

## نویسندگان

سمیه جلیلزاده<sup>۱\*</sup>پیروز مرعشی<sup>۲</sup>صدیقه صادق حسنی<sup>۳</sup>زهرا ثبات<sup>۴</sup>

\*Somayehjalilzadeh@yahoo.com

میکروسکوپی روبشی  
هدایت یونی

## چکیده

میکروسکوپ روبشی هدایت یونی وسیله‌ای مناسب برای بررسی سطوح نارسانا در محلول‌های الکترولیت است. به دلیل پرهیز از تماس فیزیکی مستقیم بین پروب و سطح نرم سلول، این میکروسکوپ می‌تواند برای مطالعه سلول‌های زنده به روشی غیرمخرب مورد استفاده قرار گیرد. همچنین در این روش، آماده‌سازی نمونه که در اغلب روش‌های میکروسکوپی پروبی روبشی مورد نیاز است، صورت نمی‌گیرد؛ بنابراین، محققین می‌توانند سطح سلول زنده را در حالی که با محلول الکترولیت احاطه شده‌است، مطالعه کنند. در سال‌های اخیر، این روش به‌صورت گسترده‌ای برای تهیه تصویر از انواع مختلف سلول‌های زنده مانند سلول‌های عصبی، الیگودندروسیت‌ها و میوسیت‌های موش استفاده شده‌است. در این مقاله اساس کار، چگونگی اجرا و کاربردهای میکروسکوپ روبشی هدایت یونی به‌صورت اجمالی بررسی شده‌است.

## واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ روبشی هدایت یونی، سلول زنده، پروب میکروبیپتی، الکتروفیز یولوژی.

## مقدمه

سلول، واحد سازنده تمام سیستم‌های زیستی است. تلاش‌های فراوانی در حوزه‌های مختلف علم و فناوری برای درک بهتر این سیستم پیچیده صورت گرفته است. اگر چه به کمک میکروسکوپ‌های الکترونی می‌توان تصاویری با قدرت تفکیک نانومتری از مواد زیستی تهیه کرد، اما در این روش نمونه‌ها باید قبل از بررسی در میکروسکوپ الکترونی منجمد، خشک و رنگ شوند که می‌تواند باعث تغییر شکل نمونه شود. این عامل همواره نگرانی پژوهش‌گران مواد زیستی را در مطالعات میکروسکوپی الکترونی به همراه داشته است [۱]. میکروسکوپ نیروی اتمی<sup>۶</sup> نیز به‌صورت روشی انعطاف‌پذیر در مقیاس نانو برای نشان دادن مورفولوژی سه‌بعدی مواد بیولوژیکی در شرایط فیزیولوژی، پیشرفت کرده است. اما اصول تصویربرداری AFM بر پایه اندازه‌گیری «نیرو» بین سوزن تیز و یک ساختار نانویی ممکن است منجر به تغییر شکل مکانیکی مواد نرم شود. برای جلوگیری از این نوع تغییر شکل، میکروسکوپ هدایت یونی<sup>۷</sup> یا میکروسکوپ روبشی هدایت یونی<sup>۸</sup> که در حالت جریان متناوب کار می‌کند، توسعه داده شده‌است [۲]. اساس این روش بر مبنای اندازه‌گیری تغییر مقاومت بین الکتروود و نمونه هنگام نزدیک شدن پروب به سطح نمونه است و چون این تغییر مقاومت، قبل از تماس مکانیکی بین نوک پروب و سطح نمونه به وجود می‌آید، می‌توان بارها تصویر سطح سلول‌های زنده را تهیه نمود. این روش امکان تهیه تصویر از زیربخش‌های سطح سلول با توان تفکیک بالا و مشاهده انبساط و انقباض اجزای برآمده سلولی مانند میکروویلی را امکان‌پذیر می‌سازد؛ همچنین به کمک آن تهیه تصویر با توان تفکیک پایین از کل سلول و تعیین کمی حرکت، متورم شدن و تغییرات کلی شکل سلول میسر است [۳]. روش میکروسکوپی SICM تنها روش تصویربرداری با توان تفکیک بالا است که بدون تماس با سطح عایق نمونه‌ی غوطه‌ور در مایع، کار می‌کند؛ بنابراین، برای مطالعه سلول‌های زنده و مواد نرم، بسیار مناسب است [۳ و ۴].

## تاریخچه

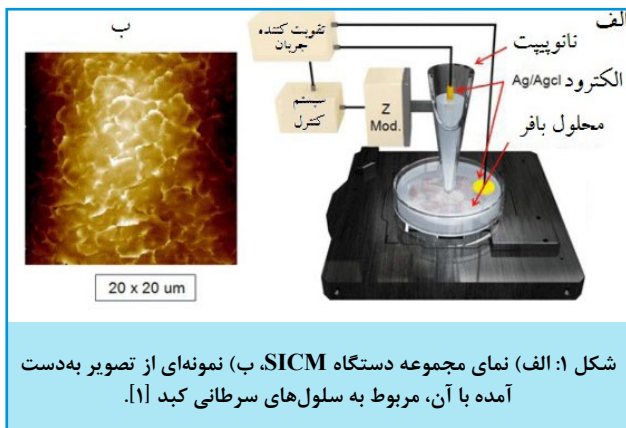
روش میکروسکوپی روبشی هدایت یونی نخستین بار در سال ۱۹۸۹ توسط هنسما<sup>۹</sup> و همکارانش در دانشگاه کالیفرنیا توسعه داده شد [۵]. در واقع SICM عضوی از خانواده بزرگ میکروسکوپ پروبی روبشی<sup>۱۰</sup> است که به ویژه برای روبش مواد نرم نارسانا در حمام محلول الکتریکی با توان تفکیک زیر میکرونی طراحی شده است. به منظور تصویربرداری با کنتراست بالا، SICM در تلفیق با حالت ضربه‌زنی<sup>۱۱</sup> میکروسکوپ نیروی اتمی استفاده می‌شود. این روش به مدت بسیار طولانی تنها برای تصویربرداری از لایه‌های پلیمری استفاده می‌شد. در سال ۱۹۹۷، کورچف<sup>۱۲</sup> تصویربرداری از سلول‌های زنده را بدون تماس مستقیم با سطح نمونه با استفاده از SICM توسعه داد. او اولین تصاویر SICM را از ملانوسیت‌های<sup>۱۳</sup> موش تهیه کرد [۷و۶]. در سال ۲۰۰۰، کورچف و همکارانش کاربرد تازه‌ای را برای SICM یافتند. آنها از این روش برای اندازه‌گیری حجم سلول در حین فعالیت استفاده نمودند. روش آنها در محدوده وسیعی از حجم‌های سلولی و نیز انواع مختلف فرایندهای سلولی به کار برده شده و ویژگی‌های سطحی و حجمی سلول به صورت هم‌زمان مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. همچنین گروه با سرپرستی کورچف برای نخستین بار در سال ۲۰۰۰، نقشه کانال‌های یونی فعال را هم‌زمان با تصویربرداری از غشاءهای سلولی کامل تهیه نمود. استفاده از یک سوزن هنگام روبش سطح نمونه، اندازه‌گیری کانال یونی منفرد سلول‌های کوچک را تسهیل نموده و تعیین ساختار سلولی در مقیاس زیر میکرون را که با روش‌های قدیمی غیرقابل دستیابی بود، امکان‌پذیر می‌کند.

توانایی اندازه‌گیری هم‌زمان بیش از یک ویژگی، از مزایای روش SICM است که باعث ارتقا کارایی این روش می‌شود. در سال ۲۰۰۲، گورلیک<sup>۱۴</sup> و همکارانش از SICM برای ثبت هم‌زمان توپوگرافی با توان تفکیک بالا و فلورسانس سطح سلول در روبش استفاده نمودند [۸].

## اصول اجرایی SICM

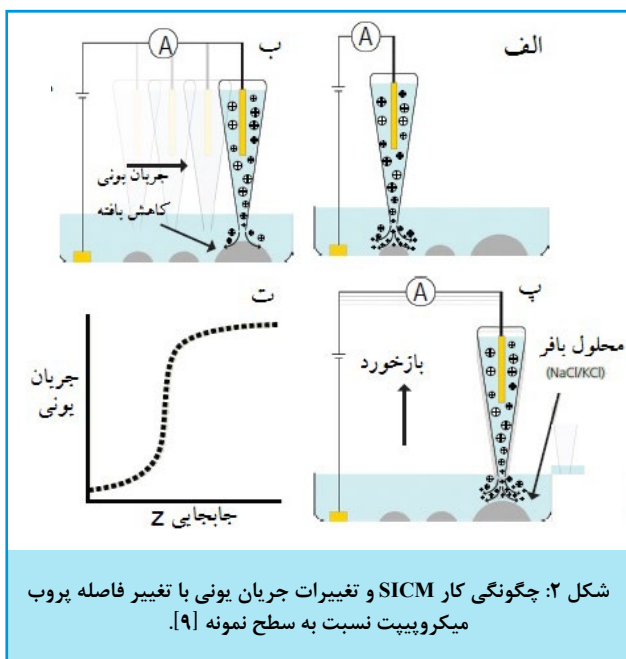
در میکروسکوپ روبشی هدایت یونی، یک پروب با بازوی محرک پیزو روی سطح حرکت داده می‌شود و به دنبال آن جریان یونی مشخصی بوجود آمده و اندازه‌گیری می‌شود. در این میکروسکوپ معمولاً پروب یک میکرو یا نانوپیت شیشه‌ای دارای بار الکتریکی است که با الکترولیت پر شده و به سمت سطح نمونه‌ای که عایق جریان یونی است و در حمام الکترولیتی با بار مخالف قرار دارد، نزدیک می‌شود. در شکل (۱)، نمای دستگاه SICM نشان داده شده است [۱].

یک الکترود شاهد (Ag/AgCl) درون پیپت و الکترود دیگر در فاصله نسبتاً دور از نمونه، درون الکترولیت در محفظه اندازه‌گیری قرار دارد. الکترود روبشگر در حالی که مختصات موقعیتش با رایانه و از طریق بازوی محرک پیزو کنترل می‌شود، درون محفظه قرار می‌گیرد. مقاومت محلول الکترولیت بین سوزن الکترود و سطح نمونه با استفاده از تقویت‌کننده‌ای که خاص محلول‌های الکتروفیز یولوژیک طراحی شده و برای پایش هدایت و بدست آوردن دیگر داده‌ها به



شکل ۱: (الف) نمای مجموعه دستگاه SICM، (ب) نمونه‌ای از تصویر به‌دست آمده با آن، مربوط به سلول‌های سرطانی کبد [۱].

رایانه متصل شده، اندازه‌گیری می‌شود. وقتی که ولتاژ خارجی بین این دو الکترود اعمال می‌شود، جریانی از طریق یون‌های هدایتی برقرار می‌شود. با فرض ناچیز بودن مقاومت الکترولیت، می‌توان دو مقاومت الکتریکی را در این مدار مورد توجه قرار داد که شامل مقاومت ناشی از شکل مخروط ناقص پیپت و مقاومت ناشی از فاصله بین پیپت و سطح نمونه هستند. در شکل (۲)، چگونگی تغییر جریان یونی با تغییر فاصله نشان داده شده است. وقتی که پیپت از سطح دور است، مقاومت دوم از بین رفته و جریان به حد اشباع می‌رسد، زیرا مقاومت ناشی از شکل نوک پیپت طی اندازه‌گیری ثابت باقی‌مانده (شکل ۲-الف). با نزدیک شدن سوزن میکروپیپتی به نمونه، حجم کانال هدایت یونی بین پروب و نمونه کوچک‌تر شده (شکل ۲-ب) و در نتیجه جریان یونی به شدت کاهش می‌یابد. تغییرات جریان یونی با یک تقویت‌کننده اندازه‌گیری شده و به‌عنوان سیگنال بازخورد<sup>۱۵</sup> واحد کنترل روبشگر برای ثابت نگه داشتن فاصله بین سوزن پیپتی و نمونه (با اعمال ولتاژ مناسب به پیزو Z در طول روبش) مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۲-ب). بنابراین، مسیر حرکت سوزن از توپوگرافی سطح پیروی می‌کند. می‌توان طی اندازه‌گیری از مدولاسیون AC برای پایداری بیش‌تر بهره برد. شکل (۲-ت) نمودار تغییرات جریان یونی بر حسب فاصله رانشان می‌دهد.



شکل ۲: چگونگی کار SICM و تغییرات جریان یونی با تغییر فاصله پروب میکروپیپت نسبت به سطح نمونه [۹].

تغییرات هدایت را می‌توان با اعمال یک ولتاژ ثابت و اندازه‌گیری جریان تولید شده و یا اندازه‌گیری ولتاژ مورد نیاز برای برقراری جریان ثابت، تعیین نمود. معمولاً در اندازه‌گیری‌های الکتروفیز یولوژی از هر دوی این حالت‌ها استفاده می‌شود. این حالت‌ها به ترتیب با نام حالت‌های جریان - کنترل<sup>۱۶</sup> و ولتاژ - کنترل<sup>۱۷</sup> شناخته می‌شوند. در این حالت‌ها می‌توان جریان یا ولتاژ را به صورت ثابت یا پالسی اعمال کرد. ممکن است الکتروود بر اثر اعمال جریان ثابت دچار رانش شود که می‌توان برای جلوگیری از آن از جریان‌های پالسی که شرایط پایدارتری را فراهم می‌کنند، استفاده نمود. به هر حال این روش دارای معایبی نیز است، به علت ظرفیت الکتریکی الکتروودها، شارژ خازن پیش از تشخیص ارتفاع پالس، کامل می‌شود. با توجه به این واقعیت که ثابت زمانی خازن ( $\tau$ ) دارای رابطه خطی با مقاومت ( $R$ ) الکتروود است، بدست آوردن تصاویر با توان تفکیک بالا در حالت استفاده از جریان ثابت آهسته‌تر است [۳].

روش دیگر برای حل مشکل پایداری، به‌ویژه برای تصاویر با توان تفکیک بالا، استفاده از مدولاسیون موقعیت ( $Z$ ) الکتروود است. در این حالت، بعد از این که نوک الکتروود کاملاً به نمونه مورد روبش نزدیک می‌شود، تغییرات هدایت در برابر زمان به صورت سینوسی شده و می‌تواند از طریق تقویت کننده قفل شونده<sup>۱۸</sup> مورد شناسایی قرار گیرد. این حالت به دلیل بزرگ بودن نسبت سیگنال به نویز تقویت کننده قفل شونده، می‌تواند تغییرات بسیار کوچک هدایت را نیز تشخیص دهد. علاوه بر این، برای دستیابی به تصاویر با توان تفکیک بالا، لازم است از الکتروودهایی با قطر دهانه کوچک استفاده شود. هنگامی که هدایت در فاصله تقریباً برابر با قطر دهانه نوک الکتروود از سطح نمونه شروع به تغییر می‌کند، در صورت استفاده از میکرو الکتروودهایی با قطر دهانه کوچک، تشخیص تغییرات هدایت از طریق تقویت کننده قفل شونده واقعاً مؤثر خواهد بود [۳].

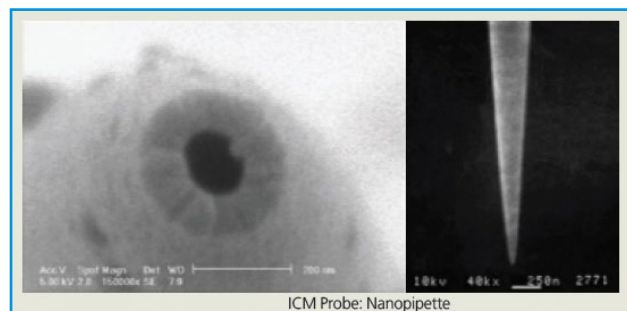
پس از این که پروب برای نخستین بار به صورت موفقیت‌آمیز به سطح نمونه نزدیک شد، می‌توان روبش جانبی را با روش‌های مختلف اجرا نمود. از جمله می‌توان حالت «فاصله ثابت» را نام برد؛ به این ترتیب که الکتروود به صورت جانبی جابه‌جا می‌شود و موقعیت ( $Z$ ) به‌گونه‌ای تنظیم می‌شود که همان هدایت یک مرحله قبل بدست آید. این روش خیلی سریع بوده و از توان تفکیک بالایی برخوردار است. پله‌های حرکت جانبی باید کوچک باشند تا از برخورد الکتروود با شیب‌های شدید نمونه اجتناب شود. با استفاده از سوزن کوچک که می‌تواند به کوچکی ۲۵ نانومتر باشد و نیز با تلفیق آن با پله‌های کوچک می‌توان تصویرهایی با توان تفکیک بالا تهیه نمود. برای به‌دست آوردن تصویر تمام سلول‌ها، حالت فاصله ثابت نمی‌تواند بخش‌های آویزان غشاء را که در فاصله‌های بیش‌تری از کف ظرف کشت قرار دارند، آشکار کنند؛ این امر باعث وارد آمدن خسارت به سلول و شکسته شدن نوک ظریف الکتروود شیشه‌ای می‌شود (شکل ۴-الف). برای حل این مشکل حالت کاری «قدم به عقب»<sup>۱۹</sup> ارائه شد که امکان آشکار کردن این نواحی را قبل از برخورد میله الکتروود با شیب‌های تند غشاء فراهم می‌کند. چگونگی کار این حالت بدین ترتیب است که بعد از ثبت موقعیت ( $XYZ$ )، الکتروود با یک فاصله از پیش تعیین

میکروسکوپ هدایت یونی روبشی بدون تماس فیزیکی و اعمال نیرو بر سطح نمونه غوطه‌ور در مایع کار می‌کند. از آن جا که فاصله سوزن - نمونه، با ثابت نگه داشتن جریان یونی از طریق سیستم بازخورد، ثابت نگه داشته می‌شود، SICM دستگاه بسیار مناسبی برای مطالعه نمونه‌های بیولوژیکی نرم و چسبنده غوطه‌ور در مایع است [۹و].

SICM همچنین می‌تواند نقشه جریان‌های یونی موضعی بالای سطح نمونه را فراهم کند. این نکته در تصویربرداری جریان‌های یونی که از میان کانال‌های غشایی می‌گذرند، مفید است [۱۰].

### تهیه میکروپیپت

برای تهیه میکروپیپت استاندارد می‌تواند برای اندازه‌گیری مشخصات سلولی در روش SICM استفاده شود، روش ساده‌ای وجود دارد. برای این منظور می‌توان از دستگاه تجاری برای کشیدن میکروپیپت استفاده نمود. لوله‌های موئین شیشه‌ای (با قطر خارجی ۲ mm و قطر داخلی ۱ mm) به دو انتهای دستگاه متصل شده و وسط آن به صورت الکتریکی حرارت داده می‌شود. سپس لوله از دو سو کشیده شده و بدین ترتیب، دو میکروپیپت بدست می‌آید. اندازه قطر دهانه میکروپیپت را می‌توان با استفاده از میکروسکوپ نوری تخمین زد. معمولاً قطر دهانه در حدود ۱  $\mu\text{m}$  و قطر خارجی آن ۲  $\mu\text{m}$  است. میکروپیپت با استفاده از ویژگی موئینگی با محلول KCl یک مولار پر می‌شود. سل مایع نیز با محلول KCl یک مولار پر می‌شود تا از اختلاف غلظت جلوگیری شود. از دو الکتروود AgCl در داخل پیپت و حمام به‌عنوان الکتروود استفاده می‌شود. معمولاً ولتاژ ۱۰۰ mV و جریان ۱۰۰ nA بین الکتروودها برقرار می‌شود [۱۱]. در شکل (۳) تصویر یک میکروپیپت شیشه‌ای با قطر خارجی ۸۰-۱۰۰ nm و قطر داخلی ۳۰-۵۰ nm نشان داده شده‌است که در SICM به‌عنوان پروب استفاده می‌شود [۹].



شکل ۳: تصویر یک میکرو پیپت شیشه‌ای که در SICM به‌عنوان پروب استفاده می‌شود [۹].

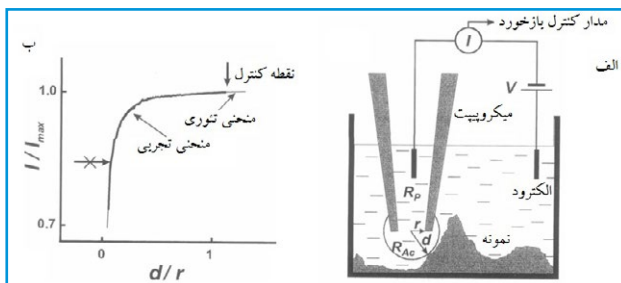
### حالت‌های کاری SICM

با توجه به این که هدایت با رابطه ساده اهم بدست می‌آید:

$$G = R^{-1} = I \cdot V^{-1} \quad (1)$$

شکل فرض می‌شود و شعاع قاعده آن، شعاع لوله‌ای شیشه‌ای از محلی است که میکروپیپت کشیده شده‌است، شعاع نوک پیپت ( $r$ ) همان شعاع دهانه پیپت بوده و ارتفاع آن به اندازه ارتفاعی است که سوزن میکروپیپت از الکترولیت پر شده‌است. مقاومت دهانه به صورت مقاومت مسیره‌های همگرا از حمام الکترولیت به دهانه میکروپیپت تعریف می‌شود. این تعریف اغلب توسط دانشمندان علم الکتروفیزیولوژی که کانال‌های یونی را مطالعه می‌کنند، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

موقعیت سوزن میکروپیپت نسبت به سطح نمونه، مقاومت دهانه ( $R_{AC}$ ) و در نتیجه جریان یونی ( $I$ ) را که از میان پیپت جریان می‌یابد، تحت تاثیر قرار می‌دهد. شکل (۵) نمایی از این روش و موقعیت سوزن نسبت به سطح نمونه و مقایسه مقدار مورد انتظار برای جریان ( $I$ ) و مقدار واقعی آن را به صورت تابعی از فاصله سوزن - نمونه ( $d$ ) نشان می‌دهد [۱۲].



شکل ۵: (الف) برهم‌کنش سوزن میکروپیپت / سطح نمونه و (ب) نمودار عملکرد میکروسکوپ روبشی هدایت یونی [۱۲].

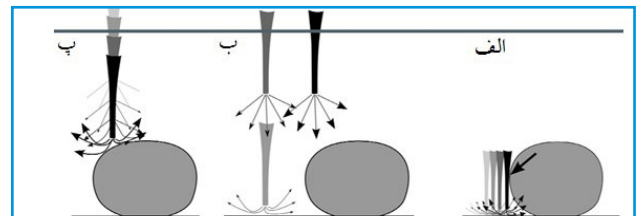
مقدار جریان در فاصله ( $d$ ) که بسیار بزرگتر از شعاع ( $r$ ) است، می‌تواند برای کنترل موقعیت عمودی سوزن و مشاهده ساختارهای مجاور که ارتفاعشان بزرگتر از فاصله سوزن - پروب است، استفاده شود. در طول روبش، نوک پیپت و «حسگر کروی جریان» با شعاع ( $d$ ) بدون آسیب رساندن به سطح نمونه، روی آن حرکت می‌کند. منحنی (ب)، مقایسه مقدار مورد انتظار برای جریان ( $I$ ) و مقدار واقعی آن را به صورت تابعی از فاصله سوزن - نمونه ( $d$ ) نشان می‌دهد. منحنی تئوری براساس مدل ساده سوزن با شکل مخروط ناقص در حالی که به سطح صاف و نارسانای نمونه نزدیک می‌شود، محاسبه شده‌است. داده‌های تجربی ساختار هندسی مشابهی را برای سوزن نشان می‌دهند. پیکان عمودی، مقدار جریان (نقطه کنترل) مورد استفاده برای روبش در مدار کنترل بازخورد را نشان می‌دهد [۱۲].

معمولاً ( $R_{AC}$ ) تابع پیچیده‌ای از فاصله بین نمونه و پروب ( $d$ )، ویژگی‌های هندسی و الکتروشیمیایی سطح نمونه است. چنانچه بین دو الکترود SICM ولتاژ ( $V$ ) برقرار شود، جریان ( $I$ ) که از پیپت می‌گذرد به طور مستقیم اندازه‌گیری و به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$I = \frac{V}{R_p + R_{AC}(d)} \quad (2)$$

که در آن: ( $V$ ) ولتاژ اعمال شده بین دو الکترود، ( $R_p$ ) مقاومت

شده به عقب برگشته (قدم به عقب)، به صورت جانبی جابه‌جا می‌شود (شکل ۴-ب) و سرانجام دوباره برای تعیین نقطه بعدی تغییر هدایت، به سطح نمونه نزدیک می‌شود (شکل ۴-پ). این روش، زمان زیادی نیاز دارد زیرا نوک الکترود باید فاصله بسیار زیادی را طی کند. برای صرفه‌جویی در زمان روبش، «حالت قدم به عقب شناور» معرفی شد. در این روش، ابتدا سطح با توان تفکیک جانبی کم ( $3 \mu m$ ) روبش می‌شود. با مقایسه مقادیر متوالی ( $Z$ )، نرم‌افزار به صورت خودکار نواحی با شیب تند در محور ( $Z$ ) را که نیاز به قدم به عقب بزرگ دارند، تشخیص می‌دهد. طی روبش بعدی که با توان تفکیک بالا صورت می‌گیرد، این قدم به عقب‌های بزرگ، فقط برای مناطقی که شیب‌های تندتری دارند استفاده می‌شود و برای مناطقی که تغییر ارتفاع کمی دارند، از قدم به عقب‌های کوچک‌تر استفاده می‌شود. این روش، میزان قدم به عقب‌های بزرگ را بسته به زبری نمونه، تا حدود ۳۰ درصد کل سطح، کاهش می‌دهد [۳].



در حالت فاصله ثابت، پروب قادر به آشکارسازی نواحی غشایی آویزان نیست بنابراین ممکن است با نمونه برخورد کند. در حالت قدم به عقب، الکترود بعد از نزدیک شدن به سطح (الکترود خاکستری روشن)، به اندازه یک پله از قبل تعیین شده، به عقب کشیده می‌شود (خاکستری متوسط) و بعد به صورت جانبی جابه‌جا می‌شود (الکترود سیاه). (پ) به دنبال قدم به عقب، الکترود دوباره برای روبش نمونه به سطح نزدیک می‌شود، بدون این که آسیب ببیند [۳].

## اصول محاسباتی SICM

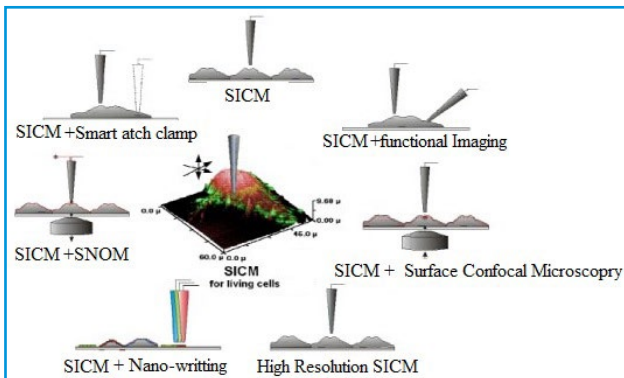
در این بخش اساس تئوری محاسبات جریان یونی که در دستگاه SICM از نوک میکروپیپت جریان می‌یابد و همچنین چگونگی تغییر آن با تغییر فاصله سوزن / نمونه که در درک صحت تصاویر بدست آمده از SICM حائز اهمیت است، توضیح داده می‌شود.

مقدار جریان یونی ( $I$ ) که از میکروپیپت جریان می‌یابد، به شدت به موقعیت نوک پروب نسبت به سطح نمونه وابسته است. این جریان که در حلقه بازخورد<sup>۲۱</sup> برای کنترل موقعیت عمودی سوزن مورد استفاده قرار می‌گیرد، مطابق شکل (۵)، تابع مقاومت کلی سوزن است. این مقاومت خود، ترکیبی از مقاومت میکروپیپت ( $R_p$ ) و مقاومت دهانه باز میکروپیپت ( $R_{AC}$ ) است. مقاومت پیپت را به سادگی می‌توان به صورت مقاومت الکترولیت داخل پیپت در نظر گرفت ولی پیدا کردن عبارتی ساده برای بیان مقاومت دهانه باز میکروپیپت کار دشواری است. برای این منظور، سوزن پیپت به صورت یک مخروط ناقص از یک مخروط راست با قاعده دایره‌ای

جدید، ادامه دارد [۱۳ و ۱۲].

### کاربردهای SICM

میکروسکوپ روبشی هدایت یونی به همراه مجموعه‌ای از روش‌های وابسته، به دلیل توان تفکیک جانبی و امکان تلفیق با دیگر روش‌های بررسی دینامیکی که برای سلول‌های زنده فراهم می‌کنند، به‌عنوان روشی ارزشمند برای مطالعه رفتار نانویی سلول‌های زنده سالم و بیمار استفاده می‌شود. در شکل (۶)، خانواده‌ای از روش‌هایی که توسط این گروه گسترش داده شده مشاهده می‌شود [۱۴].

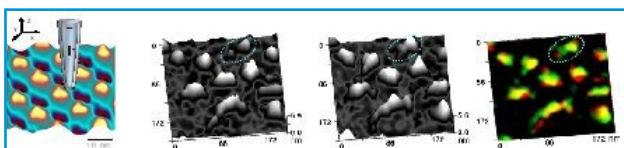


شکل ۶: خانواده‌ای از میکروسکوپ روبشی هدایت یونی و روش‌های وابسته [۱۴].

این روش‌ها برای انواع بسیار متنوعی از سلول‌ها و بافت‌ها قابل استفاده بوده و برای فیزیولوژی، غدد مترشحه داخلی و ویروس‌شناسی عصب، قلب و نطفه به کار برده می‌شود. پیشرفت‌های کلیدی که در این زمینه روی داده است، عبارتند از:

الف. توسعه یک سیستم منحصر به فرد غیرتماسی برای تصویربرداری دینامیکی سطوح سلول زنده تا حد ترکیبات پروتئینی منفرد. این روش بر پایه روبش یک نانوپیت استوار است که از بازخورد هدایت یونی برای ثابت نگه داشتن فاصله پیت - نمونه استفاده می‌کند. به این ترتیب می‌توان سلول‌های زنده را بدون نیاز به تثبیت و رنگ کردن، با توان تفکیک بالا بررسی کرد. بر این اساس، بررسی‌های زیر امکان‌پذیر می‌شود [۱۴]:

تهیه تصویر از ترکیبات پروتئینی روی یک سلول زنده که نمونه‌ای از آن در شکل (۷) نشان داده شده‌است.



شکل ۷: تصویر تهیه شده از پروتئین یک سلول زنده به روش SICM [۱۴].

تعیین دینامیک میکروویلی و بررسی چگونگی عملکرد آنها به‌عنوان واحدهای ساختمانی برای تولید ساختارهای پیچیده‌تر.

تهیه تصویر با توان تفکیک بالا در حالت جهشی. در شکل

خود میکروپیت، (d) فاصله بین نمونه و سوزن و  $(R_{AC})$  مقاومت دهانه باز پیت است.  $(R_p)$  ثابت است و می‌تواند به‌صورت مقاومت الکترولیت داخل پیت محاسبه شود، ولی همان‌طور که اشاره شد، یافتن عبارت محاسباتی مناسب برای  $(R_{AC})$  دشوار است.

رابطه فوق را می‌توان برای مدل ساده‌ای که در آن سوزن به سطح صاف و نارسای نمونه نزدیک می‌شود، به‌صورت عددی حل کرد. مدل نشان داده شده در شکل (۵-ب)، تطابق خوبی بین داده‌های تجربی و منحنی تئوری محاسبه شده برای ساختار هندسی پیت برقرار می‌کند. محور عمودی جریان نرمال شده را نشان می‌دهد  $(I_{max})$  جریان برقرار شده به هنگام دور بودن سوزن از سطح نمونه است. محور افقی فاصله بین سوزن - نمونه را به‌صورت  $(r)$  نشان می‌دهد. پیکان مشخص شده با علامت ضربدر ناحیه‌ای را مشخص می‌کند که موقعیت پروب نسبت به سطح نمونه به‌گونه‌ای است که جریان یونی را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد. هنگامی که این جریان به‌عنوان جریان اولیه در حلقه بازخورد انتخاب می‌شود، می‌تواند موقعیت افقی سوزن را با حساسیت بیشتری کنترل نماید. به هر حال، باید توجه داشت که نوک پروب بسیار به سطح نمونه نزدیک است و بنابراین نسبت به ساختارهای جانبی که بلندتر از فاصله بین نمونه - سوزن هستند، دارای حساسیت محدودی است. حین فرایند روبش با این جریان اولیه، نوک پیت ممکن است بشکند یا باعث آسیب دیدن نمونه شود. برای جلوگیری از این امر بسیار ضروری است که جریان اولیه‌ای که برای حلقه بازخورد تنظیم می‌شود، به مقادیری که در آن مقدار فاصله (d) بیش از  $(r)$  است، تغییر داده شود (شکل ۵). این وضعیت یک حالت «حسگر کروی» با قطر (d) را بوجود می‌آورد که می‌تواند سطح نمونه را بدون آسیب رساندن به آن و یا شکسته شدن پیت، روبش کند.

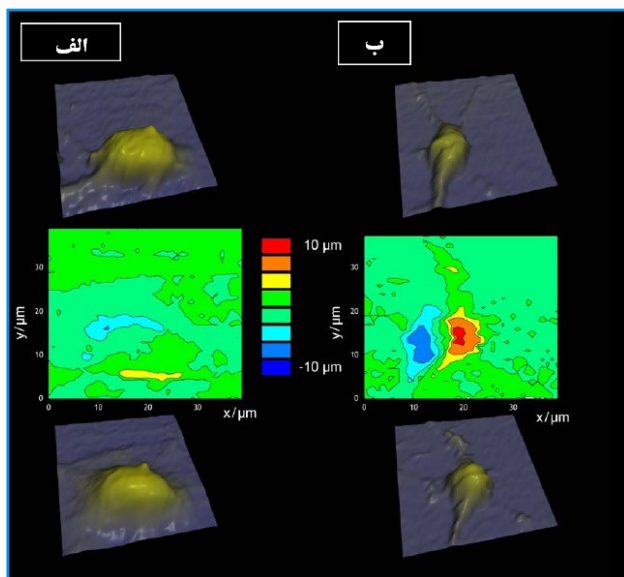
به هر حال، عبارت  $(R_{AC})$  که توسط کورچف و همکارانش به‌صورت یک تابع پیچیده از فاصله (d) بین نمونه و نوک پروب، هندسه و ویژگی‌های سطح نمونه تعریف شد، نتوانست در مدل‌های پیچیده‌تر پیش‌بینی‌های محاسباتی را به‌طور کامل انجام دهد. بعد از او، مال ۲۳ تشریح نمود که چگونه می‌توان مقاومت مدخل یک حفره دایره‌ای شکل کوچک را محاسبه نمود.

این کار با مدل‌سازی نوک پیت به‌صورت یک نیم کره با شعاع دهانه باز پیت انجام می‌شود. بر این اساس مقدار مقاومت ساده شده  $(R_{AC})$  را می‌توان به‌صورت زیر بیان نمود:

$$R_{AC} = \frac{\rho}{4a} \quad (۳)$$

که در آن: (a) شعاع نوک میکروپیت و  $(\rho)$  مقاومت ویژه محلول الکترولیت است.

به هر حال عبارت‌های ریاضی روشن و ساده‌ای که بتوانند مقاومت دهانه و جریان یونی را در این روش میکروسکوپی به خوبی بیان کنند، هنوز یافت نشده‌است و همچنان تلاش برای دستیابی به عباراتی که شرایط حاکم در روش SICM را به خوبی پوشش دهند، با بکارگیری تقریب‌ها و شبیه‌سازی‌های



شکل ۱۰: مقایسه حرکت سل بالغ (الف) و نارس (ب) مغز موش. ناحیه روبش ۴۰ میکرون در ۴۰ میکرون، اندازه پله: ۱ میکرون (جانبی) و ۱۰۰ نانومتر (عمودی). زمان بین دو روبش، ۷۰ دقیقه. تفاوت رنگ تصویرها نشان می‌دهد که سل نارس، تحرک بیش‌تری نسبت به سل بالغ داشته است [۳].

از روش میکروسکوپی روبشی هدایت یونی برای مطالعه فیبرهای آمیلوئیدی در مقیاس نانو استفاده شده است. ژنگ<sup>۲۷</sup> و همکارانش مورفولوژی 3D فیبرهای آمیلوئیدی را با استفاده از SICM نشان دادند. این روش قادر به بررسی پروتئین‌ها با توان تفکیک در مقیاس نانو است. SICM می‌تواند ارتفاع قطعات پروتئین آمیلوئیدی را با دقت اندازه‌گیری کند. این ویژگی، امکان بررسی منحصر به فرد سازوکار جوانه‌زنی و رشد آمیلوئید خودآرا<sup>۲۸</sup> را فراهم می‌آورد [۱۵].

از دیگر کاربردهای روش SICM، مشاهده و تهیه تصویر از سلول و غشاء سلولی است. غشاء سلول به‌عنوان یکی از مهم‌ترین قسمت‌های یک سلول، بیش‌ترین فعالیت سلولی را داشته و تنها ساختار سلولی است که در همه انواع سلول‌ها در ارگانسیم‌های زنده یافت می‌شود. اما، مشاهده غشاء سلول در مقیاس نانومتری، بسیار مشکل است. به ویژه این‌که شفافیت غشاء، مشاهده آن را با میکروسکوپ نوری عملاً غیرممکن می‌سازد. روش SICM باعث بوجود آمدن تحولی اساسی در این حوزه از دانش شده و تهیه تصویر از غشاء سلولی را امکان‌پذیر نموده است [۹].

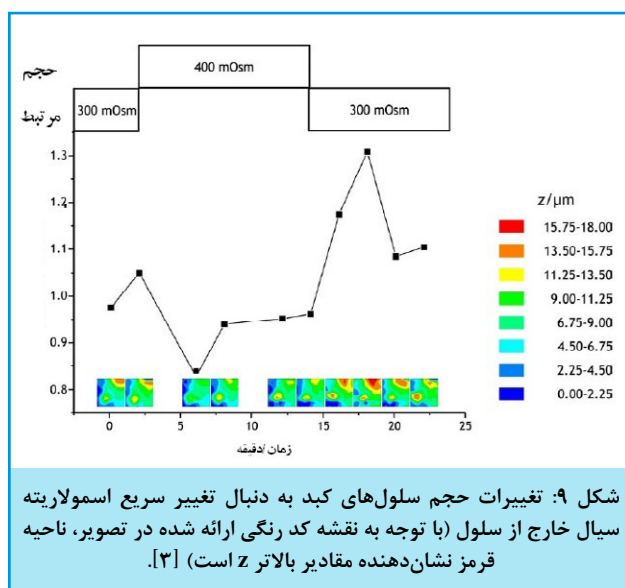
از روش SICM برای تحریک محلی و نمایش فعالیت سلول نیز استفاده شده است. برای این منظور از یک پیپت پر شده از مایع استفاده می‌شود. این روش در عین حالی که برای تصویربرداری از نمونه‌های زیستی نرم در مایع، از قبیل سلول‌های زنده ایده‌آل است، به راحتی هم می‌تواند برای تحریک کیفی و کمی بیوشیمی سلول‌های منفرد و مطالعات تحرک سلولی<sup>۲۹</sup> استفاده شود. این کاربردها شامل تحریک موضعی و نمایش انتقال دارو در سلول است که نمای آن در شکل (۱۱) نشان داده شده است. در تحریک موضعی، سلول با اعمال یک فشار موضعی از طریق حفره پیپت، وادار به حرکت شده و به دنبال آن از عکس‌العمل سلول تصویربرداری می‌شود. به علاوه، از قابلیت‌های این روش می‌توان برای مطالعه

(۸)، تصویر یک سلول جهش یافته نشان داده شده است.



شکل ۸: تصویر یک سلول جهش یافته [۱۴].

توسعه یک مدل در شرایط آزمایشگاهی<sup>۲۴</sup> از اختلال ریتم در قلب و مطالعه تأثیر اسید صفرا روی کارکرد میوسیت قلب. روش میکروسکوپی SICM امکان بررسی تغییر شکل سلول‌های زنده را میسر می‌سازد. در شکل (۹) چگونگی عملکرد روش میکروسکوپی SICM برای بررسی تغییرات حجم ناشی از تغییرات اسمولاریته طی چند دقیقه، نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که این روش از سرعت عمل کافی برخوردار بوده و می‌تواند این تغییرات را به خوبی ثبت کند. برای به دست آوردن توان تفکیک زمانی بهتر، توان تفکیک جانبی روبش‌ها به ۶۴ نقطه در ناحیه‌ای به اندازه ۳۰ میکرون در ۳۰ میکرون کاهش یافته است. با این تنظیمات، به‌طور معمول حدود ۲ دقیقه برای کامل کردن یک روبش نیاز است که برای اندازه‌گیری کمی تغییرات حجم ناشی از تنش اسموتیک، به اندازه کافی سریع است [۳].



شکل ۹: تغییرات حجم سلول‌های کبد به دنبال تغییر سریع اسمولاریته سیال خارج از سلول (با توجه به نقشه کد رنگی ارائه شده در تصویر، ناحیه قرمز نشان‌دهنده مقادیر بالاتر z است) [۳].

روش SICM می‌تواند برای مشاهده حرکت‌های سلولی نیز استفاده شود. در شکل (۱۰)، حرکت سلول مغزی موش بالغ و نابالغ به کمک روش SICM به تصویر کشیده شده و مورد مقایسه قرار گرفته است. همان‌طور که انتظار می‌رود، بعد از دو روبش متوالی در فاصله ۷۰ دقیقه، الیگودندروسیت بالغ<sup>۲۵</sup> مغز موش، جابه‌جایی کم‌تری داشت در حالی که سلول نابالغ<sup>۲۶</sup> چندین میکرومتر حرکت کرده بود. روش SICM با فراهم کردن اطلاعات سه‌بعدی در مورد شکل سلولی طی مهاجرت روی بسترهای تخت، به کشف جنبه‌های ناشناخته از تغییرات سطح غشاء طی مهاجرت سلولی، کمک می‌کند [۳].

امکان ثبت فعالیت کانال تک یونی با دقت مولکولی در موقعیت‌های مشخص روی سطح سلول، شامل ناحیه‌هایی نظیر سیناپس نورون‌های دندریتی که تاکنون غیرقابل دسترس بوده‌اند، بر این اساس نتایج زیر به دست آمده است [۱۴]:

تهیه نقشه از توزیع کانال‌های یونی روی میوست‌های قلب که سازوکار احتمالی فعالیت ساختار - کارکرد را آشکار می‌سازد؛  
شناسایی سازوکار احتمالی برای فعالیت آلدوسترون روی سلول‌های کلیه.

پ. ترکیبی از تصویربرداری توپوگرافی با توان تفکیک بالا با دو رنگ فلورسانس برای تهیه هم‌زمان نقشه توپوگرافی و تصویر فلورسانس پروتئین‌های خاص. این روش در مطالعه‌های زیر استفاده شده است [۱۴]:

تعقیب هم‌زمان  $Ca^{2+}$  ورود ویروس و شناسایی مسیر ورود ویروس به سلول‌های زنده؛

تعقیب مسیرهای اندوسیت؛

مشاهده دینامیک غشاء و  $Ca^{2+}$ .

ت. کنترل تحویل مولکول‌های کوچک، پروتئین‌ها و آنتی‌بادی‌ها به موقعیت‌های مشخص روی سطح سلول. به این ترتیب می‌توان رنگ کردن ترکیبات پروتئینی برای مطالعه نفوذ سطحی مولکول‌ها با دقت اندازه مولکولی، یا هر نوع دیگری از دستکاری سلول، را به حداقل رسانید. با استفاده از این روش مطالعات زیر انجام شده است [۱۴]:

کنترل رسوب مولکول‌های بیولوژیکی با استفاده از نانوپیت برای ترکیب مونتاژ از بالا به پایین و پائین به بالای ساختارهای جدید و تشکیل نانوآرایه‌های مولکول‌های بیولوژیکی؛  
توسعه روش جدید اندازه‌گیری مکانیکی غیرتماسی.

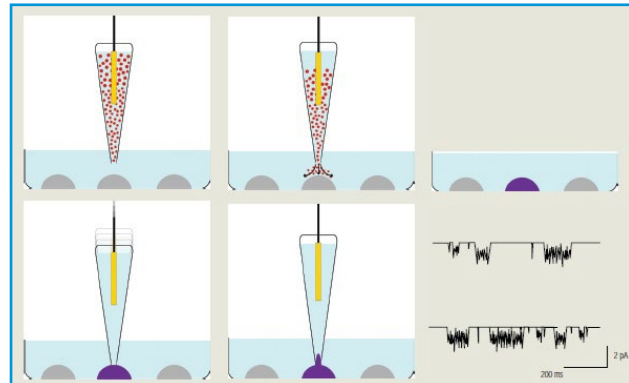
### پیشرفت‌ها و مزایای روش SICM

پیشرفت‌هایی که در حالت‌های کاری SICM روی داده است، امکان بررسی تغییرات توپوگرافی سلول زنده، اندازه‌گیری تغییر حجم سلول‌های متورم، انقباض سلول‌های قلب، الکتروفیزیولوژی سلول‌های قلب و تعیین موقعیت سلول که در مقابل محرک عکس‌العمل نشان می‌دهد، را فراهم نموده است [۱۶].

میکروسکوپ روبشی هدایت یونی ابزاری ایده‌آل برای مطالعه و بررسی سلول‌های زنده و باکتری‌ها در شرایط فیزیولوژیکی، ویروس‌ها، غشاءها، سطوح نرم از قبیل پلیمرها و لیپیدها، الکتروفیزیولوژی، عصب‌ها، کاربردهای دندان / استخوانی، بیولایه‌ها و خوردگی است.

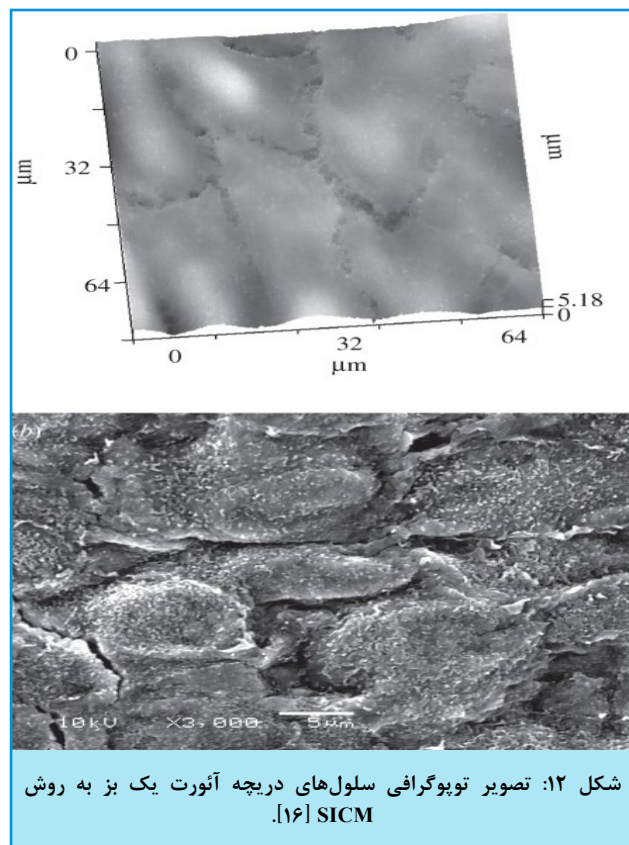
همچنین امکان تهیه تصاویر سه‌بعدی با توان تفکیک بالا و در مقیاس نانو از سلول‌های زنده و مواد نرم در محلول و عدم نیاز به ثابت کردن نمونه، کاربری آسان و عدم نیاز به تنظیم لیزر، مشاهده دینامیک سلولی با توان تفکیک بالا طی مدت زمان‌های طولانی و تهیه هم‌زمان فلورسانس و تصویر سطح طی یک روبش از دیگر مزایای این روش هستند. این روش قابلیت تلفیق با روش‌های دیگر را نظیر میکروسکوپ‌های نوری/هم‌کانون نیز دارا است [۴].

دینامیک سلول زنده در واکنش به تحریک شیمیایی یا دارویی موضعی، برای رسیدن به الکتروفیزیولوژی دقیق کنترل شده در مقیاس نانو، بهره جست. هم‌اکنون محققان حوزه پژوهشی سلول منفرد می‌توانند با بهره‌گیری از توانمندی‌های روش SICM، دانش انتقال دارو در زیست‌شناسی سلولی را کاملاً متحول سازند [۹].



شکل ۱۱: نمای فرایند تحریک موضعی سلول با اعمال فشار کنترل شده از میان حفره پیت (که سطح شیشه‌ای آن می‌تواند مطابق نیاز کاربر عامل‌دار شود) و مشاهده عکس‌العمل سلول [۹].

در مطالعه دیگری، سلول‌های ایندوتلیال  $Ca^{2+}$  در ریچه آئورت به روش درجه ۳۱ مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه در درک پاتوفیزیولوژی و شناخت درمان احتمالی آن بسیار ارزشمند است. در شکل (۱۲)، تصویر توپوگرافی تهیه شده از سلول‌های سازنده در ریچه آئورت یک بز به روش SICM نشان داده شده است. در این تصویر، اندازه سلول‌ها و جهت‌گیری آنها به وضوح قابل مشاهده است [۱۶].



شکل ۱۲: تصویر توپوگرافی سلول‌های در ریچه آئورت یک بز به روش SICM [۱۶].

روش SICM تهیه تصویر با توان تفکیک بالا بدون تماس با سطح عایق نمونه‌ی غوطه‌ور در مایع را فراهم می‌کند؛ بنابراین، برای مطالعه سلول‌های زنده و مواد نرم، بسیار مناسب است. برخلاف AFM که از تیرک به‌عنوان پروب استفاده می‌کند، از یک پیپت شیشه‌ای یا کوارتزی که قطر داخلی نوک آن به ترتیب ۸۰-۱۰۰ nm و ۳۰-۵۰ nm است، بهره می‌برد و مانند میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی در هوا، میکروسکوپ هدایت یونی روبشی نیز بدون تماس فیزیکی و اعمال نیرو بر سطح نمونه غوطه‌ور در مایع کار می‌کند. از آن جا که فاصله سوزن - نمونه، با ثابت نگه داشتن جریان یونی از طریق سیستم بازخورد، ثابت نگه داشته می‌شود، SICM دستگاه بسیار مناسبی برای مطالعه نمونه‌های بیولوژیکی نرم و چسبنده غوطه‌ور در مایع است و می‌توان فرآیندهای بیولوژیکی را در حال کار مشاهده کرد. برخلاف میکروسکوپ نوری که فقط قادر به نمایش تغییر شکل در دو بعد است، SICM می‌تواند با فراهم کردن داده‌های کمی سه‌بعدی در سطح سلولی یا زیرسلولی، برای بررسی تغییر شکل سلول‌های زنده نیز به کار رود. توان تفکیک بسیار بالای این روش به محقق اجازه می‌دهد نواحی مختلف سلول از جمله بدنه سلول، آماس‌های عصبی و نواحی سطحی تشخیص داده شوند [۳].

## پی‌نوشت

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران
۲. دکتری مواد و متالورژی، دانشگاه امیرکبیر
۳. کارشناس ارشد شیمی تجزیه، پژوهشگاه صنعت نفت
۴. کارشناس ارشد شیمی فیزیک، پژوهشگاه صنعت نفت
۵. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ روبشی پیمایشی شبکه آزمایشگاهی

6. Atomic-force microscopy (AFM)
7. Icon conductance microscopy (ICM)
8. Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM)
9. Hansma
10. Scanning Probe Microscope (SPM)
11. Tapping
12. Y. E. Korchev
13. Melanocytes
14. Gorelik
15. Feedback
16. Current-clamp
17. Voltage-clamp
18. Lock-in amplifier
19. Backstep
20. Floating backstep
21. Feedback loop
22. Hall
23. Hopping
24. In-vitro
25. Differentiated oligodendrocyte
26. Mature
27. Zhang
28. Self-assembly
29. Motility
30. Endothelial
31. In-situ
32. real-time



- [1] [http://www.parkafm.com/AFM\\_guide/spm\\_modes\\_6](http://www.parkafm.com/AFM_guide/spm_modes_6), park systems corp. Date retrived: 05,08,2012.
- [2] The free encyclopedia, Date retrived: 05,08,2012.
- [3] P. Happel, F. Wehner and I. D. Dietzel, Scanning ion conductance microscopy—a tool to investigate electrolyte-nonconductor interfaces, Modern Research and Educational Topics in Microscopy, FORMATEX 2007, 968-975.
- [4] Shuai Zhang, Sang-Joon Cho, Katerina Busuttill, Chen Wang, Flemming Besenbacher and Mingdong Dong, Scanning ion conductance microscopy studies of amyloid fibrils at nanoscale, Nanoscale, 2012, 4, 3105-3110, DOI: 10.1039/C2NR12049F.
- [5] Hansma, P.; Drake, B; Marti, O; Gould, S.; Prater, C. (1989). "The scanning ion-conductance microscope". Science 243 (4891): 641–3. doi:10.1126/science.2464851. PMID 2464851.
- [6] Y.E. Korchev, M. Milovanovic, C.L. Bashford, D.C. Bennett, E.V. Sviderskaya, I. Vodyanoy and M.J. Lab, Journal of Microscopy 188, 17 (1997).
- [7] Y.E. Korchev, C.L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy and M.J. Lab, Biophysical Journal 73, 653 (1997).
- [8] "Ion Channels in Small Cells and Subcellular Structures Can Be Studied with a Smart Patch-Clamp System", Gorelik, Gu, Spohr, Shevchuk, Lab, Harding, Edwards, Whitaker, Moss, Benton, Sanchez, Darszon, Vodyanoy, Klenerman, Korchev. Biophysical Journal (2002): Vol. 83, 3296-3303.
- [9] <http://www.parkAFM.com>, Nanotechnology Solutions Partner.
- [10] [http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning\\_ion-conductance\\_microscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_ion-conductance_microscopy), Wikipedia.
- [11] H. Olin, Design of a scanning probe microscope, Meas. Sci. Techno! 5 (1994) 976-984. Printed in the UK.
- [12] Y. E. Korchev, C. L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy and M. J. Lab, Scanning ion conductance microscopy of living cells, Biophys J. 1997 August; 73(2): 653–658.
- [13] William Fletcher, an attempt to model ion conductance when a SICM approaches a flat surface, [abacus.gene.ucl.ac.uk/will/files/sicm.pdf](http://abacus.gene.ucl.ac.uk/will/files/sicm.pdf).
- [14] <http://www.imperial.ac.uk/departmentofmedicine/divisions/experimentalmedicine/pathology>.
- [15] Scanning ion conductancemicroscopy studies of amyloidfibrils at nanoscale, Shuai Zhang Sang-Joon Cho Katerina Busuttill Chen Wang Flemming Besenbacher Mingdong Dong, Nanoscale, 2012, 4, 3105-3110.
- [16] Michele Miragoli and et.al Scanning ion conductance microscopy: a convergent high-resolution technology for multi-parametric analysis of living cardiovascular cells, J R Soc Interface. 2011 July 6; 8(60): 913–925. Published online 2011 February 16. doi: 10.1098/rsif.2010.0597.