

АППАРАТУРА СКАНИРУЮЩЕЙ КАПИЛЛЯРНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ

стр. 5 – 9

Т.О. Советников^{1, 2}, А.И. Ахметова^{1, 2}, Ю.К. Белов², Н.Е. Максимова²,
А.Д. Терентьев^{1, 2}, Д.И. Яминский¹, И.В. Яминский^{1, 2}

¹ Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119991, ГСП-1, Москва. Ленинские горы, 1

²ООО НПП «Центр перспективных технологий», Россия, Москва, 119311, ул. Строителей 4-5-47

Контактные данные: Яминский И.В., e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

Резюме: В статье рассматриваются примеры реализации сканирующих капиллярных микроскопов. Отдельное внимание уделено принципиальным схемам их конструкции и вопросу интеграции в капиллярный микроскоп системы поддержания жизнедеятельности живых биологических образцов. При исследовании живых систем с помощью метода капиллярной микроскопии возможно не только получать информацию о морфологии образца, но и проводить продолжительные измерения, оценивать динамику развития клеточных структур, в том числе при изменении условий внешней среды.

Ключевые слова: сканирующая капиллярная микроскопия, живые системы, биомеханика, приборостроение, импортозамещение

SCANNING CAPILLARY MICROSCOPY EQUIPMENT FOR BIOMEDICINE

page 5 – 9

T.O. Sovetnikov^{1, 2}, A.I. Akhmetova^{1, 2}, Yu.K. Belov², N.E. Maksimova², A.D. Terentyev^{1, 2},
D.I. Yaminsky¹, I.V. Yaminsky^{1, 2}

¹Moscow State University named after M.V. Lomonosov, 1, Leninskie Gory, GSP-1, Moscow. 119991, Russia

²Advanced Technologies Center, 4-5-47, st. Builders, Moscow, 119311, Russia

Summary: The article discusses examples of scanning capillary microscopes implementation. Special attention is paid to the fundamental diagrams of their design and the issue of integration into a capillary microscope of a system for supporting the vital activity of living biological samples. When studying living systems using the capillary microscopy, it is possible not only to obtain information about the sample morphology, but also to carry out long-term measurements and evaluate the dynamics of the cellular structures development, including when environmental conditions change.

Keywords: scanning capillary microscopy, living systems, biomechanics, instrumentation, import substitution.

DOI: 10.34219/2306-3645-2023-13-3-5-9

Сканирующая капиллярная (ион-проводящая) микроскопия (СКМ) сегодня становится все более востребованным методом исследования тканей, живых клеток, бактерий, грибов, вирусов. Дополняя традиционные методы, она открывает новые возможности в изучении живых образцов, позволяя проводить измерения в отсутствие силового воздействия на объект исследования в естественной (электролитической) среде и без нанесения дополнительных меток. При этом разрешение капиллярных микроскопов составляет десятки нанометров, что позволяет визуа-

лизировать многочисленные биологические и биофизические процессы, протекающие в наномасштабе.

На пути к созданию таких высокоточных измерительных приборов конструкторам приходится решать ряд научно-технических задач. Во-первых, необходимо разработать схмотехническое решение для электронных компонентов системы, которое способно параллельно считывать и отправлять на управляющий компьютер и механику микроскопа сразу несколько сигналов. Все это, конечно, должно происходить с наименьшими за-

держками. В настоящий момент тренд на реализацию электронных «мозгов» микроскопов заключается в использовании программируемых логических интегральных схем (ПЛИС или FPGA в иностранных источниках). Подобное решение используется и в высокоскоростной платформе для сканирующих зондовых, в т.ч. капиллярных, микроскопов [1].

Во-вторых, для функционирования любого зондового микроскопа необходима качественная механика. Помимо прецизионных перемещений образца и капилляра (зонда) в процессе измерений механика микроскопа осуществляет следующие функции:

- высокоскоростной подвод капилляра из воздушной среды, где происходит его установка, к жидкой, где располагается образец,
- перемещение образца в горизонтальной плоскости для выбора интересующей области измерений.

Грамотно разработанная электроника и программное обеспечение микроскопа позволяют проводить обработку сигналов на очень высоких скоростях, поэтому устройство механических компонентов микроскопа становится решающим фактором в определении его времяразрешающей способности – числа снимков определенного качества, получаемых в единицу времени. Комбинация возлагаемых на механические системы капиллярного микроскопа задач усложняет их разработку и создание по сравнению с другими зондовыми микроскопами.

Для понимания конструктивных особенностей рассмотрим конкретный пример установки капиллярного микроскопа (рис.1). Принцип работы СКМ подробнее описан в [2].



Рис. 1. Сканирующий капиллярный микроскоп ФемтоСкан Xi установлен на инвертированный оптический микроскоп Nikon Ti-U

В схеме самого микроскопа (рис. 2) задействованы:

- Контроллер для управления микроскопом – его электронные «мозги». Осуществляет связь с пользовательским интерфейсом на управляющем компьютере, принимает и обрабатывает сигнал с усилителя тока и подает сигналы на пьезоманипуляторы и подвижки.
- Система управления пьезоманипуляторами.

Для качественной визуализации биообъектов необходимы пьезоманипуляторы с большим диапазоном перемещений (обычно не менее 20 мкм в плоскости XY и не менее 10 мкм по оси Z). Такую возможность предоставляют планарные пьезоманипуляторы, работающие в паре с усилителем с обратной связью.

- Пьезоманипулятор зонда по оси Z.
- Пьезоманипулятор образца для перемещения в плоскости XY.
- Основа для системы позиционирования зонда по оси Z и в плоскости XY с камерой Фарадея, системой освещения и предусилителем тока.

Система представляет собой конструкцию, в которую устанавливаются Z- и XY-пьезоманипуляторы, а также функциональные элементы, задействованные в рабочей области СКМ. Камера Фарадея экранирует систему и рабочую область микроскопа с предусилителем тока от внешних помех.

- Модуль для высокоскоростного перемещения капилляра по оси Z.

Изначально капилляр помещается над поверхностью среды с исследуемым образцом, при этом расстояние до образца составляет несколько миллиметров. Для преодоления этого расстояния запускается процесс ускоренного подвода, который осуществляется механическим двигателем, перемещающим Z-пьезоманипулятор с держателем капилляра.

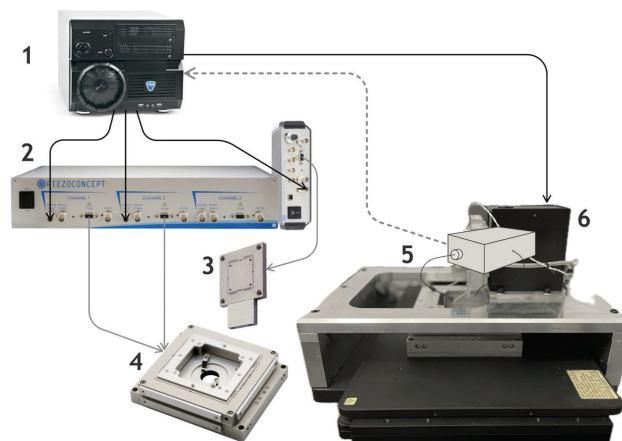


Рис. 2. Блок-схема установки капиллярного микроскопа ФемтоСкан Xi:

1. Контроллер для управления сканирующим капиллярным микроскопом;
2. Система управления пьезоманипуляторами (3 и 4);
3. Пьезоманипулятор по оси Z;
4. Пьезоманипулятор в плоскости XY;
5. Основа для системы позиционирования зонда по оси Z (3) и в плоскости XY (4) с камерой Фарадея, системой освещения и предусилителем тока;
6. Модуль для высокоскоростного перемещения зонда по оси Z.

Черными линиями на схеме отражены пути сигналов между Контроллером и управляемыми им блоками, серым – между блоками и функциональными элементами микроскопа. Сплошной линией отражены сигналы, выходящие из Контроллера, пунктиром – сигнал, приходящий в него от предусилителя тока.

Вариант расположения микроскопа ФемтоСкан Xi на оптическом микроскопе Nikon Ti-U приведен на рис. 1. Такой вариант дает возможность наблюдать исследуемый образец в оптику и удобно позиционировать капилляр при выборе области сканирования. Такая установка позволяет комбинировать капиллярную микроскопию с флуоресцентной, конфокальной, поляризационной и другими видами оптической микроскопии, которые широко используются при изучении биологических объектов.

Помимо совмещенных методов исследования особо актуальной в последние годы стала разработка высокоскоростных капиллярных микроскопов. В их схемах используются модулированные методики подвода вкупе с дополнительными высокореzonансными Z-пьезоподвижками, которые осуществляют процесс подвода-отвода капилляра на высоких скоростях [3, 4, 5] и позволяют проводить как высокоскоростную, так и для длительную покадровую визуализацию живых систем. Во втором случае встает вопрос о поддержании жизнедеятельности клеток в ходе измерений.

Для длительного наблюдения живых клеток млекопитающих в среде необходимо поддерживать постоянную температуру 37°C и концентрация углекислого газа на уровне 5%. Принципиально система поддержания жизнедеятельности (СПЖ) состоит из следующих элементов:

- термозлемент в области установки образца,
- баллон с углекислым газом и система подачи с регулирующими штуцерами (могут управляться как вручную, так и автоматически),
- датчики температуры и концентрации CO₂ (с точностью не менее 0,5°C и 0,5%, соответственно),
- контроллер, считывающий сигналы с датчиков и передающий их в пользовательский интерфейс ПО оператора, а также управляющий термозлементом и (при наличии функционала) системой подачи CO₂,
- герметичный бокс, в котором поддерживаются постоянные условия среды.

Если схемотехническая реализация СПЖ за исключением подбора элементной базы является стандартным решением, то вопрос выбора области, в которой поддерживаются постоянные условия, остается открытым. Казалось бы, можно создать необходимую по условиям среду локально в области чашки Петри с образцом (как это реализовано во многих готовых решениях для систем оптической микроскопии), однако на практике эта область оказывается заведомо трудногерметизируемой вблизи

капилляра. Закономерным решением становится герметизация всей установки СКМ. В то же время, когда система капиллярной микроскопии устанавливается на инвертирующий оптический микроскоп, установка в сборе имеет немалые габариты, и для ее изоляции приходится использовать объемный по размерам бокс. Поддержание постоянной концентрации CO₂ в нем диктует применение готовых коммерческих систем подачи газа, являющихся громоздким и дорогим дополнением.

Удачным и компактным решением СКМ для изучения живых клеток является вариант установки, представленной на рис.3. Для оптических наблюдений здесь может быть использована система оптического видеонаблюдения образца и положения капилляра [6]. Для поддержания температуры образца можно использовать локальный нагреватель оригинальной конструкции, располагаемый непосредственно под чашкой Петри с образцом. Такой нагреватель продемонстрировал высокую точность и стабильность при использовании в атомно-силовом микроскопе ФемтоСкан [7].

Компактные габариты позволяют без труда разместить установку в боксе с СПЖ для проведения продолжительных измерений. Также микроскоп оборудован двухступенчатой системой нанопозиционирования. Первая ступень выполнена с использованием линейных направляющих и шаговых двигателей. Диапазон перемещений по осям X и Y – 12 мм. Минимальный шаг варьируется в пределах от 0,16 мкм до 2,5 мкм. На первой механической ступени располагается вторая ступень с использованием трехкоординатной пьезокерамической платформы с разрешением по осям X и Y в 0,05 нм и диапазоном перемещения в 50 мкм.



Рис. 3. Компактная версия капиллярного микроскопа ФемтоСкан Xi с двухступенчатой системой позиционирования образца

Установки капиллярной микроскопии с системой поддержания жизнедеятельности клеток могут быть использованы для визуализации динамики развития клеточных структур, например, оценки скорости образования и ис-

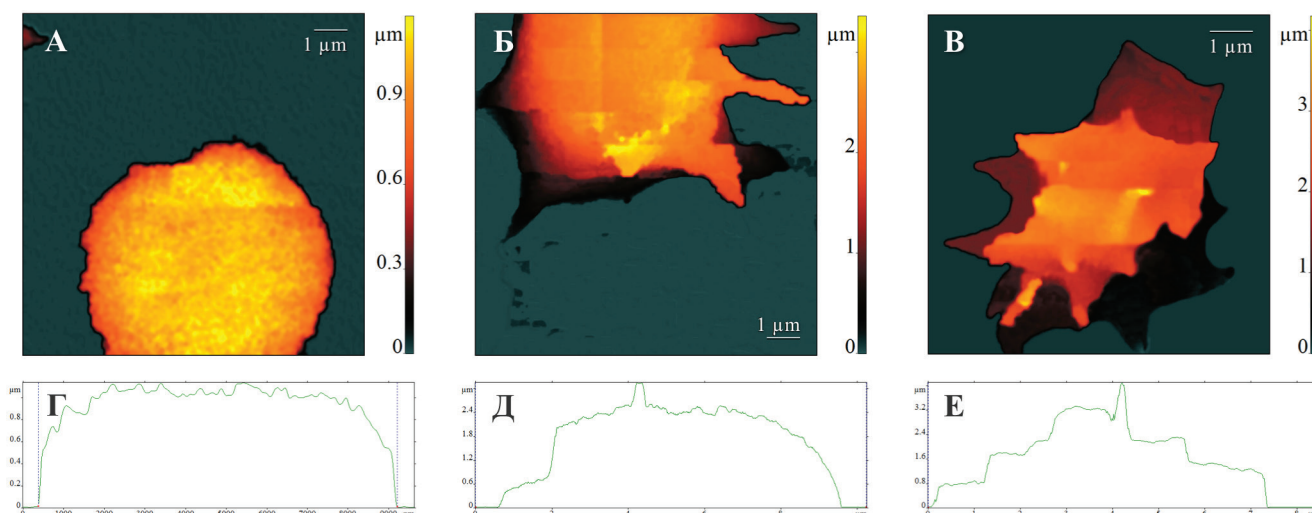


Рис. 4. 3D топография и сечение исследуемых клеток крови: А, Г – эритроцит через 1 час после нанесения; Б, Д – формирующийся эхиноцит через 2 часа после нанесения; В, Е – сформировавшийся эхиноцит через 3,5 часа.

Займствовано из [9].

чезновения филоподий и ламеллоподий в тромбоцитах человека при стимулировании тромбином [8], для отслеживания изменений в клеточной мембране и в областях межклеточного контакта в течение длительного (более суток) времени, что было продемонстрировано при изучении эукариотических и почечных клеток [5]. На разработанной установке капиллярного микроскопа ФемтоСкан Хі исследовались изменения в морфологии эритроцитов в течение их жизненного цикла (рис. 4) [9].

Таким образом, разработка и создание высокоскоростных установок капиллярной микроскопии с СПЖ клетки увеличивает актуальность использования этого метода визуализации в биоприложениях.

Благодарности:

Работа выполнена по госзаданию при финансовой поддержке физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Регистрационная тема 122091200048-7).

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И.В. Яминский, А.И. Ахметова, Н.Е. Максимова. Программное обеспечение для сканирующей зондовой микроскопии бактериальных клеток. Медицина и высокие технологии, 4:5–8, 2022. <http://dx.doi.org/10.34219/2306-3645-2022-12-4-5-8>
2. A.I. Akhmetova, T.O. Sovetnikov, M.A. Tikhomirova et al. Scanning capillary microscopy in the study of the effect of cytotoxic agents on the biomechanical and physicochemical properties of tumor cells. Pharmaceutical Chemistry Journal, 56:1159–1163, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s11094-022-02770-4>
3. S. Watanabe, T. Ando. High-speed XYZ-nanopositioner for scanning ion conductance microscopy. Appl. Phys. Lett. 111:113106, 2017. <https://doi.org/10.1063/1.4993296>

4. S. Watanabe, S. Kitazawa, L. Sun et. al. Development of high-speed ion conductance microscopy. Rev. Sci. Instrum. 90:123704, 2019. <https://doi.org/10.1063/1.5118360>
5. S.M. Leitao, B. Drake, K. Pinjusic et al. Time-Resolved Scanning Ion Conductance Microscopy for Three-Dimensional Tracking of Nanoscale Cell Surface Dynamics. ACS Nano 15 (11): 17613–17622, 2021. <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.1c05202>
6. Д.И. Яминский, И.В. Яминский. Система нанопозиционирования для физического эксперимента. Наноиндустрия, 16(5):266–270, 2023. <http://dx.doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.5.266.270>
7. O.V. Sinitsyna, A.Yu Bobrovsky, G.B. Meshkov et al. Surface relief changes in cholesteric cyclosiloxane oligomer films at different temperatures. Journal of Physical Chemistry B, 119(39):12708–12713, 2015. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b06643>
8. J. Seifert, J. Rheinlaender, F. Lang et al. Thrombin-induced cytoskeleton dynamics in spread human platelets observed with fast scanning ion conductance microscopy. Sci. Rep. 7:4810, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04999-6>
9. T.O. Sovetnikov, A.I. Akhmetova, V.M. Gukasov et al. Scanning probe microscopy in assessing blood cells roughness. Bio-Medical Engineering, 56:444–448, 2023. <http://dx.doi.org/10.1007/s10527-023-10253-3>

Поступила 10.09.2023

УДК: 57.03

REFERENCES

1. I.V. Yaminsky, A.I. Akhmetova, N.E. Maksimova. Software for scanning probe microscopy of bacterial cells. Medicine and High Technologies, 4:5–8, 2022. <http://dx.doi.org/10.34219/2306-3645-2022-12-4-5-8>
2. A.I. Akhmetova, T.O. Sovetnikov, M.A. Tikhomirova et al. Scanning capillary microscopy in the study of the effect of cytotoxic agents on the biomechanical and physicochemical properties of tumor cells. Pharmaceuti-

- cal Chemistry Journal, 56:1159-1163, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s11094-022-02770-4>
3. **S. Watanabe, T. Ando.** High-speed XYZ-nanopositioner for scanning ion conductance microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 111:113106, 2017. <https://doi.org/10.1063/1.4993296>
 4. **S. Watanabe, S. Kitazawa, L. Sun et al.** Development of high-speed ion conductance microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 90:123704, 2019. <https://doi.org/10.1063/1.5118360>
 5. **S.M. Leitao, B. Drake, K. Pinjusic et al.** Time-Resolved Scanning Ion Conductance Microscopy for Three-Dimensional Tracking of Nanoscale Cell Surface Dynamics. *ACS Nano* 15 (11): 17613-17622, 2021. <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.1c05202>
 6. **D.I. Yaminsky, I.V. Yaminsky.** Nanopositioning system for physical experiment. *Nanoindustry*, 16(5):266–270, 2023. <http://dx.doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.5.266.270>
 7. **O.V. Sinitsyna, A. Yu Bobrovsky, G. B. Meshkov et al.** Surface relief changes in cholesteric cyclosiloxane oligomer films at different temperatures. *Journal of Physical Chemistry B*, 119(39):12708–12713, 2015. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b06643>
 8. **J. Seifert, J. Rheinlaender, F. Lang et al.** Thrombin-induced cytoskeleton dynamics in spread human platelets observed with fast scanning ion conductance microscopy. *Sci. Rep.* 7:4810, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04999-6>
 9. **T.O. Sovetnikov, A.I. Akhmetova, V.M. Gukasov et al.** Scanning probe microscopy in assessing blood cells roughness. *Bio-Medical Engineering*, 56:444-448, 2023. <http://dx.doi.org/10.1007/s10527-023-10253-3>
 3. **Белов Юрий Кириллович** – специалист ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: jk.belov@physics.msu.ru
 4. **Максимова Надежда Евгеньевна** – программист, ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: maksimova.ne17@physics.msu.ru
 5. **Терентьев Александр Денисович** – студент, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; программист, ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: terentev.ad18@physics.msu.ru
 6. **Яминский Дмитрий Игоревич** – аспирант, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, e-mail: y@sinno.ru
 7. **Яминский Игорь Владимирович** – профессор, доктор физико-математических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Генеральный директор, ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

Received 10.09.2023
UDC: 57.03

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

1. **Советников Тимофей Олегович** – студент, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; специалист, ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: sovetnikov.to18@physics.msu.ru
2. **Ахметова Ассель Иосифовна** – младший научный сотрудник, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; ведущий специалист; ООО НПП «Центр перспективных технологий», e-mail: pr@atcindustry.ru
1. **Sovetnikov Timofei Olegovitch** – student, Lomonosov Moscow State University; Specialist, Advanced Technologies Center, e-mail: sovetnikov.to18@physics.msu.ru
2. **Akhmetova Assel Iosifovna** – Junior Researcher, Lomonosov Moscow State University; Leading specialist, Advanced Technologies Center, e-mail: pr@atcindustry.ru
3. **Belov Yuriy Kirillovich** – specialist, Advanced Technologies Center, e-mail: jk.belov@physics.msu.ru
4. **Maksimova Nadezhda Evgenievna** – programmer, Advanced Technologies Center, e-mail: maksimova.ne17@physics.msu.ru
5. **Terentev Alexander Denisovitch** – student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University; Programmer, Advanced Technologies Center, e-mail: terentev.ad18@physics.msu.ru
6. **Yaminsky Dmitry Igorevich** – PhD student, Lomonosov Moscow State University, e-mail: y@sinno.ru
7. **Yaminsky Igor Vladimirovich** – Professor, Doctor of Science in Physics and Mathematics; CEO, Advanced Technologies Center, e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru