МАРШРУТЫ БИМЕДИЦИНСКОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

ROUTES OF BIOMEDICAL SCANNING PROBE MICROSCOPY

УДК 621.385.833; БАК 05.11.13; DOI: 10.22184/1993-8578.2018.81.2.132.136

И.Яминский^{1, 2, 3, 4} /yaminsky@nanoscopy.ru

I.Yaminsky^{1, 2, 3, 4}

Представлен обзор последних достижений сканирующей зондовой микроскопии в решении практических задач в области биологии и медицины. Продемонстрированы уникальные возможности сканирующей капиллярной микроскопии при наблюдении морфологии единичных клеток и изучении проводимости ионных каналов мембраны клеток. Особое внимание уделено описанию принципа молекулярной печати с помощью техники сканирующей капиллярной микроскопии. Приведены данные о создании капиллярных бионаносенсоров. Представлено оригинальное решение по созданию пьезокерамических кантилеверных биочипов для раннего обнаружения вируса гриппа А.

The review of the latest achievements of scanning probe microscopy in solving practical problems in the field of biology and medicine is presented. The unique capabilities of scanning capillary microscopy are demonstrated in observing the morphology of single cells and studying the conductivity of the ion channels of the cell membrane. Particular attention is paid to the description of the principle of molecular printing using the technique of scanning capillary microscopy. Data on the creation of capillary bionanosensors are presented. An original solution for creating piezoceramic cantilever biochips for early detection of influenza A virus is presented.

Среди первостепенных задач биомедицинской сканирующей зондовой микроскопии можно отметить следующие направления:

- раннее обнаружение биологических агентов (вирусов и бактерий) и различных биологических мишеней в воздухе и биологических жидкостях;
- определение морфологии и качества клеток человека, разработка количественного метода экспресс-анализа клеток;
- создание атласа бактериальных клеток по данным сканирующей зондовой микроскопии для диагностических целей;
- разработка методов обнаружения ДНК вирусов и патогенных бактерий методом прямого наблюдения актов гибридизации на поверхности биочипов с помощью сканирующей зондовой микроскопии;

- создание методов обнаружения вирусов и патогенных клеток с применением аффинных поверхностей.

За последнее десятилетие произошел качественный скачок в развитии ряда методов сканирующей зондовой микроскопии, в том числе – сканирующей капиллярной микроскопии [1, 2]. Замечено, что при наблюдении живых клеток капиллярная микроскопия позволяет получить более точные изображения, поскольку отсутствует силовое взаимодействие между зондом (капилляром) и мембраной клетки [3]. Вместе с тем, высокоскоростная атомно-силовая микроскопия позволяет наблюдать биологические процессы на уровне единичных биомакромолекул с высокими разрешениями и скоростью [4]. В целом можно уверенно констатировать, что в умелых

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова / Lomonosov Moscow State University.

² НПП "Центр перспективных технологий" / Advanced Technologies Center.

³ ООО "Энергоэффективные технологии" / Energy Efficient Technologies.

⁴ ИНЭОС РАН / Institute of Organoelement compounds RAS.

Рис.1. Эволюция приборов производства НПП "Центр перспективных технологий" (www.nanoscopy.ru, www.nanoscopy.net): от туннельного микроскопа "Скан-8" (1987 год, слева) через сканирующий зондовый микроскоп "ФемтоСкан" (1997 год, в центре) к быстродействующему сканирующему зондовому микроскопу "ФемтоСкан X" (2013 год, справа)

Fig.1. Evolution of devices manufactured by Advanced Technologies Center (www.nanoscopy.ru, www.nanoscopy.net): from Scan-8 tunnel microscope (1987, left) through FemtoScan scanning probe microscope (1997, in center) to FemtoScan X high-speed scanning probe microscope (2013, right)

руках современные модели сканирующего капиллярного и атомно-силового микроскопов становятся чрезвычайно полезными инструментами для решения задач биологии и медицины. Для биомедицинских целей нами разработан быстродействующий сканирующий зондовый микроскоп "ФемтоСкан X", в котором обратная связь работает на частоте 1 МГц [5].

СКАНИРУЮЩАЯ КАПИЛЛЯРНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Новые возможности для медицины открывает сканирующая ион-проводящая микроскопия или сканирующая капиллярная микроскопия. В дополнение к наблюдению топографии с высоким разрешением сканирующая капиллярная микроскопия может выполнять multifunctional анализ живых клеток, включая наблюдение морфологических

Among the paramount tasks of biomedical scanning probe microscopy, we can note the following areas:

- early detection of biological agents (viruses and bacteria) and various biological targets in air and biological fluids;
- determination of morphology and quality of human cells, development of a quantitative method for rapid cell analysis;
- creation of a bacterial cell atlas for diagnostic purposes with the use of scanning probe microscopy data;
- development of methods for detecting DNA of viruses and pathogenic bacteria by direct observation of hybridization on

the surface of biochips using scanning probe microscopy;

- creation of methods for detection of viruses and pathogenic cells using affine surfaces.

Over the last decade, there has been a qualitative leap in the development of a number of methods of scanning probe microscopy, including scanning capillary microscopy [1, 2]. It is noted that capillary microscopy allows obtaining more accurate images of living cells, since there is no force interaction between the probe (capillary) and the cell membrane [3]. At the same time, high-speed atomic force microscopy makes it possible to observe biological processes at the level of single biomacromolecules with high

resolution and speed [4]. In general, we can confidently state that modern models of scanning capillary and atomic force microscopes in the able hands are extremely useful tools for solving the problems of biology and medicine. For biomedical purposes, we developed the FemtoScan X high-speed scanning probe microscope, in which the feedback operates at a frequency of 1 MHz [5].

SCANNING CAPILLARY MICROSCOPY

Scanning ion-conductance microscopy or scanning capillary microscopy opens new possibilities for medicine. In addition to observing high-resolution topography, scanning capillary microscopy can perform multifunctional analysis of

Рис.2. Экспериментальная установка для капиллярной стереолитографии на базе сканирующего капиллярного микроскопа и инвертированного оптического микроскопа Nikon Ti-U

Fig.2. Experimental system for capillary stereolithography based on scanning capillary microscope and Nikon Ti-U inverted optical microscope

трансформаций, вызванных физиологическими воздействиями, идентификацию внутриклеточных сигнальных путей и определение

характеристик механических ответов, что демонстрирует универсальность метода. Использование многоканальных нанокapилляров позволяет осуществлять локальную доставку химических веществ (медицинских препаратов) до непосредственного контакта с клеткой. Такой нанокapилляр может также являться электрохимическим зондом для определения различных жизненно важных параметров, например, концентрации активных форм кислорода вблизи поверхности живой клетки, а также внутри нее [6].

РАННЕЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Раннее обнаружение вирусов и бактерий в жидкости позволяет существенно снизить риск инфекционных заболеваний. Эта актуальная и социально значимая задача является достаточно сложной и требует инновационных решений.

Нами осуществлена разработка компактного и недорогого биосенсора для обнаружения различных биологических мишеней – вируса гриппа А, микроальбумина, простат-специфического антигена и пр. Ключевым элементом биосенсора является кантилеверный биочип – пьезокерамический диск, поверхность которого покрыта биоспецифическими сенсорными слоями. Связывание мишени с поверхностью биочипа определяется по изменению резонансной частоты пьезокерамического диска. В результате взаимодействия патогенов с рецепторным слоем биочипа эффективная масса и жесткость последнего будут изменяться,

living cells, including the observation of morphological transformations caused by physiological effects, the identification of intracellular signaling pathways and the characterization of mechanical responses, which demonstrates the versatility of the method. The use of multichannel nano-capillaries allows local delivery of chemicals (medical preparations) prior to direct contact with the cell. Such a nano-capillary can also be an electrochemical probe for determining various important parameters, for example, the concentration of reactive oxygen species near the surface of a living cell, and also inside it [6].

EARLY DETECTION OF INFLUENZA VIRUS BY SCANNING PROBE MICROSCOPY

Early detection of viruses and bacteria in the fluid can significantly reduce the risk of infectious diseases. This urgent and socially significant task is quite complex and requires innovative solutions.

We have developed a compact and inexpensive biosensor for detecting various biological targets – influenza A virus, microalbumin, prostate-specific antigen, etc. The key element of the biosensor is the cantilever biochip – piezoceramic disk, the surface of which is covered with biospecific sensory layers. The binding of the

target to the surface of the biochip is determined from the change in the resonance frequency of the piezoceramic disk. As a result of the interaction of pathogens with the biochip receptor layer, the effective mass and rigidity of the latter will vary, which can be estimated from the shift of the cantilever resonant frequency:

$$\Delta f = \frac{1}{2} f_n \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m} \right),$$

where Δf , Δk , Δm are the changes in the resonance frequency, rigidity and mass of the biochip, and f_n , k and m are the initial values of these parameters.

что может быть зарегистрировано по сдвигу резонансной частоты кантилевера:

$$\Delta f = \frac{1}{2} f_n \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m} \right),$$

где Δf , Δk , Δm – изменения резонансной частоты, жесткости и массы биочипа, а f_n , k и m – первоначальные значения этих параметров.

В блоке управления биосенсора используются электронные платы сканирующего зондового микроскопа, в том числе цифровой синтезатор частоты, прецизионный усилитель входного сигнала, интерфейс для связи с компьютерным блоком, термостат проточной жидкостной ячейки, ЦАП-АЦП, стабилизированное питание, цифровой сигнальный процессор. Ряд технологических решений – симметрия конструкции биочипа и электронной схемы подачи и снятия сигнала позволили существенно повысить точность и достоверность измерений [7].

В проведенных экспериментах достигнута чувствительность по обнаружению вируса гриппа А на уровне 10^5 ед. в мл [8]. Продемонстрирована возможность выявления низких концентраций микроальбумина в биологических жидкостях с помощью пьезокерамического биочипа с сенсорными слоями на основе моноклональных антител [9].

Использование оригинальной конструкции проточной жидкостной ячейки и пьезокерамического биочипа в качестве подложки в составе сканирующего зондового микроскопа позволяет в реальном времени наблюдать адсорбцию отдельных вирусных частиц с одновременной регистрацией сдвига резонансной

частоты механических колебаний биочипа. С помощью таких измерений можно осуществлять калибровку биочипа, что необходимо для практических применений в медицине. Точное измерение размеров вирусных частиц можно выполнять с помощью разработанного ранее эталона нанометра [10].

КАПИЛЛЯРНАЯ СТЕРЕОЛИТОГРАФИЯ

С момента своего появления атомно-силовая микроскопия применяется для реализации различных режимов нанолитографии с помощью силового, теплового или электрического воздействия. Сканирующая капиллярная микроскопия стала эффективным инструментом направленного массопереноса отдельных биомакромолекул, наночастиц и пр. [11]. Многоканальные зонды можно использовать для 3D-печати заданных молекулярных конфигураций. Подача макромолекул через капилляр проводится различными способами, например, с помощью электрофореза или путем создания в капилляре избыточного давления.

Двумерная литография флуоресцентными белками была успешно выполнена на сканирующем ион-проводящем микроскопе с применением двухканального капилляра в работе [11]. Таким способом была создана цветная миниатюрная копия картины Дега "Танцовщицы". Размер миниатюры соответствовал диаметру волоса (около 50 мкм).

Сканирующая капиллярная стереолитография имеет определенные преимущества по сравнению с лазерной стереолитографией, пространственное разрешение которой ограничено дифракционным

In the biosensor control unit, the electronic boards of the scanning probe microscope are used, including a digital frequency synthesizer, a precision amplifier of the input signal, an interface for communication with a computer unit, a thermostat of the flowing liquid cell, a DAC-ADC, a stabilized power supply, and a digital signal processor. A number of technical solutions including the symmetry of the design of the biochip and of the electronic circuit for supplying and removing the signal have made it possible to significantly improve the accuracy and reliability of measurements [7].

In the conducted experiments the sensitivity for detection of the influenza A virus at the level of 10^5 units in ml. was achieved [8]. The possibility of detecting low concentrations of microalbumin in biological fluids using a piezoceramic biochip with sensory layers based on monoclonal antibodies was demonstrated [9].

The use of the original design of a flowing liquid cell and a piezoceramic biochip as a substrate in the scanning probe microscope allows real-time observation of adsorption of individual virus particles with simultaneous registration of the shift of the resonant frequency of mechanical oscillations of the

biochip. With the help of such measurements it is possible to calibrate the biochip, which is necessary for practical applications in medicine. Accurate measurement of the size of virus particles can be performed using the previously developed nanometer gauge [10].

CAPILLARY STEREOLITHOGRAPHY

Since its development, atomic force microscopy has been used to implement various modes of nanolithography with the help of power, heat, or electrical impact. Scanning capillary microscopy has become an effective tool for directed mass transfer of individual

пределом, составляющим около половины длины волны лазерного излучения. В капиллярной микроскопии достигается нанометровая и субнанометровая точность позиционирования. Диаметр выходного капилляра может варьироваться в диапазоне от единиц до сотен нанометров, что открывает возможность создания молекулярного 3D-принтера.

При изготовлении одноканальных или многоканальных нанокapилляров для стереолитографии используются стеклянные микротрубочки из кварца или боросиликатного стекла, широко применяемые для решения электрофизиологических задач.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно прогнозировать дальнейшее расширение использования сканирующего капиллярного микроскопа в биомедицинских приложениях и тестировании лекарственных средств с использованием всего лишь одной клетки, а не их культуры [12]. Также быстро и успешно развиваются практические применения сканирующей зондовой микроскопии для задач молекулярной медицины, в частности, раннего обнаружения вирусов в воздушных средах и жидкостях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проекты 17-52-560001 и 16-29-06290).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Novak P., Li Ch., Shevchuk A., et al. Nature Methods. 6 (4). 2009. 279.
2. Seifert J., Rheinlaender J., Lang F., Gawaz M., Schäffer T.E. Scientific Reports. 7. 2017. 4810.
3. Seifert J., Rheinlaender J., Novak P., Korchev Y.E., Schäffer T.E. Langmuir. 31. 2015. 6807–6813.
4. Kodera N., et al. Nature. 468. 2010. 72.
5. Яминский И. НАНОИНДУСТРИЯ. 2015. 5 (59). 40–43.
Yaminsky I. NANOINDUSTRY. 2015. 5 (59). 40–43.
6. Actis P., Tokar S., Clausmeyer J., Babakinejad B., et al. ACS Nano. 8 (1). 2014. 875–884.
7. Ахметова А.И., Назаров И.А., Яминский И.В. Медицина и высокие технологии. 1. 2017. 5.
Akhmetova A.I., Nazarov I.A., Yaminsky I.V. Medicine and high technologies. 1. 2017. 5.
8. Gorelkin P.V., Erofeev A.S., Kiselev G.A., et al. Analyst. 140. 2015. 6131.
9. Ахметова А., Назаров И., Преснова Г., et al. НАНОИНДУСТРИЯ. 2017. 8 (79). 44.
Akhmetova A., Nazarov I., Presnov G., et al. NANOINDUSTRY. 2017. 8 (79). 44.
10. Мешков Г.Б., Яминский Д.И., Яминский И.В. Патент на изобретение № 2538029. опубликовано 10.01.2015.
Meshkov G.B., Yaminsky D.I., Yaminsky I.V. Patent for invention No. 2538029. Published on January 10, 2015.
11. Rodolfa K.T., Bruckbauer A., Zhou D. et al. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 2005. 44. 6854.
12. Яминский И. НАНОИНДУСТРИЯ. 2016. 1(63). 76.
Yaminsky I. NANOINDUSTRY. 2016. 1 (63). 76.

biomacromolecules, nanoparticles, etc. [11]. Multi-channel probes can be used for 3D printing of specified molecular configurations. The supply of macromolecules through the capillary is carried out in various ways, for example, by electrophoresis or by creating excess pressure in the capillary.

Two-dimensional lithography with fluorescent proteins was successfully performed on a scanning ion-conductance microscope with the use of a two-channel capillary in [11]. In this way, a color miniature copy of the Degas "Dancers" was created. The size of the miniature corresponded to the diameter of the hair (about 50 microns).

Scanning capillary stereolithography has certain advantages over laser stereolithography, the spatial resolution of which is limited by the diffraction limit that is about half the wavelength of the laser radiation. Capillary microscopy achieves nanometer and subnanometer positioning accuracy. The diameter of the output capillary can vary from a few to hundreds of nanometers, which opens the possibility of creating a molecular 3D printer.

When manufacturing single-channel or multichannel nanocapillaries for stereolithography, glass microtubules made of quartz or borosilicate glass are used, which

are widely used to solve electrophysiological problems.

CONCLUSION

It is possible to predict further expansion of the use of a scanning capillary microscope in biomedical applications and testing of drugs using only one cell, rather than their culture [12]. Practical applications of scanning probe microscopy for molecular medicine problems, in particular, early detection of viruses in air and liquid media, are also rapidly and successfully developed. ■

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (Projects 17-52-560001 and 16-29-06290).