



Получено: 5.08.2024 г. | Принято: 9.08.2024 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.6.364.370>

Научная статья

СКАНИРУЮЩАЯ КАПИЛЛЯРНАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

А.И.Ахметова^{1, 2}, к.ф.-м.н., науч. сотр., вед. спец., ORCID: 0000-0002-5115-8030

А.Д.Терентьев^{1, 2}, магистр, программист, ORCID: 0009-0009-1528-5284

А.И.Федосеев¹, д.ф.-м.н., проф., ORCID: 0009-0007-7282-1093

Д.И.Яминский¹, асп., ORCID: 0009-0009-6370-7496

И.В.Яминский^{1, 2}, д.ф.-м.н., проф., ген. дир., ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Аннотация. Сканирующая капиллярная микроскопия – оптимальный инструмент для бесконтактной визуализации живых клеток и измерения их механических свойств. Капиллярную микроскопию все чаще используют для исследования межклеточных контактов, для оценки морфологии при разных условиях роста клеточной культуры, для визуализации и измерения топографии срезов тканей. Бесконтактная визуализация без использования меток и фиксации, возможность исследования в жидких средах с высоким пространственным разрешением, проведение длительных экспериментов с живыми объектами делают капиллярную микроскопию важным и актуальным инструментом в современных исследованиях. Поэтому совершенствование устройства капиллярного микроскопа, внутренней архитектуры, механики, электроники и программного обеспечения представляет особый интерес.

Ключевые слова: сканирующая капиллярная микроскопия, живая материя, биомеханика, живые клетки

Для цитирования: А.И. Ахметова, А.Д. Терентьев, А.И. Федосеев, Д.И. Яминский, И.В. Яминский. Сканирующая капиллярная микроскопия для биологических применений. НАНОИНДУСТРИЯ. 2024. Т. 17. № 6. С. 364–370. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.6.364.370>.

Received: 5.08.2024 | Accepted: 9.08.2024 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.6.364.370>

Original paper

SCANNING CAPILLARY MICROSCOPY FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS

A.I.Akhmetova^{1, 2}, Researcher, Leading Specialist, ORCID: 0000-0002-5115-8030

A.D.Terentyev^{1, 2}, Master, Programmer, ORCID: 0009-0009-1528-5284

A.I.Fedoseev¹, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., ORCID: 0009-0007-7282-1093

D.I.Yaminsky¹, Post-Graduate, ORCID: 0009-0009-6370-7496

I.V.Yaminsky^{1, 2}, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., Director General, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Abstract. Scanning capillary microscopy is an optimal tool for contactless visualization of living cells and measurement of their mechanical properties. Capillary microscopy is increasingly used to study intercellular contacts, to assess morphology under different growth conditions of cell culture, to visualize and measure the topography of tissue sections. Contactless visualization without the use of labels and fixation, the possibility of research in liquid media with high spatial resolution, and long-term experiments with living objects make

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, Физический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical department, Moscow, Russia

² ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia



capillary microscopy an important and relevant tool in modern research. Therefore, the improvement of device of a capillary microscope, its internal architecture, mechanics, electronics, and software are of particular interest.

Keywords: scanning capillary microscopy, living matter, biomechanics, platelets, stem cells

For citation: A.I.Akhmetova, A.D.Terentyev, A.I.Fedoseev, D.I.Yaminsky, I.V.Yaminsky. Scanning capillary microscopy for biological applications. NANOINDUSTRY. 2024. Vol. 17. No. 6. PP. 364–370. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.6.364.370>.

ВВЕДЕНИЕ

Применение сканирующей капиллярной микроскопии (СКМ) в биомедицинских исследованиях активно развивается в последние годы. СКМ использовали для изучения клеточных взаимодействий в живых клетках с высоким пространственно-временным разрешением. В работе [1] объединили два метода – сканирующую капиллярную микроскопию и оптогенетическое исследование. Данный подход позволяет выявить степень межклеточных контактов и динамические изменения с течением времени, не видимые с помощью оптической микроскопии. Полученные в работе результаты актуальны для анализа состояний сердечных заболеваний.

СКМ использовалась для визуализации *in situ* клеток, растущих на гидрогеле [2]. Было показано, что определенные концентрации флуоресцентного красителя Т модулируют путь самосборки и изменяют морфологию и механические свойства гидрогеля; также анализировалось образование гидрогеля в присутствии тиофлавина Т. Измерения показали, что форма клеток, выращенных на гидрогеле, значительно отличалась от выращенных на чашке Петри. Клетки, выращенные в гидрогеле, имели более сферическую форму, в то время как клетки, выращенные на чашке Петри, были более распластанными. Таким образом, гидрогель лучше имитирует физиологическую среду клеток.

Были получены изображения отдельных коллагеновых фибрилл; однако для этого сухожилие взрослых крыс помещали на стеклянную поверхность и высушивали в течение ночи, после чего образец погружали в физиологический раствор [3].

В работе [4] исследовали влияние двух водорастворимых фуллеренов на поверхностную ультраструктуру и функцию макрофагов. Результаты показали, что эти фуллерены будут перспективными ингибиторами фагоцитоза, а СКМ является отличным инструментом для изучения морфологии адгезивных и хрупких образцов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сканирующая капиллярная микроскопия находит широкое применение для наблюдения

INTRODUCTION

The application of scanning capillary microscopy (SCM) in biomedical research has been actively developed in recent years. SCM has been used to study cellular interactions in living cells with high spatial and temporal resolution. In [1], two methods, scanning capillary microscopy and optogenetic study, were combined. This approach allows to reveal the degree of intercellular contacts and dynamic changes over time, which are not visible with optical microscopy. The results obtained in this work are relevant for analysing cardiac disease states.

SCM was used for *in situ* visualisation of cells growing on hydrogel [2]. Certain concentrations of the fluorescent probe T were shown to modulate the self-assembly pathway and alter the morphology and mechanical properties of hydrogel, and hydrogel formation in presence of thioflavin T was also analysed. Measurements showed that cells shape grown on hydrogel was significantly different from those grown on a Petri dish. Cells grown in hydrogel had a more spherical shape, while cells grown on Petri dish were more spread out. Thus, hydrogel better mimics the physiological environment of the cells.

Images of individual collagen fibrils were obtained; however, to achieve them, adult rat tendon was placed on a glass surface and dried overnight, after which the sample was immersed in physiological solution [3].

In [4], the effects of two water-soluble fullerenes on the surface ultrastructure and function of macrophages were studied. The results showed that these fullerenes would be promising inhibitors of phagocytosis, and SCM is an excellent tool for studying morphology of adhesive and fragile samples.

RESEARCH METHODS

Scanning capillary microscopy finds wide application for observation of biological objects - cells and living matter with nanometre spatial resolution.

For biologists to work conveniently and efficiently, the apparatus must fulfil a number of requirements:

- availability of a simple and intuitive software interface for microscope control;
- mandatory interface with an optical microscope;
- availability of an extended set of methods for processing, plotting, analysing and saving experimental data.

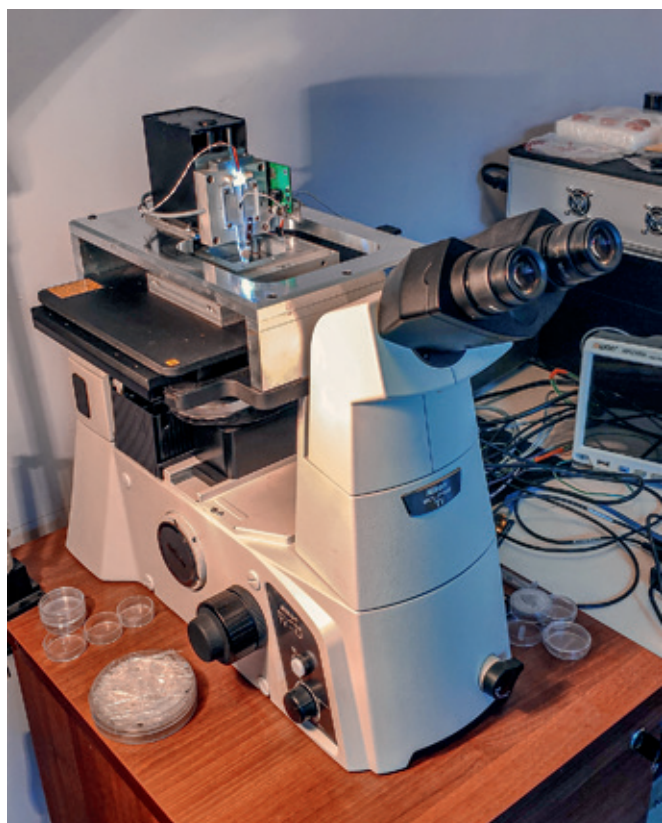


Рис.1. "ФемтоСкан X Айон", размещенный на инвертированном оптическом микроскопе Nikon Ti-U с 40х кратным объективом

Fig.1. FemtoScan X Ion placed on a Nikon Ti-U inverted optical microscope with a 40x objective lens

биологических объектов – клеток и живой материи с нанометровым пространственным разрешением.

Для удобной и эффективной работы биологов аппаратура должна удовлетворять ряду требований:

- наличие простого и интуитивно понятного программного интерфейса управления микроскопом;
- обязательное сопряжение с оптическим микроскопом;
- наличие расширенного набора методов обработки, построения, анализа и сохранения экспериментальных данных.

В работе представлены описания трех вариантов исполнения сканирующих капиллярных микроскопов "ФемтоСкан X Айон".

На рис.1 представлен вариант сканирующего капиллярного микроскопа, размещенный на инвертированном оптическом микроскопе Nikon Ti-U с 40-кратным объективом. Такое сочетание позволяет уверенно контролировать сближение капилляра с поверхностью клетки, визуально наблюдать клетки. В одном из окуляров есть возможность установки цифровой камеры высокого разрешения.

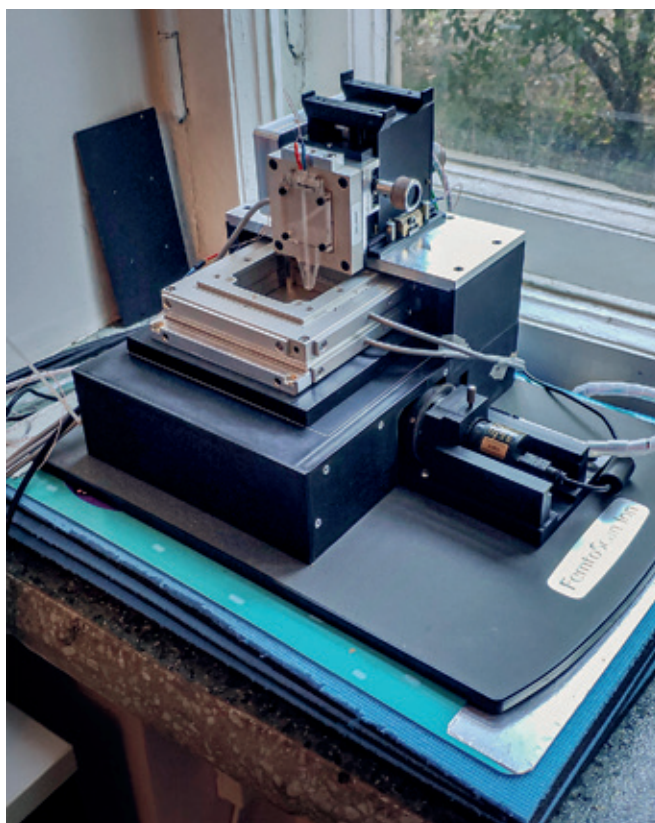


Рис.2. Компактная версия сканирующего капиллярного микроскопа "ФемтоСкан X Айон"

Fig.2. Compact version of the FemtoScan X Ion scanning capillary microscope

This paper presents descriptions of three versions of FemtoScan X Ion scanning capillary microscopes.

Fig.1 shows a version of the scanning capillary microscope mounted on a Nikon Ti-U inverted optical microscope with a 40x objective. This combination allows confident control of the approach of the capillary to the cell surface and visual observation of cells. A high-resolution digital camera can be mounted in one of the eyepieces.

Fig.2 shows a compact version of the FemtoScan X Ion scanning capillary microscope. This solution features an integrated digital microscope with automated focus adjustment. The microscope is also equipped with a precision two-axis X and Y motion platform using stepper motors.

Fig.3 shows the mechanical system of the microscope, which is also equipped with a two-axis X and Y movement platform. The vertical movement is performed with a high-precision servomotor, providing a minimum step in Z direction at the level of tens of nanometres. This mechanical positioning system can accommodate both the measuring head

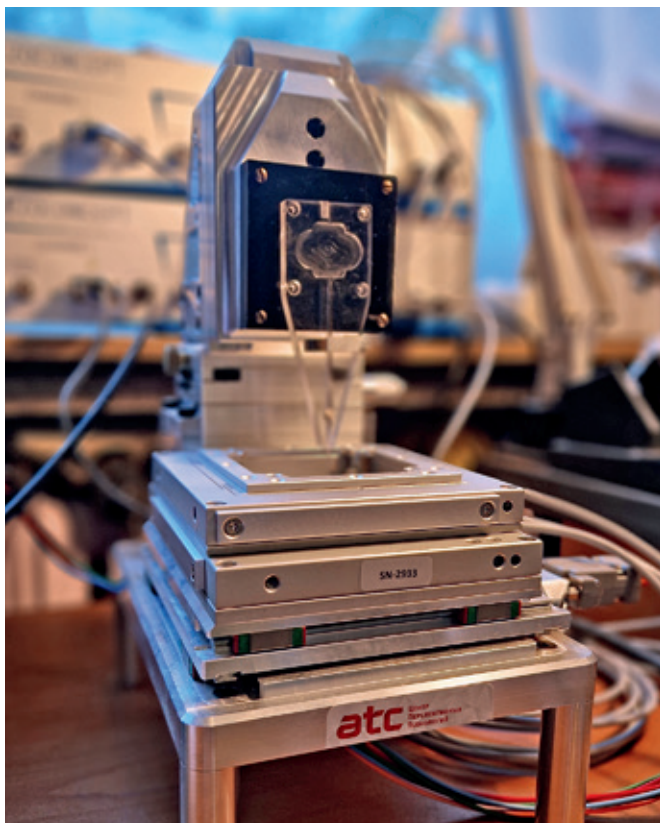


Рис.3. Механическая система микроскопа, оснащенная двухкоординатной платформой перемещения по координатам X и Y

Fig.3. Mechanical system of the microscope equipped with a two-axis platform of X and Y coordinates movement

На рис.2 представлена компактная версия сканирующего капиллярного микроскопа "ФемтоСкан Х Айон". В этом решении имеется встроенный цифровой микроскоп с автоматизированной настройкой фокуса. Также микроскоп оснащен прецизионной двухкоординатной платформой перемещения по координатам X и Y с использованием шаговых двигателей.

На рис.3 представлена механическая система микроскопа, также оснащенная двухкоординатной платформой перемещения по координатам X и Y. Вертикальное перемещение выполнено с помощью высокоточного серводвигателя, обеспечивающего минимальный шаг по Z на уровне десятка нанометра. На этой механической системе позиционирования может быть размещена как измерительная головка сканирующего капиллярного микроскопа, так и атомно-силового микроскопа.

Управление микроскопом может быть осуществлено двумя различными вариантами:

1. Прецизионной электроникой "ФемтоСкан Х" с применением 20-разрядных высокоскоростных

of a scanning capillary microscope and an atomic force microscope.

The microscope can be controlled in two different ways:

1. FemtoScan X precision electronics using 20-bit high-speed analog-to-digital and digital-to-analog converters, frequency synthesizer in the range up to 100 MHz, synchronous detectors, stepper motor drivers. Control signals are generated by Xilinx Spartan 6 FPGA with 150K slice capacity;
2. Multifunctional FemtoScan electronics, successfully tested on advanced models of FemtoScan scanning probe microscope. The electronics is controlled by Analog Devices ADSP2171 signal processor.

The software for the XILINX hardware FPGA is written in VHDL, for the top level in the cross-platform Qt system. An example of the user interface is shown in Fig.4. It provides several different scanning options - streaming, flirt-mode, smart move. Oscilloscope modes, measurement of ion current dependence on time, applied voltage, distance travelled by capillary and frequency of applied voltage significantly expand the functionality of the microscope for detailed study of morphology of biological objects.

In case of Analog Devices ADSP2171 signal processor, the control signal algorithms are written in assembly language and C and C++ languages. This variant has been developed and improved over the last thirty years.

Full-featured data analysis and processing is performed in FemtoScan Online software in all cases [5]. The trial version is available at FemtoScan website: femtoscanner.ru. Fig.5 shows the software interface for data processing.

CONCLUSIONS

The presented versions of scanning capillary microscopes use planar scanners that provide a wide range of movements in X and Y coordinates of 50-100 μm , and a range in Z coordinate of 10-30 μm , which is necessary for biology. At the same time, the achieved accuracy of movements is a fraction of nanometers, and movement frequencies are up to 7 kHz.

Using the above-mentioned scanning capillary microscopy facilities, tissue slices of Substantia nigra from a donor without neurological pathologies and from a Parkinson's patient were examined. It was visually shown that tissue slices from a donor without neurological pathologies have a more branched and rougher surface compared to samples from a Parkinson's patient [6].

For reliable use of presented versions of microscopes we have developed physical principles of nanometrology, which allow us to carry out adjustment and verification of the developed equipment. In this case, biological objects can also be used as calibration measures. As such an object we have proposed particles of tobacco mosaic virus. Other effective measures are described in publications [7, 8].



Рис.4. Интерфейс управляющей программы "ФемтоСкан X Айон"

Fig.4. Interface of the FemtoScan X Ion control software

аналого-цифровых и цифроаналоговых преобразователей, синтезатора частот в диапазоне до 100 МГц, синхронных детекторов, драйверов шаговых двигателей. Управляющие сигналы формируются ПЛИС Xilinx Spartan 6 с емкостью 150 К слайсов.

- Многофункциональной электроникой "ФемтоСкан", успешно апробированной на передовых моделях сканирующего зондового микроскопа "ФемтоСкан". Управление электроникой ведет сигнальный процессор Analog Devices ADSP2171.

Программное обеспечение для аппаратной ПЛИС XILINX написано в VHDL, для верхнего уровня – в кросс-платформенной системе Qt. Пример интерфейса пользователя представлен на рис.4. Он предусматривает несколько различных вариантов сканирования – поточечного, флирт-моды, умного перемещения. Режимы осциллографа, измерение зависимостей ионного тока от времени, приложенного напряжения, пройденного капилляром расстояния и частоты приложенного напряжения существенно расширяют функционал микроскопа при детальном изучении морфологии биологических объектов.

В случае использования сигнального процессора Analog Devices ADSP2171 алгоритмы управляющих сигналов написаны на ассемблере и языках С и С++. Этот вариант развивался и совершенствовался на протяжении последних тридцати лет.

FemtoScan X Ion scanning capillary microscopes are actively used in the project work of the Youth Innovative Creativity Centre "Nanotechnologies" of Physical Department of MSU to observe cells and living substance.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was performed with the financial support of Physical Department of Lomonosov Moscow State University (Registration subject 122091200048-7). FemtoScan Online software was provided by Advanced Technologies Center, www.nanoscopy.ru.

Thanks to A.N.Prokhorov and Y.K.Belov for development of microscope mechanics, S.F.Evstifeev, S.I.Oreshkin and S.M.Panova for improvement of electronics, N.A.Maximova and D.V.Kornilov for work on the FPGA control software, T.O.Sovetnikov for obtained images of the human brain Substantia nigra.

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.



Полнофункциональный анализ и обработка данных во всех случаях проводится в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн" [5]. Пробная версия доступна на сайте femtoscan.ru. На рис.5 представлен интерфейс программы для обработки данных.

ВЫВОДЫ

В представленных версиях сканирующих капиллярных микроскопов используются планарные сканеры, обеспечивающие необходимый для биологии широкий диапазон перемещений по координатам X и Y в 50–100 мкм, и диапазон по координате Z – 10–30 мкм. При этом достигаемая точность перемещений – доли нм, а частота перемещений – до 7 кГц.

С помощью указанных выше установок сканирующей капиллярной микроскопии были исследованы срезы ткани Substantia nigra донора без неврологических патологий и больного Паркинсоном. Визуально показано, что срезы ткани донора без неврологических патологий имеют более разветвленную и более шероховатую поверхность по сравнению с образцами от больного Паркинсоном [6].

Для достоверного использования созданных версий микроскопов нами разработаны физические принципы нанометрологии, позволяющие проводить настройку и поверку разрабатываемой

аппаратуры. При этом в качестве калибровочных мер также могут быть использованы биологические объекты. В качестве такого объекта нами предложены частицы вируса табачной мозаики. Другие эффективные меры описаны в публикациях [7, 8].

Сканирующие капиллярные микроскопы "ФемтоСкан X Айон" активно используются в проектной работе Центра молодежного инновационного творчества "Нанотехнологии" физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова для наблюдения клеток и живой материи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена по госзаданию при финансовой поддержке физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Регистрационная тема 122091200048-7). ПО "ФемтоСкан Онлайн" представлено ООО НПП "Центр перспективных технологий" www.nanoscopy.ru.

Благодарность Прохорову А.Н. и Белову Ю.К. за разработку механики микроскопов, Евстифееву С.Ф., Орешкину С.И. и Пановой С.М. за усовершенствование электроники, Максимовой Н.А. и Корнилову Д.В. за работу над управляющей программой ПЛИС, Советникову Т.О. за полученные изображения черной субстанции мозга человека.



vacuum.org.ru

ВНИТ

31-ая научно-техническая конференция
с участием зарубежных специалистов
«Вакуумная наука и техника»

г. Пятигорск, 01-05 октября 2024 г.

При поддержке



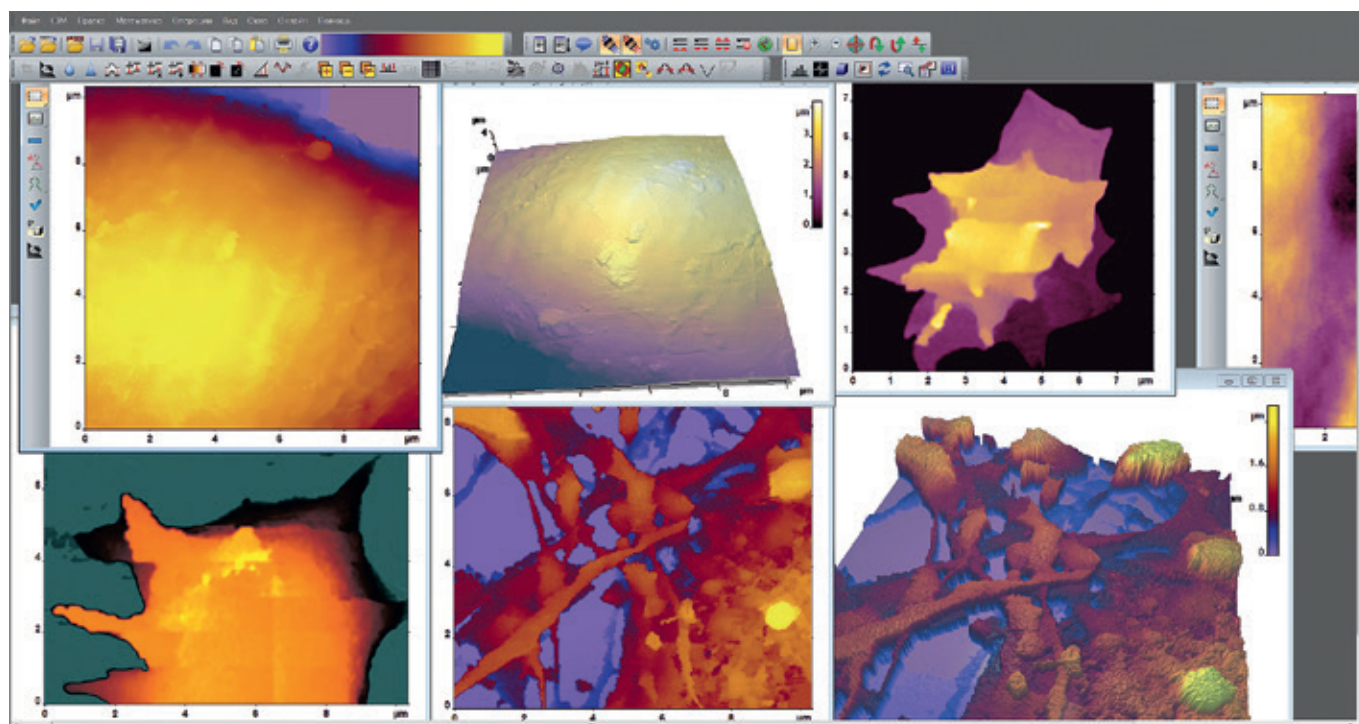


Рис.5. Рабочее окно ПО "ФемтоСкан Онлайн"

Fig.5. Working window of FemtoScan Online software

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.

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Song Q, Alvarez-Laviada A., Schrup S.E., Reilly-O'Donnell B., Entcheva E., Gorelik J. Opto-SICM framework combines optogenetics with scanning ion conductance microscopy for probing cell-to-cell contacts. *Commun Biol.* 2023. Nov 8. Vol. 6(1). PP. 1131. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05509-3>
2. Tikhonova T.N., Kolmogorov V.S., Timoshenko R.V., Vaneev A.N., Cohen-Gerassi D., Osminkina L.A., Gorelik P.V., Erofeev A.S., Sysoev N.N., Adler-Abramovich L. *et al.* Sensing Cells-Peptide Hydrogel Interaction In Situ via Scanning Ion Conductance Microscopy. *Cells.* 2022. Vol. 11(24). P. 4137. <https://doi.org/10.3390/cells11244137>
3. Ushiki T., Nakajima M., Choi M., Cho S.J., Iwata F. Scanning ion conductance microscopy for imaging biological samples in liquid: A comparative study with atomic force microscopy and scanning electron microscopy. *Micron* 2012. Vol. 43. PP. 1390–1398.
4. Ruan H., Zhang X., Yuan J., Fang X. Effect of water-soluble fullerenes on macrophage surface ultra-structure revealed by scanning ion conductance microscopy. *RSC Adv.* v. 2022. Aug 10. Vol. 12(34). PP. 22197–22201. <https://doi.org/10.1039/d2ra02403a>
5. Akhmetova A.I., Yaminsky D.I., Yaminsky I.V. Femtoscan Online: Image Processing and Filtering. *NANOINDUSTRY.* Vol. 17. No. 3-4. 2024. PP. 178–183. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.3-4.178.183>
6. Akhmetova A.I., Sovetnikov T.O., Zorikova E.O., Yaminsky I.V. Scanning probe microscopy of substantia nigra. *NANOINDUSTRY.* Vol. 17. No. 1. 2024. PP. 26–31. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.1.26.31>
7. Akhmetova A.I., Terentyev A.D., Senotrusova S.A., Sovetnikov T.O., Yaminsky D.I., Popov V.V., Yaminsky I.V. Diffraction grating as a means of metrological support of microscopy. *NANOINDUSTRY.* Vol. 17. No. 2. 2024. PP. 128–133. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.2.98.105>
8. Akhmetova A.I., Sovetnikov T.O., Loginov B.A., Yaminsky D.I., Yaminsky I.V. Quartz reference measure for scanning probe microscopy. *NANOINDUSTRY.* Vol. 17. No. 2. 2024. PP. 98–105. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.2.98.105>

12-14 НОЯБРЯ

УФА 2024



РОССИЙСКИЙ ПРОМЫШЛЕННЫЙ ФОРУМ

Международные
специализированные выставки

- МАШИНОСТРОЕНИЕ
- МЕТАЛЛООБРАБОТКА
- ИННОВАЦИОННЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ УФЫ

www.prombvk.ru

Место проведения:
Выставочный комплекс
г.Уфа, ул. Менделеева 158



prombvk



promexroufa



Организаторы:



МИНИСТЕРСТВО ПРОМЫШЛЕННОСТИ,
ЭНЕРГЕТИКИ И ИННОВАЦИЙ
РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН



АДМИНИСТРАЦИЯ
ГОРОДСКОГО ОКРУГА г. УФА
РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

БВК

Поддержка



МИНПРОМТОРГ
РОССИИ



РОССИЙСКАЯ
АССОЦИАЦИЯ
«СТАНКОИНСТРУМЕНТ»

Партнер деловой
программы



НАУРР
Национальная Ассоциация
Участников Рынка Робототехники

Технический
партнер



Media02
Техническое сотрудничество
мероприятий

Реклама. ООО «БВК» 0278179329