



МЕТОДЫ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ И СПЕКТРОСКОПИИ

METHODS OF PROBE MICROSCOPY USED FOR MAGNETIC RESONANCE TOMOGRAPHY AND SPECTROSCOPY

И.В.Яминский^{1,2,3,4}, д.ф.-м.н., проф., генеральный директор Центра перспективных технологий, директор Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0001-8731-3947), А.И.Ахметова^{1,2,3}, инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0001-6363-8202), Г.Б.Мешков¹, к.ф.-м.н., ст. науч. сотрудник, физический ф-т МГУ имени М.В.Ломоносова (ORCID: 0000-0003-3930-3730), О.В.Синицына⁴, к.х.н., науч. сотрудник (ORCID: 0000-0003-3381-6156) / yaminsky@nanoscopus.ru

I.V.Yaminsky^{1,2,3,4}, Doctor of Sc. (Physics and Mathematics), Prof., Director of Advanced Technologies Center, Director of Energy Efficient Technologies, (ORCID: 0000-0001-8731-3947), A.I.Akhmetova^{1,2,3}, Engineer of A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies, (ORCID: 0000-0001-6363-8202), G.B.Meshkov¹, PhD in Physical and Mathematical Sciences, Senior Researcher of Physics Faculty of Lomonosov Moscow State University, (ORCID:0000-0003-3930-3730), O.V.Sinitsyna⁴, Cand. of Sc. (Chemistry), Scientific Researcher, (ORCID: 0000-0003-3381-6156)

DOI: 10.22184/1993-8578.2019.12.5.280.283

Получено: 02.08.2019 г.

Повышение чувствительности, пространственного и временного разрешения в магнитно-резонансной томографии и спектроскопии биологических объектов в естественных средах является актуальной задачей, которую можно решить, совместив методы сканирующей зондовой микроскопии и ЯМР-спектроскопии. Оригинальная программно-аппаратная платформа позволит одновременно проводить измерение морфологии, структуры и молекулярного состава биомакромолекул, иммобилизованных на поверхности твердой подложки.

Nowadays, the crucial task in the spectroscopy of biological objects in the natural conditions and magnetic resonance tomography is to increase the spatial and time resolution and sensitivity. It may be solved by combining the methods of scanning probe microscopy and NMR spectroscopy. It was shown that the original hardware and software platform permits to measure simultaneously the morphology, structure and molecular composition of biomacromolecules immobilized on a hard substrate surface.

Сканирующая зондовая микроскопия позволяет визуализировать объекты с атомным разрешением на воздухе и в жидкости [1, 2]. В настоящее время методы совмещенной оптической и сканирующей зондовой микроскопии

активно применяются для повышения чувствительности, пространственного и временного разрешения магнитно-резонансной томографии (МРТ). С помощью азото-замещенной вакансии в алмазе осуществлена регистрация спинового

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments

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

³ ООО "Энергоэффективные технологии" / Energy Efficient Technologies

⁴ Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН / A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences



магнитного резонанса от одиночной белковой молекулы [3]. Сканирующим туннельным микроскопом с помощью магнитного резонанса получено изображение одиночного атома Ti с субнангстромным пространственным разрешением [4] и зарегистрированы различные изотопы Fe (56 и 57 а.е.м.) [5]. Также с помощью метода магнитного резонанса определено конкретное расположение изотопов титана на поверхности адатомов кристалла MgO. Атомы азота в вакансиях алмазной решетки могут служить в качестве магнитометров атомного размера, что позволяет измерять поляризацию ядер в ансамблях [6] и регистрировать отдельные спины [7], в том числе в обычных условиях на воздухе [8]. Общеизвестно, что, несмотря на существенные успехи, МРТ обладает меньшей чувствительностью, чем, например, масс-спектрометрия, вследствие незначительной величины ядерного намагничивания. Преодолеть этот недостаток позволяет использование спиновой гиперполяризации ядер исследуемых веществ, спиновых меток и новых импульсных радиофизических методов регистрации полезных сигналов.

Основная цель нашего проекта состоит в получении новых данных о структуре и молекулярном строении биологических молекул (белков, вирусов, бактерий, клеток) и их комплексов в естественных средах с помощью измерительной аппаратуры МРТ на базе методов сканирующей

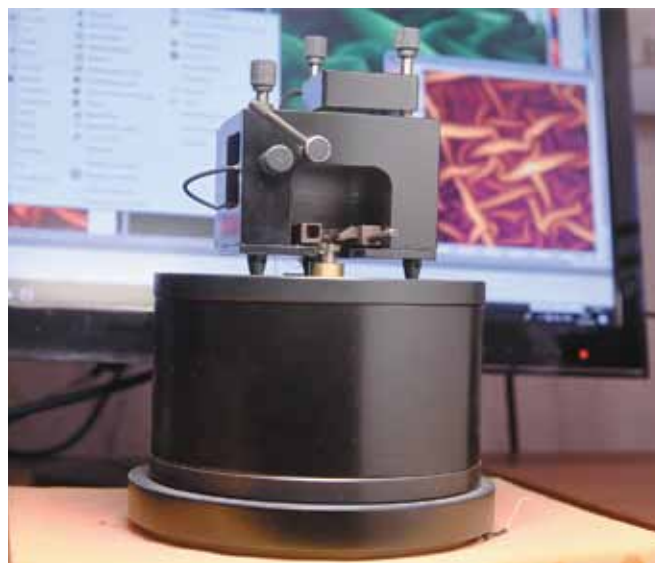


Рис.1. Сканирующий зондовый микроскоп "ФемтоСкан"
Fig.1. FemtoScan scanning probe microscope

зондовой микроскопии. Ключевым в данной работе является разработка и использование специальных кантилеверов с магнитными свойствами в сочетании с оптимизированными прецизионными методами регистрации сигнала в резонансных и импульсных режимах для достижения субнанометрового пространственного разрешения в естественных для биологических

Scanning probe microscopy allows to visualize objects with atomic resolution in air and liquid [1,2]. Nowadays, methods of combined optical and scanning probe microscopy are actively used to increase the sensitivity, spatial and temporal resolution of magnetic and resonance imaging (MRI). Registration of spin magnetic resonance from a single protein molecular was carried out using nitrogen-vacancy center [3]. Obtained is the image of a single atom of Ti with sub-micron spatial resolution [4] and different isotopes of Fe (56 and 57 a.m.u) [5] were registered using scanning tunnel microscope with the magnetic resonance. Besides, a specific arrangement of titanium isotopes placed on

the MgO crystal adatoms surface was determined by magnetic resonance method. Atoms of nitrogen placed in vacancies of a diamond lattice may be used as the atom scale magnetometers and permit to measure polarization of nuclei in ensembles [6] and register the separate spins [7] including measurements in air under normal conditions [8]. Despite the meaningful progress, it is well known that MRI has a lower sensitivity than mass-spectrometry because of insignificant value of the nuclear magnetization. It is necessary to use the spin hyperpolarization of nuclei of the investigated substances and spin markers along with the pulse radio-physical methods of useful signal registration.

The main idea of our project is to obtain the new data about structure and molecular composition of biological molecules (proteins, viruses, bacteria, cells) and their complexes in natural environments by applying MRI measuring equipment using the scanning probe microscopy. The key aim of our research is to develop and use special magnetic cantilevers with optimized precision signal registration methods to record signals in resonance and pulse modes in order to achieve the subnanometer spatial resolution in natural environments for biological objects such as air and liquids.

The unique design of cantilevers is due to use of:



объектов средах – на воздухе и в жидкости. Оригинальность конструкций кантилеверов заключается в использовании:

- зондов на основе алмаза с внедренными атомами азота,
- зондов с ферромагнитными включениями нанометрового масштаба,
- зондов с молекулярными конструкциями острия на базе единичных атомов и их кластеров.

Многофункциональная сканирующая зондовая микроскопия позволит достичь высокого пространственного разрешения в МРТ благодаря многочисленным режимам: сканирующей туннельной, атомно-силовой, сканирующей резистивной, капиллярной, магнитно-силовой, кельвин-микроскопии, электросиловой микроскопии в сочетании с микроскопией магнитно-резонансной томографии. Для достижения высокого временного разрешения будет доработана и модернизирована быстродействующая электроника сканирующего зондового микроскопа "ФемтоСкан" (рис.1) и программное обеспечение "ФемтоСкан Онлайн" [9]. В частности, в электронику будет интегрирована система выделения слабого сигнала в шумовом фоне с использованием синхронного усилителя SR844 (Stanford Research Systems, Великобритания). Измерения будут проводиться с использованием прецизионных цифро-аналоговых и аналогово-цифровых преобразователей разрядностью 20 бит и тактовой частотой 1 МГц.

Использование гиперполяризованного изотопа $Xe129$ для визуализации клеточных структур,

нанопор и ионных каналов в мембране клеток позволяет существенно повысить уровень полезного сигнала.

Ксенон взаимодействует со многими различными рецепторами и ионными каналами клеток и является перспективным кандидатом в качестве анестетика. Ксенон является антагонистом рецептора NMDA с высоким сродством к глициновому сайту [10]. Следует заметить, что ксенон не является нейротоксичным и оказывает нейропротекторное действие. В работе планируется визуализировать ингибирование ксеноном Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны, а также изучить пространственное расположение других ионных каналов клеточной стенки. Для этих целей будет использоваться водный физиологический раствор, обогащенный изотопом ксенона $Xe129$.

Гиперполяризованный ксенон можно использовать также для определения химического состава поверхности. Обычно представляется трудным охарактеризовать поверхности с помощью ЯМР, поскольку сигналы от поверхности существенно меньше сигналов от атомных ядер в объеме образца, которые намного более многочисленны, чем поверхностные ядра. Однако ядерные спины на твердых поверхностях можно избирательно поляризовать, перенеся на них спиновую поляризацию из гиперполяризованного ксенонового газа. Это делает поверхностные сигналы достаточно сильными, чтобы измерять и отличать от объемных сигналов. Соответствующие эксперименты

- diamond-based probes with embedded atoms of nitrogen;
- probes with nano-scale ferromagnetic inclusions;
- probes with molecular composition of a tip based on the single atoms and their clusters.

Multifunctional scanning probe microscopy is applied to achieve a high spatial resolution in MRI due to a number of modes, such as scanning tunnel, scanning resistive, capillary, atomic power magnetic-force, Kelvin microscopy and electric power microscopy combined with the magnetic resonance tomography. To achieve a high temporal resolution, the high-speed electronics of the FemtoScan

scanning probe microscope (see Fig.1) and the FemtoScan Online software [9] will be finalized and upgraded. In particular, a system for extracting a weak signal out of background noise using the SR844 synchronous amplifier (Stanford Research Systems, Great Britain) will be integrated into electronics. Measurements will be carried out using precision digital-to-analog and analog-to-digital converters of 20 bits capacity and a clock frequency of 1 MHz.

Use of the hyperpolarized $Xe129$ isotope to visualize cell structures, nanopores and ion channels in the cell membrane makes it possible to significantly increase the useful

signal level. Xenon interacts with many different receptors and ion channels of cells and is a promising candidate as an anesthetic. Xenon is an antagonist of the NMDA receptor with high affinity to glycine site [10]. Moreover, xenon is not neurotoxic and has a neuroprotective effect. It is planned to visualize inhibition of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by xenon and to study the spatial arrangement of other ion channels of the cell wall. For these purposes, an aqueous saline solution enriched by xenon $Xe129$ isotope will be applied.

Hyperpolarized xenon can also be applied to determine chemical composition of the surface. It is usually



могут быть проведены совмещенными методами сканирующей зондовой микроскопии и ядерного магнитного резонанса. Для локальной доставки растворов, обогащенных гиперполяризованным ксеноном, следует использовать сканирующую капиллярную микроскопию.

В работе планируется использовать алмазные подложки с внедренными атомами азота в качестве квантовых магнетометров. Для анализа биомолекул, вирусов и клеток следует использовать совмещенные методы атомно-силовой микроскопии и ЯМР-спектроскопии. Дополнительно требуется оценить возможности по использованию алмазных зондов с внедренными атомами азота в качестве магниточувствительного сенсора (квантового магнитометра) с оптической регистрацией сигнала.

В результате будет создана экспериментальная установка, совмещающая возможности сканирующей зондовой микроскопии и метода спинового резонанса со следующими параметрами:

- измерения в контролируемой газовой атмосфере клеточных структур и модельных образцов;
- измерения в гелиевой атмосфере (изотоп ксенона с атомной массой 129) клеточных структур и модельных образцов;
- изучение контраста ЯМР сигнала клеточной мембраны от содержания в растворе гиперполяризованного ксенона.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-52-560001.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. **Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B.** Advanced methods of high-speed probe microscopy for biomedicine and new functional materials // *NANOINDUSTRY*. 2019. V. 12. No.3 (89). PP. 22-24.
2. **Akhmetova A.I., Yaminsky I.V.** FemtoScan Online Software in solving problems of biology and medicine // *Medicine and High Technologies*. 2019. № 1. P. 16-22.
3. **Shi F. et al.**, Single-protein spin resonance spectroscopy under ambient conditions // *Science* 347, 2015, 1135-1138.
4. **Willke P. et.al.**, Magnetic resonance imaging of single atoms on a surface // *Nature Physics*. 2019.
5. **Willke P. et.al.**, Hyperfine interaction of individual atoms on a surface // *Science* 362, 2018, 336-339.
6. **Mamin H.J. et al.**, *Science* 339, 2013, 557-560. T. Staudacher et al., *Science* 339, 561-563, 2013.
7. **Sushkov A.O. et al.**, *Phys. Rev. Lett.* 113, 197601, 2014.
8. **Childress L., Walsworth R.L., Lukin M.D.**, *Phys. Today* 67, 38-43, 2014.
9. **Яминский И., Филонов А., Сеницына О., Мешков Г.** Программное обеспечение "ФемтоСкан Онлайн" // *НАНОИНДУСТРИЯ*. 2016. № 2(64). С. 42-46.
10. **Banks P., Franks N.P., Dickinson R.** Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor mediates xenon neuroprotection against hypoxia-ischemia // *Anesthesiology*. 112 (3): 614-22, 2010.

difficult to characterize surfaces using NMR because the signals from the surfaces are much weaker than the signals from atomic nuclei in the sample volume as far as their quantity is much greater than the surface nuclei number. However, it is possible to selectively polarize the nuclei spins on the solid surfaces by transferring on them the spin polarization from hyperpolarized xenon gas. This operation makes the surface signals sufficiently strong to measure them and distinguish from volume signals. Corresponding experiments may be carried out by using combined methods of scanning probe microscopy and nuclear magnetic resonance. For local

delivery of the solutions enriched by hyperpolarized xenon it is advisable to apply the capillary microscopy. We planned to use the diamond substrates with embedded atoms of nitrogen as quantum magnetometers. To analyze biomacromolecules, viruses and cells, the combined methods of atomic power microscopy and NMR spectroscopy should be applied. Additionally it is necessary to assess a possibility to use diamond probes with embedded atoms of nitrogen as a magnetic sensor (quantum magnetometer) with optical detection of the signal. As a result, an experimental installation that combines possibilities of scanning probe microscopy

and the spin resonance method will be developed to enable the following measurements and studies:

- measurements in controlled gaseous atmosphere of cell structures and model samples;
- measurements in helium atmosphere (xenon isotope 219) of cell structures and model samples;
- study of NMR contrast of cell membrane signal from the content of hyperpolarized xenon in the solution. ■

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research in the framework of scientific project No. 17-52-560001.