

**О.В.Градov  
Ф.А.Насиров  
А.А.Скрынник  
А.Г.Яблоков**

Институт энергетических проблем химической физики РАН им. В.Л.Тальрозе  
Лаборатория биологического воздействия наноструктур (005)  
Москва, Российская Федерация

**Ключевые слова:**

микроэлектроды, микроинтерферометр, микроперфузия, патч-кламп, микроманипуляция, перфузия одиночных клеток, цитоэлектрофизиологический чип.

*Надійшла:* 07.11.2017

*Прийнята:* 26.11.2017

УДК: 57.085.2+576.08+577.12+611.018.8+541.18+531.715.1

**ПРОСТОЕ МЕТОДИЧЕСКОЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЕ ДЛЯ МИКРОИНЪЕКТОРНЫХ МАНИПУЛЯЦИЙ И ИЗМЕРЕНИЙ НА ЭЛЕКТРОМОРФОЛОГИЧЕСКОМ ЧИПЕ ПРИ МИКРОИНТЕРФЕРОМЕТРИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ ИНТЕРФЕЙСНЫХ И МЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ НА ДИАПАЗОНЕ ТОЛЩИН ОТ 50 ДО 10000 АНГСТРЕМ ПОД РАЗНЫМИ УГЛАМИ**

**Реферат.** Микроманипуляции, перфузии и измерения, проводимые с использованием стеклянных микроэлектродов, являются классической техникой экспериментально-морфологических и мембранно-электрофизиологических исследований на уровне отдельных клеток и мембранных поверхностей. Стандартный (эффективный) диаметр стеклянного микроэлектрода в оконечной области составляет от 500 нм до менее, чем 100 нм, что препятствует использованию стандартных оптических микроскопов для его наблюдения. Нами предлагается конфигурация установки для микроперфузии, микроманипуляции и микроэлектродных измерений с интерферометрическим контролем процессов на интерфейсе клеток и капилляров/электродов.

**Morphologia.** – 2017. – Т. 11, № 4. – С. 7-17.

© О.В.Градov, Ф.А.Насиров, А.А.Скрынник, А.Г.Яблоков, 2017

✉ neurobiophys@gmail.com

**Gradov O.V., Nasirov F.A., Skrynnik A.A., Jablovkov A.G. A simple device for microinjections, manipulations and measurements using an electromorphological chip under microinterferometric control of the interface and membrane processes at the thickness range of 5-1000 nm at different angles.**

**ABSTRACT.** Micromanipulations, perfusions and measurements performed using glass microelectrodes filled with an electrolyte is a conventional technique for experimental morphological and membrane electrophysiological studies at a single cell and membrane surface level. The typical (effective) diameter of the end of the glass microelectrode is from 500 up to less than 100 nm, which prevents one from observing it using a standard optical microscope in accordance with the optical resolution criteria, since the diameter less than 500 nm is indistinguishable within the interference zone. Microprocessor programming of the puller (microforge) that provides pulling and tearing allows to obtain in certain regimes the adjusted diameter and shape of the micropipette tip, although this result is not fully controlled due to the above limitations. In this connection it is necessary to design the control devices for the micropipette tips both at the preparation and operation stages (intracellular or extracellular insertion). This method also should provide visualization of the processes occurring upon interaction of the microelectrode tip with the cell in real time, depending on the electrode type and state, which allows to level the artifacts arising with the systematic error frequency from the uncontrolled operation of the micropipette tip after different ways of the microelectrode filling with the electrolyte. We propose an installation scheme that solves the above problems by means of introducing an interferometric device for microscopic control of the microelectrode and micromanipulator or microperfusor, for the first time for a given type of optical instruments combined with the interferometric optical scheme.

**Key words:** microelectrodes, microinterferometer, microperfusion, patch-clamp, micromanipulation, single cell perfusion, cytoelectrophysiological chip.

**Citation:**

Gradov OV, Nasirov FA, Skrynnik AA, Jablovkov AG. [A simple device for microinjections, manipulations and measurements using an electromorphological chip under microinterferometric control of the interface and membrane processes at the thickness range of 5-1000 nm at different angles]. *Morphologia*. 2017;11(4):7-17. Russian.

## Введение

Проблема взаимодействия между микро-электродом и клеткой в тонком эксперименте, с позиций биофизики поверхности [1-3], является одновременно проблемой физической химии поверхности электрода и биофизической химии интерфейсных с ним областей клетки, завися одновременно от электростатических характеристик конкретных марок специального стекла и конкретного электролита в стеклянном микро-электроде по физическим источникам сигнала зондирования, и от биологической геометрии эксперимента (внеклеточное, внутриклеточное или интерфейсное отведение конкретного электрода) по ожидаемому характеру его сигналов. При этом, в отсутствие точных и достоверных техник наблюдения кончика микроэлектрода в среде (так как при диаметре конуса менее 500 нм он теряется в интерференционной кайме на обычной оптической цифровой или аналоговой микрофотографии) ничего конкретного о том или ином типе процессов в активной зоне интерфейса клетка-электрод (на острие последнего) в экспериментальных статьях определить невозможно. Работы, выполняемые на стандартных световых микроскопах, физически лишены данных о процессах на границе «электрод-клетка» и «электрод-среда» в силу ограниченности их разрешения критерием Рэлея, а продвижение в ультрафиолетовую область изменяет сам ход подобных процессов, негативно воздействует на клетку и, как следствие, не обеспечивает неразрушающий контроль в ходе эксперимента. Так как явления диффузии, ионофореза, электроосмоса и сопутствующие им флюидные эффекты работают на регистрируемых оптическими средствами пространственных масштабах, однако только на масштабах, фиксируемых интерферометрическими методами, логично опробовать, предварительно теоретически обосновав, интерференционные методы контроля «в реальном времени», *in situ*, в процессе эксперимента.

Физические экспериментальные интерферометрические исследования диффузии имеют началом 1940-е годы, работы Лонгворта, Гостинга и Лайонса с соавторами [4-11]. Эти исследования, базировавшиеся, зачастую [9, 10], на методе Гуи, генеральная физическая теория которого была разработана Гостингом и Онзагером [12], составили основу интерферометрии в физической химии диффузии и биохимии (например – интерферометрические измерения для анализа диффузии глюкозы, мочевины, глицина и т.д. [7, 9, 10]) соответствующих процессов как *in vitro*, так и *in vivo*. Альтернативные работы, выполненные позже по схеме интерферометра Жамена (либо, что точнее, интерферометрического рефрактометра Жамена) [13, 14], привели к аналогичным результатам и также способствовали развитию интерференционных техник в биохимии, легших в

основу некоторых типов хроматографических детекторов, измеряющих в качестве первичного сигнала диффузию. Интерференционные диффузионные измерения для нужд хроматографии актуальны до настоящего времени, так как цеолиты, используемые в большом количестве методов как набивка колонок, эффективно контролируются в динамике интерференционными методами, особо микроинтерферометрического плана [15-21], что свойственно для большинства исследований диффузии, сопряженных с кристаллическим состоянием вещества [22-24]. Однако клетка не является, в качественном смысле термина, ни твердым телом, ни жидкостью – к ней неприменимы в чистом виде ни жидкофазные техники, которые адекватны для *wet biochemistry* [7, 9, 10] или аналогичных измерений небиологических жидкостей [25] (тот же метод Гуи), ни твердофазные подходы, включая используемые для измерений при процессах затвердевания типа градиентной солидификации [26]. Более того, по принципам биофизической термодинамики, невозможно сравнивать гомогенную диффузию в безмембранной стремящейся к равновесию системе (например – диффузию солей некоторых органических кислот в воде, хорошо визуализируемую стандартным интерферометрическим путём, например – с использованием интерференционного метода Гуи [27]), и в гетерогенной / структурированной или частично упорядоченной (*soft matter*) среде, к типу которых относят, в частности, многофазные смеси биополимеров и цитоплазму. Следует учитывать подвижные границы молекулярной сети [28] и свойства самих полимеров [29,30] клетки, рассматривая её в контексте физической химии как гельсодержащую структуру и структуру, способную к золь-гель-переходам (с первой половины XX века [31-34] до настоящего времени [35-40]) и их регуляции внешними физическими (электрическими, термическими, фотофизическими, радиационными) факторами, так как при данном рассмотрении приобретает «эвристическую ценность» применение к клеточным объектам диффузиометрических интерферометрических методов, адекватных для гелевых белковых систем [41].

Существенную трудность представляет то, что интерфейс цитоплазмы клетки и среды в диффузионном аспекте опосредован мембраной, в то время как возможности анализировать эффлюкс с обратной стороны мембраны / изнутри клетки интерферометрическими методами не представляется возможным. Однако эти методы эффективно используются для измерений и визуализации:

- 1) поверхностной мембранной топографии [42];
- 2) водной проницаемости и осмотических явлений в мембранных структурах [43];

3) фазовых переходов в биологических мембранах [44];

4) реологических свойств, растяжимости и деформаций биологических мембран [45,46];

5) ориентационных эффектов в липидных мембранах на чипе [47] (в том числе – векторной ориентации мембранных белков при использовании рентгеновской интерферометрии и голографии [48] или векторной ориентации ионных каналов по данным корпускулярной – нейтронной интерферометрии [49]);

6) адгезии клеток к поверхности [50];

7) эффектов взаимодействия компонентов мембран с разными лигандами (в таких случаях используют, как правило, интерферометрию обратного рассеяния [51,52], даже когда речь в работах идёт о мембранных белках [53]; анализ взаимодействия с пептидами зачастую производится поляризационно-интерференционными методами [54]);

8) коллективных движений в мембране различной амплитуды [55];

9) функционально-морфометрических карт мембран с использованием оптики Номарского [56] и по данным самоинтерференции флуоресценции [57];

10) активности пролиферации клетки – с позиций анализа ILMS (Internal Limiting Membrane Specimens) [58];

11) нейрофизиологических внутриклеточных и мембранных процессов на уровне нейронов в развитии и реакции, и их формирующегося в результате этой активности коннектома [59].

Исходя из пунктов приведенного списка, связанных с межфазным взаимодействием или взаимодействием мембранных компонент с внешними агентами, рационально предположить, что нельзя рассматривать клеточную мембрану как интактную или инертную структуру, как это принято в простой механической трактовке, порождающей упрощенный подход к данным биомембранной интерферометрии (формально апеллирующий к целям обычной инженерно-физической интерферометрии оболочек и деформирующихся поверхностей [60-64], что в принципе верно, но может быть применено более к «анатомическим» макромасштабным или мезомасштабным «мембранам» – хориоаллантоисной оболочке [65], тимпанальной [66-69], базилярной [70], fenestra cochleae / fenestra rotunda [71], эндотелия роговицы [72] и т.п.). При иных подходах к интерпретации – изменяется спектр явлений, которые могут быть исследованы по принципам микроинтерферометрии в реальном времени. Чем большее число динамических в основе своей явлений исследователь сможет проконтролировать в ходе микроэлектродного и микроперфузионного (требующего, как минимум, ещё учета текучести мембран и жидкостей, вводимых в них [73]) эксперимента, тем более он будет застрахован от

артефактов и тем более точным будет представление о комплексных изучаемых им механизмах, происходящих в ему подконтрольной экспериментальной среде.

Если не вводить чисто твердотельные интерференционные диффузионные ограничения [74], то измерять диффузию через ограничивающие и прерывающие её системы типа мембран и границ раздела, а также пространственных барьеров прерывания, возможно, даже исходя из старых подходов [75], также как и диффузию через абстрактные реактивные оболочки (ESPI – спекл-интерферометрией [76] и другими методами), по интерференционным полосам. Первые результаты по определению коэффициентов диффузии интерпретацией интерференционных полос в физической химии относятся к границе первой и второй половин XX века, а подходы к скоростному расчету коэффициентов диффузии по рэлеевским полосам внедрены в 1960-е годы [77] (эти работы были продолжены впоследствии – см. статьи по анализу коэффициентов диффузии по прогрессии интерференционных полос 1980-х гг. [78] и наиболее современные в инструментальном плане публикации по определению коэффициентов диффузии по полосам регистрограмм интерферометров Маха-Цендера, являющихся модификацией интерферометра Жамена, упомянутого выше [79]). Однако специализированных систем анализа реактивности мембран клеток (по диффузии в процессе эксперимента) с интерференционными полосами до настоящего времени не создано. Можно было бы сопрячь это с отсутствием моделей, методов и идеологий расшифровки для сложных диффузионных режимов, в частности, сопряженных (в случае цитоэлектрофизиологически активных мембран) с биоэлектрогенезом. Однако: для задач мембранного электроосмоса на границе раздела фаз существуют развитые модели [80], а для рассматриваемого как функционально мембраномиметический процесс обратного осмоса существует развитая индустрия микроинтерферометрического, в частности голографического интерферометрического контроля процессов [81-86]. Следовательно, объективных (т.е. физико-химических) предпосылок для отсутствия техники интерферометрического контроля диффузии, ионофореза, электроосмоса и сопутствующих флюидных эффектов в пограничном слое микроэлектрода и клетки при экспериментально-биологических работах, в принципе, не имеется. Ниже описывается создание простейшего DIY-стенда микроинтерферометрических измерений вблизи микроэлектрода, обеспечивающее контроль ряда явлений массопереноса в зоне интерфейсов клетки, среды и электрода.

#### **Конструкция устройства.**

Нами в качестве исходного интерферометрического модуля использовался стандартный

промышленный многолучевой микроинтерферометр МИИ-11 индустриального назначения, в котором многолучевая интерференция имплементируется посредством подборки стеклянных пластин с избирательным (селективным) отражением излучения. Эффективность применения данного аппарата, в идеальной конфигурации, достигается при использовании когерентного – лазерного монохроматического источника с заданной длиной волны, так как при наложении пластины на объект или иным контакте исследуемого объекта с ней при монохроматическом облучении в промежуточном пространстве наблюдается многократное отражение излучения, фиксируемое цифровой камерой на окуляре прибора. Использование камеры вместо окуляр-микрометра позволяет выполнять на ЭВМ измерения интерференционных полос, которые по механизму генерации и локализации соответствуют особенностям структуры микрообъекта. Точность подобных измерений чрезвычайно высока. Реализована возможность измерений по толщине от 50 до  $100^3$  Å. Это адекватно толщинам биологических мембранных структур как с учетом кортикальных и экстрацеллюлярных прилежащих областей, так и без учета таковых. Нами был использован микроинтерферометр МИИ-11 исходно с некогерентным облучением, однако затем были установлены три лазерных диода (405 нм, 532 нм, 650 нм). Благодаря этим элементарным усовершенствованиям, была реализована возможность спектрозонального (т.е. в R-, G-, B- фотоколориметрических диапазонах спектра) измерения разных структур. Нами данные источники использовались только в монохроматическом режиме без перекрытия, так как в противном случае суммарная энергия выводила из строя объект/или матрицу. Объектив был подобран специально. Окуляр-микрометр, работавший на некогерентной версии, заменен цифровой камерой с соответствующим расширенным программным обеспечением (с ImageJ). В ряде электрофизических и флюидных экспериментов стеклянные пластины с селективным отражением совмещались с чипом. По данным методических материалов ИТМО, для режима многолучевой интерференции возможно расширение нижнего предела измерений до  $h_1=0,003$  мкм или неоднородности от  $R_a$  0,16 до  $R_a$  0,008. Общий вид установки показан на рис. 1.

В качестве микроинъектора / микроманипулятора / микроперфузора использовался для первых экспериментов инъектор стереотактической установки с графмометром, ненужным на практике при использовании под углом без контакта с твердой поверхностью. Микровинтами достигалось позиционирование, при этом дополнительно были задействованы вращающийся шарниром угловой позиционер и вертикальный угловой позиционер с винтовыми стопорами. В перспективе ведущихся работ ведется подготовка к полной

механизации установки за счет использования системы шаговых двигателей, управляемых с GUI.

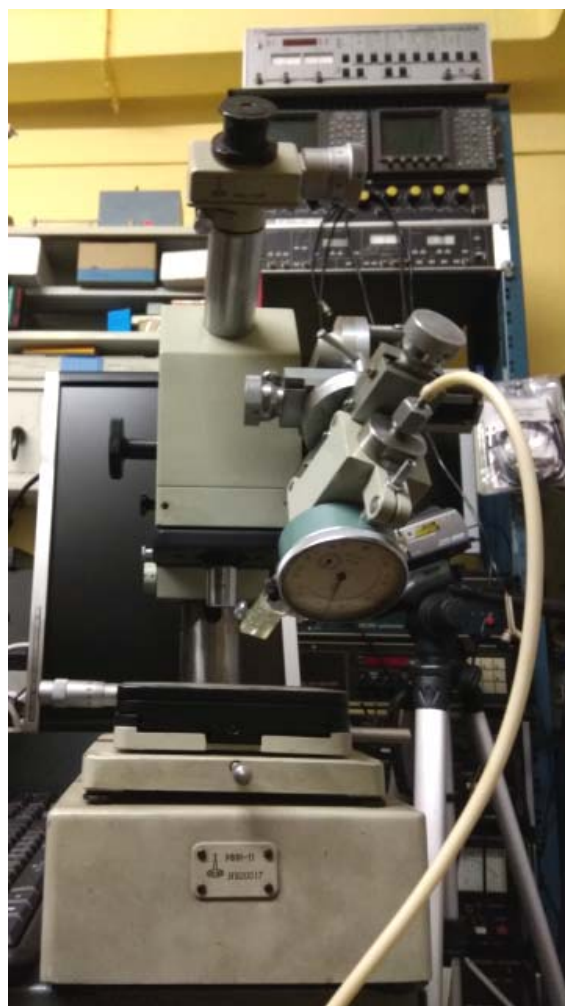


Рис. 1. Общая конфигурация установки.

Вся арматура инъектора, с целью уточненного позиционирования, привинчивалась винтами к корпусу интерферометра, за счет чего достигалась вибрационная согласованность измерений (вместо монтажа на столе лазерной установки или оптических рельсах / напольной оптической скамье). Координатным столом осуществлялось перемещение в частности – вращение в горизонтальной ротационной сетке с угловой разметкой в полярных координатах, носителей образцов, в частности чипов, в силу чего являлось возможным установление угловых зависимостей сигнализации клеток, их векторной / угловой направленности морфогенеза (нейрогониометрия на чипе) и ориентации в экспериментальных полях (см. рис. 2).

В качестве метрологической схемы измерений использовались фазочувствительные (т.е. синхронные по детектированию) схемы усиления и анализа (Princeton Applied Research 5208 – Two Phase Lock in Analyzer и Princeton Applied

Research 5210 – Dual Phase Lock-in Amplifier). Они видны на заднем плане на рис. 1, наряду с частотно-перестраиваемым фильтром модели КЕМО VBF/8 (Dual Channel Variable Filter). Более подробно результаты измерений изложены в отдельной статье.



Рис. 2. Системы углового позиционирования микроманипулятора.

В настоящее время ведутся работы по адаптации интерференционного метода для иных способов микроинъекции в клеточные тест-системы не только для чипов биотестирования, но и для усеченных 96-луночных (и иных) планшетов. В частности, готовится интерференционная система регистрации на альтернативных принципах для схем микроинъекции с капиллярной хроматографической микроколонки, как это показано на рис. 3. Данная система может также работать в режиме снятия электрического сигнала с корпуса колонки. Дополнительно может быть введен зонд непосредственно в планшетную лунку с помощью микроманипулятора типа «ОРТОН» с управлением перемещением джойстиком с пульта, подающим сигнал на шаговые двигатели (изображен на заднем плане рис. 3).

#### Обсуждение

Данная конструкция физически исходит «из первых принципов» капиллярной оптики и базирующихся на ней технических средств анализа. При расчетах принимаются во внимание многолучевая интерференция в капилляре и формиро-

вание трехмерных интерференционных паттернов в нём [87,88] (для нестеклянных микроэлектродов сверхмалого диаметра – таких как углеродные волоконные микроэлектроды – это метрологически существенно по физическим причинам, поскольку абляционные паттерны лазерной интерференции приводят к изменению уровня сигнала энзиматического детектирования [89]). Учитываются нелинейные зависимости показателя преломления среды [90] (в частности, для витальных красителей, которыми может быть окрашена клетка – которые могут поверхностно взаимодействовать с капилляром [91] и диффузионно изменять граничные параметры заполнения капилляра электролитом). Исходя из классических физико-математических представлений [92], делается возможным измерение капиллярных констант вязких (превалентно, неньютоновских) жидкостей, к которым отчасти относится содержимое экспериментальной платформы, содержащей клетку и внеклеточную среду. Для методов микрокоагуляции и микроабляции клеток (имплементируемых, начиная с работ Чахотина, в УФ-диапазоне, а начиная с XXI века – с использованием микрокапилляров как световодов / оптических волноводов для лазерного излучения, вводимого в клетку, либо с использованием капиллярных эмиссионных дуг) возможно рассчитать интерференционные и эмиссионные эффекты селективно к используемым длинам волн вводимого манипулятором в клетку излучения; аналогично обстоит дело для эмиссионно-чувствительных методов лазерной искровой спектроскопии тканей [93].

Наивысшее геометрическое и технико-методическое подобие методов анализа отклика, обусловленного вводом капилляров (в частности – электрофизиологического отклика), имеет комплекс интерферометрических подходов, используемых в капиллярном электрофорезе или капиллярном микроэлектрофорезе. Интерференция обратно отраженного пучка на капилляре-колонке является источником данных автоматической регистрации показателя преломления при капиллярном электрофорезе [94]. Детектирование показателя преломления при лазерной интерферометрии, как правило, лежит в основе техник лазерного детектирования в капиллярном электрофорезе, работающих на принципах рефрактометрии когерентного излучения [95]. Для эквивалентных методов интерферометрии сред (с использованием капилляров) необходим учет собственного показателя преломления стенок капилляра [96]. Подобные подходы лежат в основе измерений биологических агентов в капиллярно-интерференционных методах [97], в том числе – на базе флуоресцентных, а не обычных подходов; в частности, применение стационарных паттернов интерференции в капиллярном электро-

форезе обнаруживает эффективность и для принципов детектирования, ассоциированных с флуоресцентной корреляционной спектроскопией [98]. В настоящее время методы, основанные на измерениях интерференции на обратно отраженном пучке в капилляром электрофорезе получили ещё один нестандартный тренд развития – TLS – в

сопряжении с термолинзовой спектроскопией (особо – коаксиальной TLS [99]), однако это практически бессмысленно имплементировать, интегрируя с микроскопией при эксперименте на живой ткани, поэтому данный тренд в настоящем обсуждении не рассматривается.



Рис. 3. Стенд монтажа интерференционной системы регистрации для схемы микроинъекции с капиллярной хроматографической микроколоники с параллельным снятием сигнала с колонки.

#### **Благодарности**

Авторы выражают благодарность сотрудникам быв. лабораторий ЗИЛ и АЗЛК, откуда, благодаря любезности коллег, при ликвидации удалось получить микроинтерферометр МИИ-11, фазочувствительные усилители и фильтры. Авторы благодарят сотрудников Лаборатории Нейронной Структуры Мозга НЦН РАМН (ныне ликвидированной) за предоставленные ими детали стереотактической установки. Авторы благодарят

коллег из быв. НПО «Астрофизика» (реорганизовано в 2012 году – с ликвидацией структурных подразделений) за предоставление ряда экспериментальных оптических компонент. Закупки компонент установки за наличный расчет произведены О.В. Градовым (ИНЭПХФ РАН).

#### **Источники финансирования**

Работа поддержана грантом РФФИ 16-32-00914.

#### **Литературные источники References**

1. Scarpelli EM, Mautone AJ. Surface biophysics of the surface monolayer theory is incompatible with regional lung function. *Biophysical journal*. 1994;67(3):1080-9. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80573-9
2. Rutishauser U. Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity. *Journal of cellular biochemistry*. 1998;70(3):304-12. doi: 10.1002/(SICI)1097-

- 4644(19980901)70:3<304::AID-JCB3>3.0.CO;2-R
3. Beales PA. Biophysics: A toehold in cell surface dynamics. *Nature Nanotechnology*. 2017;12:404–6. doi: 10.1038/nnano.2017.20
4. Longworth LG. Experimental Tests of an Interference Method for the Study of Diffusion. *Journal of the American Chemical Society*. 1947;69(10):2510-6. doi: 10.1021/ja01202a077
5. Kegeles G, Gosting LJ. The theory of an in-

- terference method for the study of diffusion. *Journal of the American Chemical Society*. 1947;69(10):2516-23. doi: 10.1021/ja01202a078
6. Gosting LJ, Hanson EM, Kegeles G., Morris MS. Equipment and experimental methods for interference diffusion studies. *Review of Scientific Instruments*. 1949;20(3):209-15. doi: 10.1063/1.1741490
7. Gosting LJ, Morris MS. Diffusion studies on dilute aqueous sucrose solutions at 1 and 25 with the Gouy interference method. *Journal of the American Chemical Society*. 1949;71(6):1998-2006. doi: 10.1021/ja01174a028
8. Longworth LG. Tests of Flowing Junction Diffusion Cells with Interference Methods. *Review of Scientific Instruments*. 1950;21(6):524-8. doi: 10.1063/1.1745641
9. Gosting LJ, Akeley DF. A Study of the Diffusion of Urea in Water at 25° with the Gouy Interference Method. *Journal of the American Chemical Society*. 1952;74(8):2058-60. doi: 10.1021/ja01128a060
10. Lyons MS, Thomas JV. Diffusion Studies on Dilute Aqueous Glycine Solutions at 1 and 25° with the Gouy Interference Method. *Journal of the American Chemical Society*. 1950;72(10):4506-11. doi: 10.1021/ja01166a047
11. Lyons PA, Sandquist CL. A study of the diffusion of n-butyl alcohol in water using the Gouy interference method. *Journal of the American Chemical Society*. 1953;75(16):3896-9. doi: 10.1021/ja01112a007
12. Gosting LJ, Onsager L. A general theory for the Gouy diffusion method. *Journal of the American Chemical Society*. 1952;74(23):6066-74. doi: 10.1021/ja01143a071
13. Chatterjee A. Diffusion Studies of Bovine Plasma Albumin at 25° with the Help of Jamin Interference Optics. *Journal of the American Chemical Society*. 1964;86(18):3640-2. doi: 10.1021/ja01072a010
14. Chatterjee A. Measurement of the diffusion coefficients of sucrose in very dilute aqueous solutions using Jamin interference optics at 25. *Journal of the American Chemical Society*. 1964;86(5):793-5. doi: 10.1021/ja01059a009
15. Gueudré L, Binder T, Chmelik C, Hibbe F, Ruthven DM, Kärger J. Micro-imaging by interference microscopy: A case study of orientation-dependent guest diffusion in MFI-type zeolite host crystals. *Materials*. 2012;5(4):721-40. doi: 10.3390/ma5040721
16. Kärger J, Schemmert ULF., Vasenkov S. Application of interference microscopy – a novel route to study intracrystalline zeolitic diffusion. *Adsorption Science and Technology: Proceedings of the Second Pacific Basin Conference on Adsorption Science and Technology: Brisbane, Australia, 14-18 May 2000*. World Scientific, 2000:324. doi: 10.1142/9789812793331\_0065.
17. Heinke L, Kortunov P, Tzoulaki D, Castro M, Wright PA, Kärger J. Three-dimensional diffusion in nanoporous host-guest materials monitored by interference microscopy. *EPL (Europhysics Letters)*. 2007;81(2):26002. doi: 10.1209/0295-5075/81/26002
18. Gueudré L, Chmelik C, Kärger J. Diffusion anisotropy in a single crystal of silicalite-1 studied by interference microscopy. *Diffusion Fundamentals*. 2011;16:45.1-45.2
19. Heinke L, Kortunov P, Tzoulaki D, Kärger J. The options of interference microscopy to explore the significance of intracrystalline diffusion and surface permeation for overall mass transfer on nanoporous materials. *Adsorption*. 2007;13(3-4):215-23. doi: 10.1007/s10450-007-9048-y
20. Karge HG, Kärger J. Application of IR spectroscopy, IR microscopy, and optical interference microscopy to diffusion in zeolites. *Adsorption and Diffusion*. Springer Berlin Heidelberg, 2008:135-206.
21. Schemmert U, Kärger J, Weitkamp J. Interference microscopy as a technique for directly measuring intracrystalline transport diffusion in zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*. 1999;32(1):101-10. doi: 10.1016/S1387-1811(99)00095-5
22. Geier O, Vasenkov S, Lehmann E, Kärger J, Rakoczy RA, Weitkamp J. 19-O-04-Interference microscopy as a tool of choice for investigating the role of crystal morphology in diffusion studies. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 2001;135:154. doi: 10.1016/S0167-2991(01)81257-X
23. Kärger J, Heinke L, Kortunov P, Vasenkov S. Looking into the crystallites: diffusion studies by interference microscopy. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 2007;170:739-47. doi: 10.1016/S0167-2991(07)80915-3
24. Lauerer A, Binder T, Haase J, Kärger J, Ruthven D.M. Diffusion of propene in DDR crystals studied by interference microscopy. *Chemical Engineering Science*. 2015;138:110-17.
25. Beran PŘE, Vojáčková S, Porsch B. Determination of the diffusion coefficients of Tl<sup>+</sup>, As<sup>3+</sup>, phenol, and quinolin-8-ol using the polarized light interference method. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1975;22:908a. doi: 10.1039/C3975000908A
26. Holmes DE, Gatos HC. Convective Interference and "Effective" Diffusion-Controlled Segregation during Directional Solidification under Stabilizing Vertical Thermal Gradients; *Ge. Journal of The Electrochemical Society*. 1981;128(2):429-37.
27. Brudney N, Saunders L. A study by the Gouy interference method of the diffusion in water of potassium laurate. *Journal of the Chemical Society*. 1955:2916-21. doi: 10.1039/JR9550002916
28. Pierobon M, Akyildiz IF. A statistical-physical model of interference in diffusion-based

- molecular nanonetworks. *IEEE Transactions on communications*. 2014;62(6):2085-95. doi: 10.1109/TCOMM.2014.2314650
29. Chertkov VG, Chalykh AY. Polarization-interference micromethod for the study of mutual diffusion in polymer systems. *Polymer Bulletin*. 1988;19(5):487-92. doi: 10.1007/BF00263919
30. Kozenkov VM, Belyaev VV, Tumovskii GD, Spakhov AA. Translational and Rotation Self-Diffusion in Polymeric Systems Including Photo- and Thermo-Polymerized Systems by an Interference-Holography Method and a Method of Photo-Induced Optical Anisotropy // *Reaction Kinetics in Condensed Matter* RKCМ'10-Moscow:128. doi: 10.1.1.456.9766. Russian.
31. Taylor CV. The contractile vacuole in *Euplotes*: An example of the sol-gel reversibility of cytoplasm. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 1923;37(3):259-89. doi: 10.1002/jez.1400370302
32. Bensley RR. Plasmosin. The gel-and fiber-forming constituent of the protoplasm of the hepatic cell. *The Anatomical Record*. 1938;72(3):351-69. doi: 10.1002/ar.1090720308
33. Seifriz W. Sol-gel transformation of protoplasm. *Revue d'hematologie*. 1949;5(5-6):591-602.
34. Reiner JM. A proposed mechanism for the sol-gel transformations. *The Bulletin of Mathematical Biophysics*. 1965;27(1):105-112. doi: 10.1007/BF02477266
35. Munder MC, Midtvedt D, Franzmann TM, Nueske E, Malinowska L, Otto O. A sol-gel transition of the cytoplasm driven by adaptive intracellular pH changes promotes entry into dormancy. *Molecular Biology Of The Cell*. 2015;26:8120.
36. Kondo H. Ultrastructural consideration on the nature, sol and gel, of the aqueous cytoplasm in embedment-free section electron microscopy. *Advances in colloid and interface science*. 2010;160(1):49-55. doi: 10.1016/j.cis.2010.07.003
37. Martínez-Cancino R, Sotero RC. Modeling the effect of cytoplasm sol-gel transitions on magnetization changes during MRI diffusion experiments in brain gray matter // *International Journal of Bioelectromagnetism*. 2008;10(4):269-80.
38. Lewin RA. Sol-to-gel changes in the protoplasm of prokaryotic algae. *Algological Studies / Archiv für Hydrobiologie*. 1994;1:67-71.
39. Janmey PA. Gel-sol transition of the cytoplasm and its regulation. *AIP Conference Proceedings*. 1991;226(1):304-25. doi: 10.1063/1.40599
40. Luby-Phelps K. *The Cytoplasm of Living Cells as a Reversible Gel Network*. *Physical Networks: Polymers and gels*. 1990:345 p.
41. Nilsson L. Å. Qualitative analysis of acute phase protein antisera with the comparative interference diffusion-in-gel technique. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1968;33(1):16-28.
42. Koyuncu I, Brant J, Lüttge A, Wiesner MR. A comparison of vertical scanning interferometry (VSI) and atomic force microscopy (AFM) for characterizing membrane surface topography. *Journal of Membrane Science*. 2006;278(1):410-7. doi: 10.1016/j.memsci.2005.11.039
43. Farinas J, Verkman AS. Cell volume and plasma membrane osmotic water permeability in epithelial cell layers measured by interferometry. *Biophysical journal*. 1996;71(6):3511-22. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79546-2
44. Haruna M, Yoden K, Ohmi M, Seiyama A. Detection of phase transition of a biological membrane by precise refractive-index measurement based on the low coherence interferometry. *Proc. SPIE*. 2000;3915:188-93. doi: 10.1117/12.384155
45. Honglin M, Zhihao Q. [Stretching Deformation Analysis of Biology Membrane Material by Interferometry Phase-shift Method]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*. 2009;32(03):42-6. Chinese.
46. Zilker A, Engelhardt H, Sackmann E. Dynamic reflection interference contrast (RIC-) microscopy: a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic moduli. *Journal De Physique*. 1987;48(12):2139-51. doi: 10.1051/jphys:0198700480120213900
47. Lambacher A, Fromherz P. Orientation of hemicyanine dye in lipid membrane measured by fluorescence interferometry on a silicon chip. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2001;105(2):343-6. doi: 10.1021/jp002843i
48. Chupa JA, McCauley JP, Strongin RM, Smith AB, Blasie JK, Peticolas LJ, Bean JC. Vectorially oriented membrane protein monolayers: profile structures via X-ray interferometry/holography. *Biophysical journal*. 1994;67(1):336-48. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80486-2
49. Gupta S, Dura JA, Freitas JA, Tobias DJ, Blasie JK. Structural characterization of the voltage-sensor domain and voltage-gated K<sup>+</sup>-channel proteins vectorially oriented within a single bilayer membrane at the solid/vapor and solid/liquid interfaces via neutron interferometry. *Langmuir*. 2012;28(28):10504-20. doi: 10.1021/la301219z
50. Izzard CS, Lochner LR. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *Journal of cell science*. 1976;21(1):129-59.
51. Baksh MM, Kussrow AK, Mileni M, Finn MG, Bornhop DJ. Label-free quantification of membrane-ligand interactions using backscattering interferometry. *Nature biotechnology*. 2011;29(4):357-60. doi: 10.1038/nbt.1790
52. Baksh MM, Lockwood A, Richards C, Finn MG, Heidary D. Label-Free Molecular Observations of Membrane-Associated Species using Backscattering Interferometry. *Biophysical Journal*. 2015;108(2):617a.
53. Gerhart J, Haddad-Weiser G, Kussrow A, Bornhop D, Flowers R, Thévenin D. Backscattering



Interferometry: Seeing Membrane Proteins in a New Light. *Biophysical Journal*. 2015;108(2):253a.

54. Payne JA, Lee TH, Anderson MA, Aguilar MI. Examination of the Interaction between a Membrane Active Peptide and Artificial Bilayers by Dual Polarisation Interferometry. *Bio-protocol*. 2017;7(1):e2087. doi: 10.21769/BioProtoc.2087

55. Hirn R, Bayerl TM, Rädler JO, Sackmann E. Collective membrane motions of high and low amplitude, studied by dynamic light scattering and micro-interferometry. *Faraday discussions*. 1999;111:17-30. doi: 10.1039/A807883A

56. Dana KJ. Three dimensional reconstruction of the tectorial membrane: an image processing method using Nomarski differential interference contrast microscopy (Doctoral dissertation, Massachusetts Institute of Technology). MIT, 1992, 96 p.

57. Barroca T, Bon P, Lévêque-Fort S, Fort E. Supercritical self-interference fluorescence microscopy for full-field membrane imaging. *Proc. SPIE*. 2013;858911. doi: 10.1117/12.2003736

58. Gandorfer A, Scheler R, Schumann R, Haritoglou C, Kampik A. Interference microscopy delineates cellular proliferations on flat mounted internal limiting membrane specimens. *British Journal of Ophthalmology*. 2009;93(1):120-2. doi: 10.1136/bjo.2008.146514

59. Erokhova LA, Novikov SM, Lazarev GL, Kazakova TA, Orlov DA, Indukaev KV, Maksimov GV. [Study of regular intracellular and membrane processes in neurons by laser interference microscopy]. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2005;140(2):262-4. doi: 10.1007/s10517-005-0461-5. Russian.

60. Wilson AD. Inplane displacement of a stressed membrane with a hole measured by holographic interferometry. *Applied optics*. 1971;10(4):908-12. doi: 10.1364/AO.10.000908

61. Röhler R, Sieger C. Analysis of asymmetrical membrane vibrations by holographic interferometry. *Optics Communications*. 1978;25(3):297-300. doi: 10.1016/0030-4018(78)90132-3

62. Ghislain LP, Webb WW. Force and membrane compliance measurements using laser interferometry and optical trapping. *Proc. SPIE (Holography, Interferometry, and Optical Pattern Recognition in Biomedicine III)*. 1993;1889:212-4. doi: 10.1117/12.155726

63. Cheung DCL, Barnes TH, Haskell TG. Feedback interferometry with membrane mirror for adaptive optics. *Optics communications*. 2003;218(1):33-41. doi: 10.1016/S0030-4018(03)01188-X

64. Kaizuka Y, Groves JT. Hydrodynamic damping of membrane thermal fluctuations near surfaces imaged by fluorescence interference microscopy. *Physical review letters*. 2006;96(11):118101. doi: 10.1103/PhysRevLett.96.118101

65. Eom J, Park SJ, Lee BH. Noncontact photoacoustic tomography of in vivo chicken chorioallan-

toic membrane based on all-fiber heterodyne interferometry. *Journal of biomedical optics*. 2015;20(10):106007. doi:

10.1117/1.JBO.20.10.106007

66. Pande P, Shelton RL, Monroy GL, Nolan RM, Boppart SA. A mosaicking approach for in vivo thickness mapping of the human tympanic membrane using low coherence interferometry. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2016;17(5):403-16. doi: 10.1007/s10162-016-0576-6

67. Hernandez-Montes MDS, Santoyo FM, Munoz S, Perez C, de la Torre M, Flores M, Alvarez, L. Surface strain-field determination of tympanic membrane using 3D-digital holographic interferometry. *Optics and Lasers in Engineering*, 2015;71:42-50. doi: 10.1016/j.optlaseng.2015.03.008

68. Kimura Y. [Experimental study of the vibration analysis of tympanic membrane by holographic interferometry]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1981;84(8):880-9. Japan.

69. del Socorro Hernández-Montes M, Solis SM, Santoyo FM. 3-D Digital holographic interferometry as a tool to measure the tympanic membrane motion. *Proc. SPIE*. 2012;8413:A-1-A-6. doi: 10.1117/12.978227

70. O'Neill MP, Bearden A. The amplitude and phase of basilar membrane motion in the turtle measured with laser-feedback interferometry. *Biophysics of Hair Cell Sensory Systems*. World Scientific Singapore, 1993;398-405.

71. Watanabe H, Kysar JW, Lalwani AK.. Microanatomic analysis of the round window membrane by white light interferometry and microcomputed tomography for mechanical amplification. *Otology & Neurotology*. 2014;35(4):672-8.

72. King-Smith P, Fink BA, Nichols JJ, Nichols KK, Hill RM, Markakis GA. In vivo Measurement of the Thickness of Human Corneal Endothelium and Descemet's Membrane Using Interferometry. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;43(13):157.

73. O'Brien RN, Zhao B. A new optical liquid membrane study technique: I. Use of holographic interferometry to obtain the refractive index of liquid membrane components. *Journal of membrane science*. 1984;20(3):297-304. doi: 10.1016/S0376-7388(00)82006-2

74. Levy D, Weiser K. Use of a laser beam interference technique for the determination of the minority carrier diffusion length in layers of a p-n junction. *Applied physics letters*. 1995;66(14):1788-90. doi: 10.1063/1.113322

75. Kim H, Patel BS, Kegeles G. Interference optical studies of restricted diffusion. *The Journal of Physical Chemistry*. 1962;66(10):1960-6. doi: 10.1021/j100816a035

76. Marucci M, Pettersson SG, Ragnarsson G, Axelsson A. Determination of a diffusion coefficient

- in a membrane by electronic speckle pattern interferometry: a new method and a temperature sensitivity study. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2007;40(9):2870-80. doi: 10.1088/0022-3727/40/9/031
77. Hook L, Davis WW, Kotin L. High-Speed Calculation of Diffusion Coefficients from Rayleigh Interference Fringes. *Applied Optics*. 1963;2(1):65-6. doi: 10.1364/AO.2.000066
78. Seufert WD, O'Brien RN. Determination of diffusion coefficients from the progression of interference fringes. *The Journal of Physical Chemistry*. 1984;88(5):829-32. doi: 10.1021/j150649a001
79. He M, Guo Y, Zhong Q, Zhang Y. A New Method of Processing Mach-Zehnder Interference Fringe Data in Determination of Diffusion Coefficient. *International Journal of Thermophysics*. 2009;30(6):1823-37. doi: 10.1007/s10765-009-0685-0
80. Vasil'eva VI, Shaposhnik VA, Grigorchuk OV, Petrunya IP. The membrane-solution interface under high-performance current regimes of electro-dialysis by means of laser interferometry. *Desalination*. 2006;192(1-3):408-14. doi: 10.1016/j.desal.2005.06.055
81. Mahlab D, Yosef NB, Belfort G. Intrinsic membrane compaction and aqueous solute studies of hyperfiltration (reverse-osmosis) membranes using interferometry. *ACS Symposium Series* 1981;153:147-58 doi: 10.1021/bk-1981-0153.ch010
82. Fernández-Sempere J, Ruiz-Beviá F, Salcedo-Díaz R, García-Algado P. Diffusion studies in polarized reverse osmosis processes by holographic interferometry. *Optics and Lasers in Engineering*. 2008;46(12):877-87. doi: 10.1016/j.optlaseng.2008.02.004
83. Fernández-Sempere J, Ruiz-Beviá F, Salcedo-Díaz R, García-Algado P. Measurement of concentration profiles by holographic interferometry and modelling in unstirred batch reverse osmosis. *Industrial & engineering chemistry research*. 2006;45(21):7219-31. doi: 10.1021/ie060417z
84. Fernández-Sempere J, Ruiz-Beviá F, García-Algado P, Salcedo-Díaz R. Experimental study of concentration polarization in a crossflow reverse osmosis system using Digital Holographic Interferometry. *Desalination*. 2010;257(1):36-45. doi: 10.1016/j.desal.2010.03.010
85. Fernández-Sempere J, Ruiz-Beviá F, Salcedo-Díaz R, García-Algado P. Buoyancy effects in dead-end reverse osmosis: visualization by holographic interferometry. *Industrial & engineering chemistry research*. 2007;46(6):1794-802. doi: 10.1021/ie061433z
86. Fernández Sempere J. et al. Visualization by digital holographic interferometry of flux velocity effect in cross-flow reverse osmosis. *Póster presentado en 11th Mediterranean Congress of Chemical Engineering, Barcelona, October 21-24, 2008*. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/15257>
87. Xu Q, Tian W, You Z, Xiao J. Multiple beam interference model for measuring parameters of a capillary. *Applied optics*. 2015;54(22):6948-54. doi: 10.1364/AO.54.006948
88. Zhang Y, Xu M, Tian W, Xu Q, Xiao J. Analysis of three-dimensional interference patterns of an inclined capillary. *Applied optics*. 2016;55(22):5936-44. doi: 10.1364/AO.55.005936
89. Rosenwald SE, Nowall WB, Dontha N, Kuhr WG. Laser interference pattern ablation of a carbon fiber microelectrode: Biosensor signal enhancement after enzyme attachment. *Analytical chemistry*. 2000;72(20):4914-20.
90. Qi SW, Liu AP, Lu HG. Research on the method of measurement of nonlinear refractive index of optical materials by interference of capillary. *Advanced Materials Research*. 2012;490:3468-71. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.490-495.3468
91. Qi S, Liu Y, Yang X, Xu T, Chen G, Zhang C, Tian J. Measurement of nonlinear refractive index of ethyl red by interference of capillary. *Optics Communications*. 2008;281(23):5902-4. doi: 10.1016/j.optcom.2008.08.044
92. Nisi H. Measurement of Capillary Constants of Viscous Liquids by Means of Interference Fringes. *Proceedings of the Physico-Mathematical Society of Japan*. 3rd Series. 1919;1(3):40-2. doi: 10.11429/ppmsj1919.1.3\_40
93. Kubota M. Interference effects in a capillary arc excitation source for emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 1978;96(1):55-62. doi: 10.1016/S0003-2670(01)93395-1
94. Deng Y, Li B. On-column refractive-index detection based on retroreflected beam interference for capillary electrophoresis. *Applied optics*. 1998;37(6):998-1005. doi: 10.1364/AO.37.000998
95. Jicun R, Yanzhuo D, Jieke C. [Separation and Determination of Polyols by High-performance Capillary Electrophoresis With Laser-based Interference Refractive Index Detector]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 1993;21(12):1374-7. Chinese.
96. Peng W, Liu Y, Zhang X, Cheng F, Han M. High sensitivity evanescent field refractometer based on modal interference in micro-capillary wall. *IEEE Sensors Journal*. 2014;14(2):430-5. doi: 10.1109/JSEN.2013.2283972
97. Sørensen HS, Larsen NB, Latham JC, Bornhop DJ, Andersen PE. Highly sensitive biosensing based on interference from light scattering in capillary tubes. *Applied physics letters*. 2006;89(15):151108. doi: 10.1063/1.2356380
98. Sonehara T, Kojima K, Irie T. Fluorescence correlation spectroscopy excited with a stationary interference pattern for capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*. 2002;74(19):5121-31. doi: 10.1021/ac0201326
99. Xiong B, Miao X, Zhou X, Deng Y, Zhou P, Hu J. Simultaneous coaxial thermal lens spectro-

**Градов О.В., Насіров Ф.А., Скринник А.А., Яблоков А.Г. Просте методичне пристосування для мікроін'єкторних маніпуляцій і вимірювань на електроморфологічному чипі при мікроінтерферометричному контролі інтерфейсних і мембранних процесів на діапазоні товщини від 50 до 10000 ангстрем під різними кутами.**

**Реферат.** Мікроманіпуляції, перфузії і вимірювання, що проводяться з використанням скляних мікроелектродів, заповнених, як правило, електролітом, є класичною технікою експериментально-морфологічних і мембранно-електрофізіологічних досліджень на рівні окремих клітин і мембранних поверхонь. Стандартний (ефективний) діаметр скляного мікроелектрода в кінцевій області становить від 500 нм до менш ніж 100 нм, що перешкоджає використанню стандартних оптичних мікроскопів для його спостереження, відповідно до оптичних критеріїв (критерій Релея і т.п.), оскільки при діаметрі конуса менше 500 нм він губиться в інтерференційній облямівці. Мікропроцесорним програмуванням пуллера (мікрокузні), що забезпечує витягування і розрив, хоча і можна досягти в відомих режимах заданих форм і діаметра кінця мікропіпеток, цей результат не є в повній мірі контрольованим в силу вищевказаних обмежень. У зв'язку з цим необхідне створення пристроїв контролю кінцевого фрагмента мікропіпеток як при отриманні, так і при експлуатації (внутрішньоклітинному або екстрацелюлярному введенні) в штатному режимі. При цьому необхідно, щоб даний метод дозволяв візуалізувати на зображенні клітини з мікроелектродами в реальному часі процеси, що відбуваються між ними, в залежності від типу і стану електрода, що дозволить нівелювати артефакти, з частотою систематичної помилки, що виникають при неконтрольованій експлуатації кінця мікропіпеток після застосування різних способів заливки електроліту (капілярного по Тасакі; вакуумного заповнення; заповнення спиртом з подальшим витісненням спирту по еквівалентній об'ємній характеристиці електролітом; заливка легкоплавкими сплавами як альтернатива рідким електролітам, що полегшує введення контакту хлорсрібного дроту). Нами пропонується конфігурація установки, що вирішує всі вищевказані проблеми шляхом введення інтерферометричного пристрою для мікроскопічного контролю мікроелектродів і мікроманіпулятора або мікроперфузора, вперше для даного типу оптичних приладів комбінованого з інтерферометричною оптичною схемою.

**Ключові слова:** мікроелектроди, мікроінтерферометр, мікроперфузія, патч-кламп, мікроманіпуляція, перфузія одиночних клітин, цитоелектрофізіологічний чіп.