

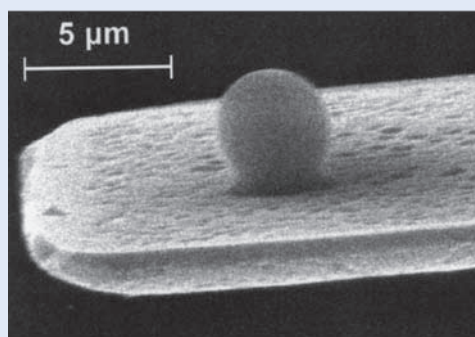
СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОНАНОСКОПИИ

На Второй международной конференции "Современные достижения бионаноскопии", проходившей на физическом факультете МГУ им. М.В.Ломоносова 17–19 июня 2008 года, рассматривались современные методы микроскопии высокого разрешения, достижения в сфере сканирующей зондовой микроскопии и сопутствующие физико-химическим методам принципы исследования биологических объектов.

Методические аспекты практического обучения зондовой микроскопии, представленные к.ф.-м.н. Г.Мешковым (МГУ), включали анализ базовых принципов проведения нано- и микроскопических исследований, незнание которых приводит к появлению артефактов. Сложность изучения биополимерных объектов обусловлена, в частности, тем, что в отличие от измерений, проводимых в сфере зондовой микроскопии, молекулярными биологами изготавливаются образцы, на поверхность которых исследуемый материал должен быть нанесен равномерно, поэтому при применении таких методов качество результатов напрямую зависит от опыта и базы знаний экспериментатора.

Доклад д.ф.-м.н., профессора И.Яминского (МГУ, НПП "Центр перспективных технологий") о современных достижениях бионаноскопии включал обзор данных по исследованию нуклеиновых кислот, белковых комплексов и кристаллов и изучению бактериальных клеток и вирусных частиц [1–2]. Докладчик отметил, что параллельно с совершенствованием инструментов 3D-визуализации нанобъектов живой природы (РНК и ДНК, липополисахариды и белки, бислойные мембраны и их комплексы) развиваются технологии бионаноскопии молекулярного узнавания. В них изучение физики взаимодействия биомолекул основано на зондовой микроскопии с постановкой прецизионных экспериментов и анализе результатов парного взаимодействия отдельных молекул заранее определенной структуры и состава [2–3]. Отмечена перспективность исследований по невозмущающему закреплению молекул на твердой подложке с установлением взаимосвязи между конформационными состояниями макромолекул и регистрируемыми силовыми воздействиями и конструирования реальных сенсорных систем на основе принципов молекулярного узнавания.

Организации лабораторного Интернет-практикума на базе микроскопа Фемтоскан было посвящено выступление А.Филонова (НПП "Центр перспективных технологий"). Клиент – серверная архитектура программного обеспечения позволяет работать как непосредственно с микроскопом, так и удаленно с обменом данными между клиентом и сервером по протоколу TCP/IP. При одновременном подключении к серверу нескольких клиентов для предотвращения конфликта в управлении прибором только один пользователь управляет микроскопом, а остальные получают доступ к результатам сканирования, что соответствует схеме работы "учитель–ученики". Во встроенном чате можно наблюдать состояние всех подключенных пользователей и вести диалог с мгновенным обменом сообщениями, на встроенном веб-сервере размещаются данные видеозахвата – обзорные изображения приборов или отсканированные изображения образцов, интегрируемые в веб-сайт лаборатории для просмотра результатов через веб-браузер.



Зонд для исследования упругих свойств объектов (изображение на сканирующем электронном микроскопе)

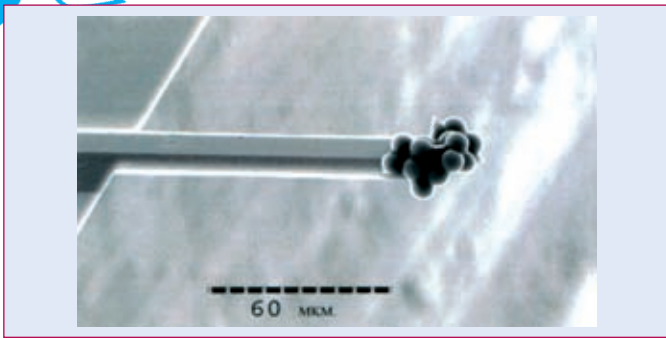
Совместную работу Казанского физико-технического института им. Е.К.Завойского, Казанского государственного университета и Казанского института биохимии и биофизики по исследованиям упругих свойств биологических объектов при помощи атомно-силового микроскопа (АСМ) представил Д.Лебедев. Поскольку отсутствие информации о точной форме зонда усложняет расчет модуля Юнга и силы адгезии, а также в условиях, близких к естественным (*in vitro*), при исследовании мягких биологических объектов (бактерий и клеток) вследствие малого радиуса закругления зонда (30–100 нм) его надавливание может легко разрушить клетку [4] для измерения упругих свойств биообъектов созданы и испытаны новые зонды.

В отличие от стандартных зондов на специальную кремниевую балку вместо обычного острого конического зонда крепится кварцевый шарик диаметром от нескольких сотен нм до десятков мкм. Большая контактная площадь позволяет снизить давление на поверхность и проводить эксперименты на мягких биообъектах без их повреждений; полнота информации о размере и форме зондов повышает точность вычислений модуля Юнга, отражающего упругие свойства мембраны клетки, что может быть использовано для диагностики многих заболеваний и подбора эффективных лекарственных препаратов [5].

В выступлении Д.Давыдова (химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, кафедра высокомолекулярных соедине-

ний) об изучении формирования трехкомпонентных липидных бислоев на слюде методом АСМ на примере двухкомпонентных липосом, состоящих в соотношении 4:1 из цвитер-ионного фосфатидил холина и отрицательно заряженного кардиолипина, демонстрировалось получение отрицательно заряженного липидного бислоя на поверхности слюды методом "спин-коутинга" [6]. Соблюдение условий получения бислоя способствовало формированию мембраны с минимальным количеством дефектов. Показано, что в трехкомпонентном липидном бислое протекает процесс латеральной сегрегации. Поскольку общие принципы получения многокомпонентных липидных мембран на плоскости пока не разработаны, предложенные методы могут применяться для изучения модификаций наноконтейнеров для моделирования механизмов доставки лекарственных препаратов в поврежденные клетки.

Доклад к.ф.-м.н. Е.Дубровина о проведенном исследовании на физическом факультете МГУ им. М.В.Ломоносова и в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Института теоретической и экспериментальной физики им. А.И.Алиханова методами АСМ биоспецифичных взаимодействий на поверхностях был посвящен проблеме идентификации изучаемого объекта на изображении и фильтрации помех от загрязнений и примесей. Для селекции исследуемых и "паразитных" объектов предлагается их специфическое взаимодействие со специально приготовленной поверхностью, что было проиллюст-



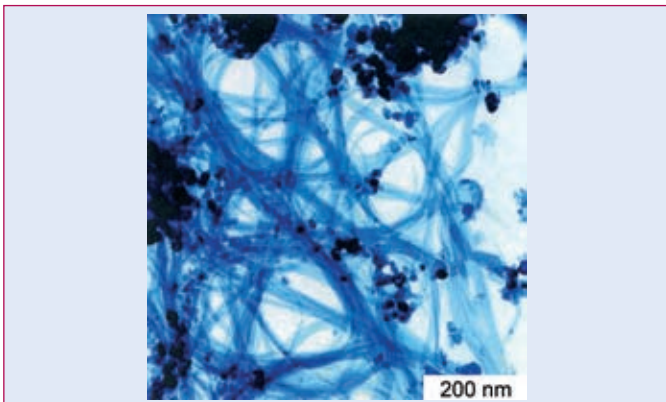
Взвешивание микрочастиц с помощью кантилевера

рировано результатами изучения поверхностей, специфичных к бактериальным клеткам и их фрагментам.

В сообщении к.ф.-м.н. Г.Киселева о ходе совместных исследований Института физической химии и электрохимии РАН им. А.Н.Фрумкина, МГУ им. М.В.Ломоносова и ООО "Академия биосенсоров" по конструированию микромеханических биосенсоров на основе атомно-силовой микроскопии предложена модель модифицированных различными веществами массива кантилеверов, способных определять тип внешнего химического воздействия по гистограмме откликов отдельных датчиков. Отмечена также возможность применения кантилевера в качестве микровесов: замер массы тонких пленок и присоединенных микроскопических объектов производится по контролю частоты его собственных колебаний.

Аспирант Института элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН О.Синицина выступила с докладом по проблеме воздействия углеродных нанотрубок на здоровье людей. В исследованиях по применению нанотрубок в медицине [7,8], в частности, для регенерации костной ткани [9] рассмотрены возможности их проникновения внутрь клеток через клеточные мембраны и посредством эндоцитоза [7, 10]. В ходе экспериментов при воздействии многостенных нанотрубок на стволовые клетки эмбрионов мышей было выявлено повышение частоты мутаций [11]. В опытах с мышами [12] было показано, что попадание нанотрубок в легкие способствовало образованию гранулем, нанотрубки также токсичны для кожи [13]. Все это подтверждает необходимость комплексных исследований и оценки риска здоровья людей, работающих с нанотрубками.

В совместном исследовании "ДНК вегетативных форм и наночастиц патогенна *Mycoplasma gallisepticum* S6 методом АСМ"



Полученное методом просвечивающей зондовой микроскопии изображение жгутов одностенных углеродных нанотрубок (ООО "Карбонлайт")

(Казанский институт биохимии и биофизики РАН и Казанский госуниверситет, докладчик – М.Трушин) было показано, что вегетативные клетки микоплазм могут превращаться в наночастицы с изменением биохимических и физиологических клеток данных микробов [14], а также выявлены различия патогенности вегетативных клеток и наночастиц микоплазм [15]. Ранее обнаруженные изменения активности некоторых генов в процессе нанотрансформации вегетативных клеток микоплазм в наночастицы [16] позволяют предположить взаимосвязь между изменениями экспрессии генов наночастиц и линейных молекул ДНК.

На сессии также были представлены доклады по наномеханическим кантилеверным сенсорам со встроенным оптическим считыванием данных, по снижению поперечных блужданий оптического пучка диафрагмированием для повышения чувствительности АСМ, по морфологии биосовместимых полимерных антибактериальных покрытий, по модификации поверхности полиметилметакрилата кислородной плазмой и вакуумным ультрафиолетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V. Atomic Force Microscopy Examination of TMV and Virion RNA. – FEBS Letters, 1998, 425, p. 217–221.
2. Gallyamov M.O., Drygin Yu.F., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy visualization of RNA and ribonucleotides of the tobacco mosaic virus. – Surface investigation, 2000, 15, p. 1127–1134.
3. Filonov A.S., Yaminsky I.V. FemtoScan Scanning Probe Microscopy Image Processing Software User's Manual. – M.: Advanced Technologies Centre, 2008. – 86 с.
4. Kurihara K. Adv. in Colloid and Interface Sci. – 1997, 71–72, p. 243–258
5. Dulinska O., Yargosz M. et al. – J. Biochemical and Biophysical Methods, 2006, 66, p. 1–11.
6. Richter R.P., Brisson A.R. – Biophys J. 2005, 88 (5), p. 3422–3433.
7. Bianco A., Kostarelos K., Prato M. – Current Opinion in Chemical Biology, 2005 9, p. 674–679.
8. Bianco A., Kostarelos K., Partidos Ch.D., Prato M. – Chemical Communications, 2005, 4, p. 71–577.
9. Usui Y., Aoki K., Narita N., et al. – Small, 2008, 4, p. 240–246.
10. Porter A.E., Gass M., Muller K., Skepper J.N., Midgley P. A., Welland M. – Nature nanotechnology, 2007, 2, p. 713–717.
11. Zhu L., Chang D.W., Dai L., Hong Y. – Nanoletters, 2007, 7 (12), p. 3592–3597.
12. Lam Ch.-W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L. – Toxicological Sciences, 2004, 77, p. 126–134.
13. Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O. – Carbon, 2006, 44, p. 1070–1078.
14. Чернов В.М., Мухаметшина Н.Е., Гоголев Ю.В., Абдрахимов Ф.А., Чернова О.А. – Микробиология, 2005, 74 (4), p. 498–504.
15. Chernov V.M., Moukhametshina N.E., Gogolev Y.V., Nesterova T.N., Trushin M.V., Chernova O.A. – The Scientific World Journal, 2007, 10, 7, p. 1–6.
16. Chernov V.M., Moukhametshina N.E., Gogolev Y.V., Nesterova T.N., Trushin M.V., Chernova O.A. – Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2006, 14 (4), p. 369–376.