



СКАНИРУЮЩАЯ КАПИЛЛЯРНАЯ МИКРОСКОПИЯ

SCANNING CAPILLARY MICROSCOPY

УДК 621.385.833, ВАК 05.11.13, DOI: 10.22184/1993-8578.2017.78.7.42.46

А.Ахметова^{1,2}, И.Яминский^{1,2} / yaminsky@nanoscopy.ru
A.Ahmetova^{1,2}, I.Yaminsky^{1,2}

Приведен обзор публикаций о сканирующей ион-проводящей микроскопии с целью изучения истории развития этого метода, его особенностей и областей применения.

A review of publications on scanning ion conductance microscopy is presented to study the history of the development of this method, its features and applications.

Первая публикация о сканирующей капиллярной микроскопии вышла в 1989 году [1]. Статья П.Хансма, Б.Дрейка и О.Марти в журнале Science "Сканирующий ион-проводящий микроскоп" заложила основу для развития нового направления в микроскопии. Сканирующий ион-проводящий микроскоп (СИПМ) был разработан для отображения топографии поверхностей в электролите. Зондом микроскопа является заполненная электролитом микропипетка. Поток ионов через отверстие микропипетки уменьшается на небольшом расстоянии от поверхности. Механизм обратной связи может использоваться для поддержания заданной проводимости с одновременным определением расстояния до поверхности. В статье также была высказана мысль, что СИПМ может отображать не только топографию, но и локальные ионные токи через поры на поверхности.

В своей следующей публикации Хансма с коллегами предложил совмещенный атомно-силовой и ион-проводящий микроскоп. Конструкция основана на использовании изогнутой стеклянной пипетки, которая действует как датчики силы и проводимости. Измерение отклонения пипетки позволило получить более стабильную обратную связь, чем возможно было в предыдущих версиях СИПМ. С помощью комбинированного микроскопа были исследованы синтетические мембраны в режимах контакта и тэппинга в жидкости. Пипетки были изготовлены из боросиликатного стекла или кварцевых капиллярных трубок. Хотя боросиликатное

стекло оказалось удобным и простым в обращении, Хансма и его коллеги получили наивысшее разрешение и высокую воспроизводимость, используя вытянутые кварцевые трубки (Nanopics, Израиль). В статье указано, что, хотя работа в режиме контакта возможна, но более высокий контраст и менее заметное повреждение образца при получении изображений топографии и ионной проводимости обеспечиваются в режиме тэппинга [2].

Годом позже проф. Корчев с коллегами опубликовал работу о сканирующей ион-проводящей микроскопии живых клеток, которая позволяет изучать топографию, не повреждая образец. Изображения напоминают снимки, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии, с существенной разницей в том, что клетки остаются жизнеспособными и активными. Прибор может контролировать мелкошабную динамику клеточных поверхностей, а также движение целых клеток [3].

В работе [4] были проведены опыты с меланocyтами мышей, которые показали, что СИПМ наиболее подходит для визуализации образцов, погруженных в водные растворы. Поскольку зонд измеряет ионный ток без физического контакта с образцом во время сканирования, то не требуется предварительной подготовки клеток (фиксация на подложке).

СИПМ состоит из четырех основных компонентов: ионно-чувствительного стеклянного зонда (микропипетки), заполненного электролитом; сканирующей пьезоэлектрической системы; специализированного

¹ Центр перспективных технологий / Advanced Technologies Center.

² МГУ им. М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University.

электронно-измерительного оборудования, включающего систему обратной связи; цифровой электроники и компьютера, который обеспечивает пользовательский интерфейс для микроскопа, управление системой, а также позволяет выполнять обработку полученных данных. Уже тогда предсказывалось, что СИПМ потенциально может быть применен для исследований в реальном времени в электрофизиологии, при проведении микроманипуляций и доставки лекарств.

В [5] показано, что СИПМ может измерять изменения в объеме клеток в диапазоне от 10^{-19} до 10^{-9} литра.

В [6] представлен гибрид СИПМ и сканирующей ближнепольной оптической микроскопии. Этот метод позволяет выполнять количественный анализ поверхности ячейки с высоким разрешением и проводить одновременную запись топографических и оптических изображений. Особенностью метода является надежный механизм управления расстоянием между зондом и образцом в физиологическом буфере.

В работе [7] проведено сравнение сканирующей ион-проводящей и атомно-силовой (АСМ) микроскопии. В качестве модельных образцов для сравнения возможностей АСМ- и СИПМ-визуализации использовались микроворсинки живых клеток А6. Качество АСМ-изображений значительно улучшилось после фиксации клеток, в то время как на СИПМ-снимках оно не изменилось. В АСМ измеренная высота и ширина целых клеток зависели от значения силы, в то время как в СИПМ они были постоянными в пределах большого диапазона заданных значений. Таким образом, было показано, что получение точной топографии живых клеток в АСМ возможно только с использованием режима силового картирования, который, помимо определения механических свойств образца, обеспечивает изображение "нулевой силы" или "высоты контакта" ячейки. Однако скорость формирования изображения в жидкости обычно ограничена несколькими пикселями в секунду, что требует достаточно много

The first publication on scanning capillary microscopy was published in 1989 [1]. The article by P.Hansma, B.Drake and O.Marti in the Science journal "The scanning ion-conductance microscope" laid the foundation for the development of a new area in microscopy. Scanning ion conductance microscope (SICM) was developed to image the topography of surfaces in the electrolyte. The probe of the microscope is a micropipette filled with electrolyte. The ion flux through the micropipette opening is reduced at a small distance from the surface. The feedback mechanism can be used to maintain a given conductivity while simultaneously determining the distance to the surface. The authors also suggested that SICM can image not only topography, but also local ion currents through the pores on the surface.

In their next publication, Hansma and colleagues proposed a combined atomic-force and ion-conductance microscope. The design is based on the use of a curved glass pipette, which acts as a force and conductivity sensors. The measurement of the deviation of the pipette allowed to obtain a more stable feedback than was possible in previous versions of SICM. Using a combined microscope, synthetic membranes were studied in the contact and tapping modes in a liquid. The pipettes were made of borosilicate glass or quartz capillary tubes. Although borosilicate glass proved to be convenient and easy to handle, Hansma and his colleagues obtained the highest resolution and high reproducibility, using elongated quartz tubes (Nanonics, Israel). The article states that although operation in the contact mode is possible, a higher contrast and

less noticeable damage of the sample when obtaining images of topography and ionic conductivity are provided in the tapping mode [2].

A year later prof. Korchev and colleagues published a paper on scanning ion conductance microscopy of living cells, which allows studying topography without damaging the sample. The images resemble those obtained with scanning electron microscopy, with a significant difference in the fact that the cells remain viable and active. The device can control the small-scale dynamics of cell surfaces, as well as the movement of whole cells [3].

In work [4], the experiments with melanocytes of mice were conducted, which showed that SICM is most suitable for visualization of samples in aqueous solutions. Since the probe measures ion current without physical contact with the



Сканирующий капиллярный микроскоп. Создан при участии группы профессора Ю.Корчева (Империял колледж, Лондон)
Scanning capillary microscope. Created with participation of group of Professor Yu.Korchev (Imperial College, London)

времени для его получения с необходимым разрешением.

В статье [8] подробно описаны три распространенных метода обратной связи в СИПМ: постоянного тока (dc), переменного тока (ac) и прыжковый режим.

Разрешение в СИПМ определяется геометрией наконечника пипетки и расстоянием между пипеткой и образцом. Типичное значение достигаемого разрешения составляет около 10 нм по вертикали и около 50 нм в поперечном направлении [9]. Наилучшее разрешение (3–6 нм) было получено при визуализации белков S-слоя из *Bacillus sphaericus* на поверхности слюды с нанопипеткой диаметром 13 нм [10].

В [11] использовали прыжковый режим ион-проводящей микроскопии, позволяющий регулировать угол, под которым нанопипетка приближается к клетке. Угол может быть отрегулирован в диапазоне 0–90° к поверхности.

В дополнение к наблюдению топографии с высоким разрешением СИПМ может выполнять многофункциональный анализ живых клеток, включая морфологические трансформации, вызванные физиологическими воздействиями, идентификацию внутриклеточных сигнальных путей и определение характеристик механических ответов, что демонстрирует универсальность метода.

С помощью СИПМ были исследованы желудочковые миоциты, полученные из ткани сердца [12], подвергшихся длительной механической разгрузке [13] или рассечению, вызванному

sample during scanning, no preliminary preparation of the cells is required (fixation on the substrate).

SICM consists of four main components: an ion-sensitive glass probe (micropipette) filled with electrolyte; scanning piezoelectric system; specialized electronic measuring equipment, which includes a feedback system; digital electronics and a computer that provides a user interface for the microscope, control of the system, and also allows processing of the received data. Even then, it was predicted that SICM could

potentially be applicable to real-time studies in electrophysiology, micromanipulation and drug delivery.

In [5] it is shown that SICM can measure changes in cell volume in the range from 10^{-19} to 10^{-9} liters.

A hybrid of SICM and scanning near-field optical microscope is presented in [6]. This method allows quantitative analysis of the cell surface with high resolution and simultaneous recording of topographic and optical images. A special feature of the method is a reliable mechanism for controlling

the distance between the probe and the sample in a physiological buffer.

A comparison of the scanning ion conductance and atomic force (AFM) microscopy was carried out in [7]. Microvilli of living cells A6 were used as model samples for comparing the capabilities of AFM and SICM imaging. The quality of AFM images has improved significantly after fixing the cells, while on SIPM images it has not changed. In AFM, the measured height and width of whole cells depended on the force value, while in SICM they were constant within

осмотическим шоком [14]. Во всех этих случаях СИПМ выявил очевидные изменения в структуре поверхности по сравнению с изображениями миоцитов здоровой ткани.

В работе [15] продемонстрирована возможность использования нанопипетки как датчика pH.

Таким образом, мы видим, что капиллярный зонд или нанопипетка могут выступать в качестве средства доставки лекарств, электрохимического сенсора, биосенсора pH, тест-системы для обнаружения ионов металлов и многое другое. Капилляры с двумя или несколькими каналами дают также возможность реализовать направленный массоперенос веществ, биомакромолекул (пептидов, белков, нуклеиновых кислот и пр.) на поверхность биообъектов или внутри их объема [16].

В наших исследованиях по сканирующей капиллярной микроскопии мы используем установку, встроенную в инвертированный микроскоп (Nikon, Япония, рис.1). В работе [17] с помощью СИПМ наблюдались эритроциты, и анализ полученных результатов показал, что среднеквадратичная шероховатость их поверхности равна 20 нм.

В заголовок мы вынесли название "капиллярная микроскопия", так как оно объединяет гораздо больше функций и способов применения по сравнению с термином "ион-проводящая микроскопия". СИПМ успешно развивается с разработкой новых технологий создания многоканальных капилляров для направленной модификации

поверхности. Можно прогнозировать дальнейшее широкое применение ион-проводящего микроскопа в биомедицинских приложениях, тестировании лекарственных средств с использованием всего лишь одной клетки, а не их культуры [18].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 17-52-560001.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Hansma P.K., Drake B., Marti O., Gould S.A., Prater C.B.** The scanning ion-conductance microscope // *Science*. 243: 641–643. 1989.
2. **Proksch R., Lal R., Hansma P.K., Morse D., Stucky G.** Imaging the internal and external pore structure of membranes in fluid: TappingMode scanning ion conductance microscopy // *Biophys. J.* 71: 2155–2157. 1996.
3. **Korchev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M., Vodyanoy I., Lab M.J.** Scanning ion conductance microscopy of living cells // *Biophys. J.* 73: 653–658. 1997.
4. **Korchev Y.E., Milovanovic M., Bashford C.L., Bennett D.C., Sviderskaya E.V., Vodyanoy I., Lab M.J.** Specialized scanning ion-conductance microscope for imaging of living cells // *J. Microsc.* 188: 17–23. 1997.
5. **Korchev Y.E., Gorelik J., Lab M.J., Sviderskaya E.V., Johnston C.L., Coombes C.R., Vodyanoy I., Edwards C.R.** Cell volume measurement using scanning ion conductance microscopy // *Biophys. J.* 78: 451–457. 2000.

a large range of preset values. Thus, it has been shown that obtaining accurate topography of living cells in AFM is possible only using the force mapping mode, which, in addition to determining the mechanical properties of the sample, provides an image of the "zero force" or "contact height" of the cell. However, the rate of imaging in a fluid is usually limited to a few pixels per second, which requires a lot of time to obtain the image with the necessary resolution.

The paper [8] describes in detail three main methods of feedback in SICM: direct current

(dc), alternating current (ac), and hopping mode.

The resolution of SICM is determined by the geometry of the pipette tip and the distance between the pipette and the sample. The typical resolution achieved is about 10 nm in the vertical direction and about 50 nm in the transverse direction [9]. The best resolution (3–6 nm) was obtained by visualization of S-layer proteins of *Bacillus sphaericus* on the surface of mica with a nanopipette with a diameter of 13 nm [10].

In [11], hopping mode of ion conductance microscopy was

used, which allows to adjust the angle at which the nanopipette approaches the cell. The angle can be adjusted in the range of 0–90° to the surface.

In addition to high-resolution imaging of topography, SICM can perform a multifunctional analysis of living cells, including morphological transformations caused by physiological effects, identification of intracellular signaling pathways and characterization of mechanical responses, which demonstrates the versatility of the method.

With the help of SICM, ventricular myocytes obtained from



6. **Korchev Y.E., Raval M., Lab M.J., Gorelik J., Edwards C.R., Rayment T., Klenerman D.** Hybrid scanning ion conductance and scanning near-field optical microscopy for the study of living cells // *Biophys. J.* 78: 2675–2679. 2000.
7. **Seifert J., Rheinlaender J., Novak P., Korchev Y., Schäffer T.E.** Comparison of atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy for live cell imaging // *Langmuir.* 2015.
8. **Chen C., Zhou Y., Baker L.A.** Scanning Ion Conductance Microscopy // *Annual Review of Analytical Chemistry.* 2012.
9. **Ying L.M., Bruckbauer A., Zhou D., Gorelik J., Shevchuk A., et al.** The scanned nanopipette: a new tool for high-resolution bioimaging and controlled deposition of biomolecules // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7: 2859–66. 2005.
10. **Shevchuk A.I., Frolenkov G.I., Sanchez D., James P.S., Freedman N., et al.** Imaging proteins in membranes of living cells by high-resolution scanning ion conductance microscopy // *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 2212–16. 2006.
11. **Leo-Macias A., Agullo-Pascual E., Sanchez-Alonso J.L., Keegan S., Lin X., Arcos T., Feng-Xia-Liang, Korchev Y.E., Gorelik J., Fenyó D., Rothenberg E., Delmar M., et al.** Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc // *Nature Communications*, Vol: 7, ISSN: 2041-1723. 2016.
12. **Lyon A.R., MacLeod K.T., Zhang Y.J., Garcia E., Kanda G.K., et al.** Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 6854–59. 2009.
13. **Ibrahim M., Al Masri A., Navaratnarajah M., Siedlecka U., Soppa G.K., et al.** Prolonged mechanical unloading affects cardiomyocyte excitation-contraction coupling, transverse-tubule structure, and the cell surface // *FASEB J.* 24: 3321–29. 2010.
14. **Gorelik J., Yang L.Q., Zhang Y.J., Lab M., Korchev Y., Harding S.E.** A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure // *Cardiovasc. Res.* 72: 422–29. 2006.
15. **Piper J.D., Clarke R.W., Korchev Y.E., Ying L., Klenerman D., et al.** A renewable nanosensor based on a glass nanopipette // *Journal of the American Chemical Society.* Vol 128. P. 16462–16463. 2006. ISSN: 0002-7863.
16. **Яминский И.В.** Сканирующая капиллярная микроскопия // *НАНОИНДУСТРИЯ.* 2016. № 1(63). С. 76–79.
17. **Макарова Е., Багров Д., Горелкин П., Яминский И.** Наблюдение эритроцитов с помощью атомно-силовой и сканирующей ион-проводящей микроскопии // *НАНОИНДУСТРИЯ.* 2015. № 2(56). С. 42–47.
18. **Макарова Е.С., Багров Д.В., Горелкин П.В., Ерофеев А.С., Яминский И.В.** Визуализация эритроцитов методами атомно-силовой и сканирующей ион-проводящей микроскопии // *Медицина и высокие технологии.* 2015. № 2. С. 42–45.

cardiac tissue [12] subjected to prolonged mechanical unloading [13] or dissection caused by osmotic shock [14] were investigated. In all these cases, SICM revealed obvious changes in the surface structure compared to images of myocytes of healthy tissue.

Paper [15] demonstrated the possibility of using the nanopipette as a pH sensor.

Thus, we see that a capillary probe or nanopipette can act as a drug delivery device, an electrochemical sensor, a pH biosensor, a test system for detecting metal ions, and many others.

Capillaries with two or more channels also allow directed mass transfer of substances, bio-macromolecules (peptides, proteins, nucleic acids, etc.) to the surface of bioobjects or inside their volume [16].

In our research on scanning capillary microscopy, we use a device built into an inverted microscope (Nikon, Japan, Fig.). In [17], red blood cells were observed with the help of SICM, and analysis of the results showed that the RMS roughness of their surface is 20 nm.

In the title we used the term "capillary microscopy", because it

unites much more functions and methods of application in comparison with "ion conductance microscopy". SICM successfully develops with the development of new technologies for creating multi-channel capillaries for directional surface modification. It is possible to predict the further widespread use of an ion conductance microscope in biomedical applications, testing of drugs using only one cell, rather than their cultures [18].

The study was carried out with the financial support of the RFBR within the framework of the scientific project 17-52-560001. ■