой спектроскопии и измерения взаимодействия антител с белком SRBI; (а) – флуоресценция комплексов SRBI с зеленым флуоресцирующим белком; (б) – автофлуоресценция позволяет увидеть кантилевер; (в) – кантилевер наведен на область, отмеченную кружком на кадре (а). Рисунок из работы [42], печатается с разрешения издательства «Elsevier».

от чистого кремния, способен флуоресцировать. Наблюдение флуоресценции помогает наводить кантилевер на участки мембраны, в которых сосредоточено большое количество рецепторов (см. рис. 10).

После наведения на нужный участок записывали серии силовых кривых и измеряли вероятность аффинного связывания антител с белком. Выяснилось, что на флуоресцирующих участках она составляет 13,6%. При силовой спектроскопии на случайных участках мембраны, на которых флуоресценция не показывала скопления SRBI, вероятность составляла 2–3%. Принципиальный результат, продемонстрированный в работе [42], состоит в том, что флуоресцентный микроскоп был использован для наведения кантилевера на определенный участок мембраны для выполнения силовой спектроскопии.

Нитридные кантилеверы обладают автофлуоресценцией, остальные можно модифицировать флуоресцирующими веществами. Кроме этого, как уже было сказано ранее, с помощью флуоресцентной метки можно следить за проникновением иглы в клетку.

Совмещение АСМ с конфокальным микроскопом важно при интерпретации данных силовой спектроскопии, поскольку конфокальный микроскоп позволяет эффективно визуализировать определенные типы клеточных структур [7], а помощью АСМ можно определить их локальную жесткость. Совмещение с конфокальным микроскопом важно еще и потому, что оба эти вида микроскопии позволяют измерять размеры объекта вдоль всех трех осей. Использование флуоресцентно меченых антител

позволяет идентифицировать объекты, и это помогает интерпретировать АСМ-изображения, на которых внутренняя структура клетки не видна и идентификация субклеточных структур затруднена или вовсе невозможна. Сопоставление данных, полученных разными методами, позволяет более корректно учесть особенности каждого из них и сделать более точные выводы об истинном размере объектов.

Хотя совмещенные системы в принципе используются довольно давно, возможность корректного наложения изображений, полученных разными приборами, появилась недавно [43]. Кадры, полученные на АСМ и на конфокальном микроскопе, являются дискретными и представляют собой матрицы чисел $I(x,y)_{AFM}$ и $I(x,y)_{CLSM}$ (в общем случае $I(x,y,z)_{CLSM}$). Представляет интерес не просто измерить размер объекта по изображению с каждого микроскопа, но *полностью* совместить эти изображения. Сложность их совмещения вызвана не только тем, что изображения существенно различаются по своему физическому смыслу, но и тем, что необходимо совместить системы координат $(x,y)_{AFM}$ и $(x,y)_{CLSM}$. Для этого было предложено подвергать изображения проективным преобразованиям так, чтобы совмещались либо заданные точки, либо заданные контуры. Совмещение точек эффективно, если на изображениях присутствуют хорошо заметные малые объекты, например частицы, углы и т.п. Совмещение контуров эффективно, если на изображении присутствуют протяженные непрерывные линии.

Существуют системы, объединяющие АСМ с двухфотонным лазерным конфокальным микроскопом [44]. Известно, что двухфотонный

конфокальный микроскоп имеет некоторые преимущества перед обычным конфокальным микроскопом. Основное преимущество связано с тем, что интенсивность флуоресценции в двухфотонном микроскопе пропорциональна четвертой степени интенсивности лазера (а не первой, как в обычном конфокальном), поэтому область, в которой происходит возбуждение флуорофора, оказывается меньше – в некоторых случаях это позволяет добиться лучшего разрешения. Применительно к биологическим объектам важное достоинство двухфотонного микроскопа состоит в использовании инфракрасного лазера, излучение которого слабо рассеивается в тканях. На частицах диаметром порядка 1 мкм оптическая двухфотонная система позволяет получить лучшее разрешение, чем АСМ. Это связано не только с конечным радиусом кривизны и углом при вершине кантилевера, но и с подвижностью крупных частиц при сканировании на атомно-силовом микроскопе. В то же время на наноразмерных объектах АСМ демонстрирует существенно лучшее разрешение, чем оптический микроскоп. Эта технология может найти применение в тех же экспериментах, где используется обычная конфокальная микроскопия, но с большей эффективностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение еще раз необходимо подчеркнуть, что в настоящее время АСМ позволяет изучать и анализировать живые клетки многофакторно, т.е. изучать морфологические, адсорбционные, упругие характеристики клеток, исследовать динамику процессов, в которых участвует клетка, в реальном времени, а также осуществлять микро- и нанохирургические вмешательства в клетку с помощью иглы атомно-силового микроскопа. Применение АСМ позволило значительно расширить круг решаемых задач в биологии и биофизике клетки и смежных дисциплинах, причем формулировка новых задач постоянно продолжается. Наблюдается постепенный переход от визуализации клеток к изучению их локальных свойств, а также к микро- и наноманипулированию, в связи с чем появляются новые и модифицируются существующие методики и приемы АСМ. Заметна тенденция совмещения АСМ с другими методами, например, такими как оптическая или лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, что позволяет эффективно дополнять одни результаты другими для одного и того же объекта.

Поскольку в основе метода АСМ лежит взаимодействие зонда с образцом, то вопросу выбора зонда и режиму сканирования уделяется большое внимание. В зависимости от формы и радиуса закругления иглы, она может «касаться» клетки, не внося изменений в ее морфологию (в этом режиме, как правило, изучается морфология, адгезионные, упругие и некоторые другие поверхностные свойства клетки), либо проникать внутрь клетки, внося обратимые или необратимые изменения в структуру клеточной стенки.

Сканирование клеток химически модифицированными зондами открывает большие перспективы для различного рода картирования клеточных поверхностей, например, на наличие определенных рецепторов или молекулярных структур.

Одной из наиболее интересной в плане практического применения тенденцией является микро-/нанохирurgia с помощью АСМ, позволяющая делать надрезы в одной единственной клетке, исследовать ее внутреннюю структуру, вводить в живую клетку определенный ген или отбирать небольшое количество какого-либо элемента из внутриклеточного матрикса для дальнейшего анализа. При этом высокое пространственное разрешение позволяет анализировать распределение того или иного компонента по его расположению в живой клетке.

Проведенный анализ работ демонстрирует большой потенциал применения метода АСМ для исследования животных клеток, который может быть использован для решения большого круга задач, в том числе связанных с практическим применением в биотехнологии и медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы и программы Президента Российской Федерации МК-2010 (проект МК-5121.2010.2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Gualtieri, *Micron and Microscopica Acta* **23** (3), 239 (1992).
2. B. Huang, *Curr. Opinion in Chem. Biol.* **14**, 1 (2009).
3. E. Mart'nez, E. Engel, C. Lopez-Iglesias, et al., *Micron*, **39**, 111 (2008).
4. T. Starborg, Y. Lu, R. S. Meadows, et al., *Methods* **45**, 53 (2008).
5. F. Braet and E. Wisse, in *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications* (Humana Press, 2004), pp. 216–242.

6. G. Bischoff, A. Bernstein, D. Wohlrab, and H. J. Hein, in *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications* (Humana Press, 2004), pp. 105–124.
7. H. Haga, S. Sasaki, K. Kawabata, et al., *Ultramicroscopy* **82**, 253 (2000).
8. H. A. McNally and R. B. Borgens, *J. Neurocytology* **33**, 251 (2004).
9. Q. S. Li, G. Y. H. Lee, C. N. Ong, and C. T. Lim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 609 (2008).
10. S. W. Schneider, R. Matzke, M. Radmacher, and H. Oberleithner, in *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications* (Humana Press, 2004), pp. 255–279.
11. S. Grimaldi, M. Girasole, and A. Cricenti, in *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications* (Humana Press, 2004), pp. 323–339.
12. A. Simon and M-C. Durrieu, *Micron*. **37**, 1 (2006).
13. I. Obataya, C. Nakamura, S. W. Han, et al., *Nano Lett.* **5**, 27 (2005).
14. S. W. Han, C. Nakamura, I. Obataya, et al., *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 2120 (2005).
15. H. X. You, J. M. Lau, S. Zhang, and L. Yu, *Ultramicroscopy* **82**, 297 (2000).
16. T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, et al., *Micron*. **38**, 824 (2007).
17. A. Simon, T. Cohen-Bouhacina, M. C. Porte, *Cytometry Part A* **54A**, 36 (2003).
18. R. E. Mahaffy, S. Park, E. Gerde, et al., *Biophysical J.* **86**, 1777 (2004).
19. X. Cai, X. Xing, J. Cai, et al., *Micron* **41**, 257 (2010).
20. M. Fritz, M. Radmacher, and H. E. Gaub, *Exp. Cell Res.* **205**, 187 (1987).
21. N. Haga, M. Nagayama, K. Kawabata, et al., *J. Electron Microscopy* **49**, 473 (2000).
22. A. M. Collinworth, S. Zhang, W. E. Kraus, and G. A. Truskey, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, 1219 (2002).
23. C. Rotsch and M. Radmacher, *Biophysical J.* **78**, 520 (2000).
24. E. K. Dimitriadis, F. Horkay, J. Maresca, et al., *Biophysical J.* **82**, 2798 (2002).
25. I. A. Mastrangelo, M. Ahmed, T. Sato, et al., *J. Mol. Biol.* **358**, 106 (2006).
26. G. Sagvolden, I. Giaever, E. O. Pettersen, and J. Feder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 471 (1999).
27. M. Benoit and H. E. Gaub, *Cells Tissues Organs* **172**, 174 (2002).
28. Д. В. Колесов и И. В. Яминский, *Нано- и микро-системная техника* **11** (86), 5 (2007).
29. C. E. McNamee, N. Pyo, S. Tanaka, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **47**, 85 (2006).
30. C. E. McNamee, N. Pyo, S. Tanaka, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **48**, 176 (2006).
31. C. M. Cuerrier, R. Lebel, and M. Grandbois, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 632 (2007).
32. H. Uehara, T. Osada, and A. Ikai, *Ultramicroscopy* **100**, 197 (2004).
33. S. W. Han, C. Nakamura, I. Obataya, et al., *Biosensors & Bioelectronics* **20** (10), 2120 (2005).
34. S. W. Han, C. Nakamura, I. Obataya, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 633 (2005).
35. S. W. Han, C. Nakamura, N. Kotobuki, et al., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **4**, 215 (2008).
36. D. J. Muller, M. Krieg, D. Alsteens, and Y. F. Dufrene, *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 4 (2009).
37. C. V. Gopal Reddy, K. Malinowska, N. Menhart, and R. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, 15 (2004).
38. M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit, and H. E. Gaub, *J. Histochem. Cytochem.* **48** (5), 719 (2000).
39. H. Kima, H. Arakawa, N. Hatae, et al., *Ultramicroscopy* **106**, 652 (2006).
40. N. Almqvist, R. Bhatia, G. Primbs, et al., *Biophysical J.* **86**, 1753 (2004).
41. Сайт компании ЗАО «Нанотехнология МДТ» – www.ntmdt.ru
42. J. Madl, S. Rhode, H. Stangl, et al., *Ultramicroscopy* **106**, 645 (2006).
43. S. Kondra, J. Laishram, J. Ban, et al., *J. Neurosci. Methods* **177**, 94 (2009).
44. C. C. Gradinaru, P. Martinsson, T. J. Aartsma, and T. Schmidt, *Ultramicroscopy* **99**, 235 (2004).

Atomic Force Microscopy of Living Cells: Advances and Future Outlooks

Yu.M. Efremov*, D.V. Bagrov* **, E.V. Dubrovin**, K.V. Shaitan*, and I.V. Yaminskii**

*Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119991 Russia

**Physical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119991 Russia

The advances of the method of atomic force microscopy for investigating the animal cells and an analysis of its development have been reviewed, with much attention being given to studies of living cells. The features and problems of the method have been considered, and a number of special methods based on the use of atomic force microscopy have been analyzed. The problems of choosing the geometry of probes for studies of animal cells, determination of cell adhesion on substrate, mapping of the cell surface using chemically modified cantilevers, and the distribution of molecular components inside the cell with the use of micro- and nanosurgical approaches have been discussed. The problems of combining the atomic force microscopy with optical and laser scanning confocal microscopy have been considered. Possible applications of the method in biotechnology and medicine are discussed.

Key words: atomic force microscopy, force microscopy, microsurgery, living cells, animal cells, cell adhesion, cantilever modification