



Получено: 2.11.2023 г. | Принято: 8.11.2023 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.444.448>

Научная статья

СЕРДЦЕ КАПИЛЛЯРНОГО МИКРОСКОПА

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

Т.О.Советников^{1,2}, магистр, инженер, ORCID: 0000-0001-6541-8932

Н.Е.Максимова^{1,2}, магистр, программист, ORCID: 0000-0001-7385-6799

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

А.А.Ужегов^{1,2}, магистр, программист, ORCID: 0009-0009-2378-4016

И.В.Яминский^{1,2}, д.ф.-м.н., проф. МГУ имени М.В.Ломоносова, ORCID: 0000-0001-8731-3947 /

yaminsky@nanoscopy.ru

Аннотация. Сканирующая капиллярная или ион-проводящая микроскопия является уникальным инструментом, позволяющим получить бесконтактным способом 3D-морфологию биологических объектов в естественной среде. Пробоподготовка отличается простотой – нет необходимости вводить флуоресцентные метки или фиксировать образец. Главное достоинство метода – можно отслеживать динамические процессы живых клеток и тканей. Устройство капиллярного микроскопа позволяет не только деликатно визуализировать мягкие биологические объекты, но и получать данные о биомеханических свойствах образца. В данной статье пойдет речь о тонкостях устройства капиллярного микроскопа.

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

Для цитирования: А.И. Ахметова, Т.О. Советников, Н.Е. Максимова, А.Д. Терентьев, А.А. Ужегов, И.В. Яминский. Сердце капиллярного микроскопа. НАНОИНДУСТРИЯ. 2023. Т. 16, № 7–8. С. 444–448. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.444.448>

Received: 2.11.2023 | Accepted: 8.11.2023 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.444.448>

Original paper

THE HEART OF THE CAPILLARY MICROSCOPE

A.I.Akhmetova^{1,2}, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-5115-8030

T.O.Sovetnikov^{1,2}, Master Degree, Engineer, ORCID: 0000-0001-6541-8932

N.E.Maksimova^{1,2}, Master, Programmer, ORCID: 0000-0001-7385-6799

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

A.A.Uzhegov^{1,2}, Master, Programmer, ORCID: 0009-0009-2378-4016

I.V.Yaminsky², Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Abstract. Scanning capillary or ion-conducting microscopy is a unique tool that allows one to obtain the 3D morphology of biological objects in a natural environment in a non-contact manner. At the same time, sample preparation is simple – there is no need to introduce fluorescent labels or fix the sample. The most important advantage of the method is that it is possible to monitor the dynamic processes of living cells and tissues. The device of a capillary microscope allows not only delicate visualization of soft biological objects, but also obtaining data on the biomechanical properties of the sample. This paper will discuss the intricacies of a capillary microscope.

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



Keywords: scanning capillary microscopy, living systems, biomechanics, instrumentation

For citation: A.I. Akhmetova, T.O. Sovetnikov, N.E. Maksimova, A.D. Terentiev, A.A. Uzhegov, I.V. Yaminsky. The heart of the capillary microscope. NANOINDUSTRY. 2023. V. 16, no. 7-8. PP. 444-448. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.444.448>.

ВВЕДЕНИЕ

Главный принцип сканирующего капиллярного микроскопа (СКМ), который был изобретен Полем Хансмой в 1989 году [1], относительно прост. Берется чашка Петри с образцом, размещается под установленным над ней капилляром, среда образца и капилляра заполняются проводящим электролитическим раствором. В капилляр помещается один электрод, второй – в чашку Петри, между электродами поддерживается постоянная разность потенциалов и измеряется ионный ток. Как только ток падает на доли процента (обычно около 0,5 %) от величины тока на удалении от образца, капилляр останавливается над поверхностью, при этом не оказывая силового воздействия. С помощью таких многочисленных итераций получается 3D-карта поверхности исследуемого объекта. Подробнее принцип работы СКМ описан в [2].

Казалось бы, все просто, но дьявол в мелочах. И все тонкости устройства электроники и механики капиллярного микроскопа, нюансы программного обеспечения и реализация режимов умного сканирования позволяют капиллярной микроскопии оставаться в авангарде техник визуализации живых объектов [3]. На пути к созданию таких высокоточных измерительных систем конструкторам приходится решать ряд научно-технических задач.

В случае электроники капиллярного микроскопа необходимо разработать решение, которое способно параллельно считывать и отправлять на управляющий компьютер и механику микроскопа сразу несколько сигналов, причем с наименьшими задержками. Механические компоненты микроскопа, помимо прецизионных перемещений образца и капилляра (зонда) в процессе измерений, должны осуществлять высокоскоростной подвод капилляра из воздуха, где происходит его установка, к жидкости, где проводятся измерения, а также позволять перемещать образец в горизонтальной плоскости для выбора интересующей области измерений. Грамотно разработанная электроника и программное обеспечение микроскопа становятся решающим фактором в определении числа получаемых в единицу времени снимков заданного качества – одного из ключевых параметров зондовых микроскопов.

INTRODUCTION

The basic principle of the scanning capillary microscope (SCM), which was invented by Paul Hansma in 1989 [1], is relatively simple. A Petri dish with a sample is taken, placed under a capillary mounted above it, the sample and capillary media are filled with a conductive electrolytic solution. One electrode is placed in the capillary, the second electrode is placed in the Petri dish, a constant potential difference is maintained between the electrodes and the ionic current is measured. As soon as the current drops by a fraction of a per cent (usually around 0.5 %) of the current away from the sample, the capillary stops over the surface without exerting any force. With these multiple iterations, a 3D map of the surface of the object under investigation is obtained. The principle of SCM operation is described in detail in [2].

It would seem that everything is simple, but the devil is in the detail. All the subtleties of capillary microscope electronics and mechanics, software nuances and implementation of smart scanning modes allow capillary microscopy to remain at the forefront of techniques for visualizing of living objects [3]. On the way to creating such high-precision measurement systems, designers have to solve a number of scientific and technical problems.

In case of capillary microscope electronics, it is necessary to develop a solution that is capable of reading and sending several signals to the control computer and microscope mechanics in parallel with the shortest delays. The mechanical components of the microscope, in addition to precise movements of the specimen and capillary (probe) during measurements, must provide high-speed supply of the capillary from the air, where it is installed, to the liquid, where measurements are carried out, as well as allow moving the specimen in the horizontal plane to select the area of interest. Properly designed electronics and microscope software become a decisive factor in determining the number of images of a given quality obtained per unit time - one of the key parameters of probe microscopes.

CONSTRUCTION OF THE FEMTOSCAN Xi MICROSCOPE

In developing our own capillary microscopy platform, our Living Systems Physics group has managed

КОНСТРУКЦИЯ МИКРОСКОПА "ФЕМТОСКАН Xi"

При разработке собственной платформы капиллярной микроскопии нашей группе физики живых систем удалось совместить все эти достоинства в удачной и компактной реализации микроскопа "ФемтоСкан Xi" (рис.1).

В схеме самого микроскопа (рис.2) задействованы:

1. Контроллер для управления микроскопом.

Электроника микроскопа построена на базе программируемой логической интегральной схемы (ПЛИС или FPGA в иностранных источниках) Spartan (Xilinx), управляемой написанным нами ПО [4]. Она осуществляет связь с пользовательским интерфейсом на управляющем компьютере, принимает и обрабатывает сигнал с усилителя тока и подает сигналы на пьезоманипуляторы и подвижки.

2. Система управления пьезоманипуляторами.

Для качественной визуализации биообъектов необходимы пьезоманипуляторы с большим диапазоном перемещений. На микроскопе "ФемтоСкан Xi" установлены планарные пьезоманипуляторы, работающие в паре с усилителем с обратной связью.

3. Пьезоманипулятор зонда по оси Z с диапазоном перемещений в 30 мкм.
4. Пьезоманипулятор образца для перемещения в плоскости XY с диапазоном перемещений в 50 мкм по обеим осям.
5. Механический двигатель по оси Z с диапазоном перемещений в 5 мм осуществляет подвод капилляра из воздуха в жидкость.
6. Система механических двигателей в плоскости XY с диапазоном перемещений в 12 мм позволяет дистанционно перемещать образец, выбирать область измерения и исследовать различные участки образца.
7. Предусилитель ионного тока.
8. Инвертированный видеоокуляр для наблюдений исследуемого образца в оптику, с его помощью удобно подстраивать интересующую область измерений.

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 ионного тока.

Установка микроскопа помещается в камеру Фарадея, которая экранирует систему, а вместе с ней и рабочую область микроскопа с предусилителем тока от внешних помех. Компактность микроскопа позволяет также поддерживать внутри бокса



Рис.1. Сканирующий капиллярный микроскоп "ФемтоСкан Xi"
Fig.1. FemtoScan Xi scanning capillary microscope

to combine all these advantages in a successful and compact realisation of the FemtoScan Xi microscope (Fig.1).

The scheme circuit of the microscope itself (Fig.2) involves:

1. Controller for microscope control.

The microscope electronics is based on a programmable logic integrated circuit (FPGA) Spartan (Xilinx), controlled by software written by us [4]. It communicates with the user interface on the control computer, receives and processes the signal from the current amplifier and gives signals to the piezo manipulators and slides.

2. Piezo manipulator control system.

Piezo manipulators with a large range of motion are required for high-quality visualisation of bioobjects. The FemtoScan Xi microscope is equipped with planar piezo manipulators working in conjunction with a feedback amplifier.

3. Piezo probe manipulator in the Z-axis with a movement range of 30 μm .
4. Sample piezo manipulator for movement in the XY plane with a movement range of 50 μm in both axes.
5. A mechanical motor in the Z-axis with a range of movement of 5 mm leads the capillary from air to liquid.
6. A system of mechanical motors in the XY plane with a movement range of 12 mm, allows to

постоянные условия окружающей среды, что особенно важно для поддержания жизнедеятельности исследуемых биообъектов. В ходе длительного наблюдения живых клеток во внешней среде должны поддерживаться постоянные температура (например, 37 °С для клеток организма человека) и концентрация углекислого газа (для большинства клеток на уровне 5%). СКМ с системой поддержания жизнедеятельности (СПЖ) клеток могут быть использованы для визуализации динамики фенотипа живых нейронов, поскольку визуализация фиксированных образцов не охватывает всю сложность динамических событий, которые происходят во время развития и регенерации нервной системы [5]. На данный момент внедрение передовых методов визуализации в неврологии все еще находится в зачаточном состоянии.

Оптические наблюдения в нашем случае реализованы с помощью системы с оптическим видеоокуляром (рис.2, позиция 7). Для поддержания температуры образца можно использовать локальный нагреватель разработанной нами оригинальной конструкции, располагаемый непосредственно под чашкой Петри с образцом [6].

Помимо компактных габаритов, для проведения продолжительных измерений в различных участках образца микроскоп оборудован двухступенчатой системой позиционирования. Первая ступень выполнена с использованием линейных направляющих и шаговых двигателей (рис.2, позиция 6), на нее установлена вторая ступень – XY-пъезоманипулятор (рис.2, позиция 4).

Среди преимуществ микроскопа также стоит отметить реализованный операционный усилитель ионного тока, имеющий среднеквадратичный шум на уровне единиц пикоампер, что составляет менее промилле от величины регистрируемого сигнала. Удачным микроскоп оказывается и с точки зрения пользователя. Программа управления микроскопом позволяет, с одной стороны, проводить непосредственные измерения в режиме флирт-моды (варианте прыжковой техники, используемой при сканировании в СКМ), с другой – отслеживать положение образца с оптического окуляра, управлять перемещениями образца с помощью механических двигателей и считывать сигналы с нескольких периферийных датчиков, задействованных в СПЖ. Возможность отслеживать все интересующие оператора параметры дает существенное удобство при проведении продолжительных измерений и увеличивает результативность эксперимента.

ВЫВОДЫ

Новая версия микроскопа "ФемтоСкан Xi" является интересным и довольно удачным вариантом

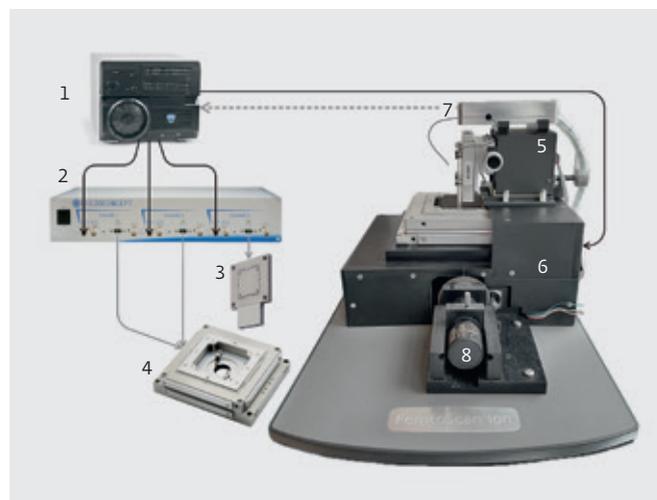


Рис.2. Схема установки капиллярного микроскопа "ФемтоСкан Xi"

Fig.2. Schematic diagram of the FemtoScan Xi capillary microscope setup

remotely move the specimen, select the measuring area and examine different areas of the specimen.

7. Ion current preamplifier.

8. Inverted video eyepiece for observing the sample under investigation in the optics, with its help it is convenient to adjust the measurement area of interest.

Black lines in the diagram show the paths of signals between the Controller and the units controlled by it, grey – between the units and functional elements of the microscope. The solid line shows the signals coming out of the Controller, the dotted line – the signal coming from the ion current preamplifier.

The microscope is placed in a Faraday chamber, which shields the system, and the working area of the microscope with the current preamplifier, from external interference. The compactness of the microscope also makes it possible to maintain constant environmental conditions inside the box, which is especially important for maintaining viability of the biosubjects under study. During long-term observation of living cells, the ambient temperature (e.g., 37 °C for human cells) and carbon dioxide concentration (5% for most cells) must be kept constant. SCM with cell viability maintenance system (CVMS) can be used to viewing the dynamics of the phenotype of living neurons, as imaging of fixed samples does not capture the complexity of dynamic events that occur during developing and regenerating of the nervous system [5]. At the moment,

реализации системы сканирующей капиллярной микроскопии. Оснащение установки системой поддержания жизнедеятельности клеток открывает уникальные возможности для проведения исследований для целей биомедицины и наук о жизни.

БЛАГОДАРНОСТИ

ПО "ФемтоСкан Онлайн" предоставлено ООО "НПП "Центр перспективных технологий", www.nanoscopy.ru

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. Hansma P.K., Drake B., Marti O. *et al.* The scanning ion conductance microscope. *Science*. 1989. Vol. 243. PP. 641–643. <https://doi.org/10.1126/science.2464851>
2. Akhmetova A.I., Sovetnikov T.O., Tikhomirova M.A. *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*. 2022. Vol. 56. PP. 1159–1163. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02770-4>
3. Zhu C., Huang K., Sieser N.P., Baker L.A. Scanning Ion Conductance Microscopy. *Chem Re. V.* 2021. Vol. 121(19). PP. 11726–11768. <https://doi.org/10.1021/acs.chemre.v.0.c00962>
4. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Maksimova N.E. Software for scanning probe microscopy of bacterial cells. *Medicine and high technologies*. 2022. Vol. 12(4). PP. 5–8. <https://doi.org/10.34219/2306-3645-2022-12-4-5-8>
5. Baričević Z., Ayar Z., Leitao S.M., Mladinic M., Fantner G.E., Ban J. Label-Free Long-Term Methods for Live Cell Imaging of Neurons: New Opportunities. *Biosensors (Basel)*. 2023. Vol. 20, Issue 13(3), P. 404. <https://doi.org/10.3390/bios13030404>
6. Sinitsyna O.V., Bobrovsky A.Yu., Meshkov G.B. *et al.* Surface relief changes in cholesteric cyclosiloxane oligomer films at different temperatures. *Journal of Physical Chemistry B*. 2015. Vol. 119(39). PP. 12708–12713. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b06643>

implementation of advanced imaging techniques in neuroscience is still in its infancy.

Optical observations in our case are realised using a system with an optical video eyepiece (Fig.2, position 7). To maintain sample temperature, we can use a local heater of our original design, placed directly under the Petri dish with the sample [6].

In addition to compact dimensions, the microscope is equipped with a two-stage positioning system for continuous measurements in different parts of the specimen. The first stage is made using linear guides and stepper motors (Fig.2, position 6), the second stage – XY-piezo manipulator (Fig.2, position 4) is mounted on it.

Among the advantages of the microscope it is also worth mentioning the implemented operational amplifier of ionic current, which has an RMS noise at the 1 picoampere level, which is less than a ppm of the recorded signal value. The microscope is also successful from the user's point of view. The microscope control software allows, on the one hand, direct measurements in the flirt mode (a variant of the jumping technique used in SCM scanning), on the other hand, tracking the specimen position from the optical eyepiece, controlling the specimen movements by means of mechanical motors and reading signals from several peripheral sensors involved in SPM. Ability to track all the parameters of interest to the operator provides significant convenience when making long measurements and increases the results of the experiment.

CONCLUSIONS

The new version of FemtoScan Xi microscope is an interesting and quite successful variant of development of the scanning capillary microscopy system. Equipping the system with a cell life support system opens up unique opportunities for research in biomedicine and life sciences.

ACKNOWLEDGMENTS

FemtoScan Online software is provided by Advanced Technologies Center, www.nanoscopy.ru

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.



АНАЛИТИКА
ЭКСПО

22-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

16–18.04.2024

Москва, Крокус Экспо



Получите билет

analitikaexpo.com



ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER



Ваш промокод

Analitika