



БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ И СКАНИРУЮЩАЯ КАПИЛЛЯРНАЯ МИКРОСКОПИЯ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ, БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

HIGH-SPEED ATOMIC FORCE AND SCANNING CAPILLARY MICROSCOPY IN SOLVING PROBLEMS OF MATERIALS SCIENCE, BIOLOGY AND MEDICINE

И.В.Яминский^{1,2,3,4}, д.ф.-м.н., профессор МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, генеральный директор Центра перспективных технологий, директор Энергоэффективных технологий, вед. науч. сотр. ИНЭОС РАН, (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) / yaminskiy@nanoscopy.ru

I.V.Yaminskiy^{1,2,3,4}, Doctor of Sc. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center, Director of Energy Efficient Technologies, Leading Sci. of INEOS RAS, 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

DOI: 10.22184/1993-8578.2020.13.3-4.222.228

Получено: 19.05.2020 г.

Разработка высокоэффективных режимов быстродействующего сканирующего зондового микроскопа, в первую очередь атомно-силовой и сканирующей капиллярной микроскопии, представляет особый интерес для успешного проведения биомедицинских исследований: изучения биологических процессов и морфологии биополимеров, определения антибиотикорезистентности бактерий, адресной доставки биомакромолекул, скринингу лекарств, раннему обнаружению биологических агентов (вирусов и бактерий) и т.д.

The development of highly efficient modes of a high-speed scanning probe microscope, primarily atomic force and scanning capillary microscopy, is of particular interest for successful biomedical research: studying biological processes and the morphology of biopolymers, determining antibiotic resistance of bacteria, targeted delivery of biomacromolecules, drug screening, early detection agents (viruses and bacteria), etc.

Визуализация биологических объектов в естественных средах в движении с высокой разрешающей способностью, не нарушая их функций, – крайне сложная задача. Исследования последних лет подтверждают, что динамическая структура и морфология белков и клеток, выявленные с помощью быстродействующего сканирующего зондового микроскопа (СЗМ), могут дать уникальную

информацию о том, как функционируют различные клеточные процессы на молекулярном уровне.

Благодаря СЗМ стало возможно наблюдение за такими процессами, как движение РНК-полимеразы вдоль ДНК, конформационные изменения мембранных белков, движение хроматина, рост белковых кристаллов и др. Несмотря на то, что быстродействующий сканирующий

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 ИНЭОС РАН, Москва, Россия / INEOS RAS, Russia.



зондовый микроскоп открывает существенные перспективы для изучения биомакромолекул и клеточных процессов, сам по себе он продолжает оставаться уникальным прибором, доступным только самым передовым лабораториям микроскопии в мире.

Цепочка созданных нами приборов СЗМ "Скан-8" (1987), "ФемтоСкан" (1996), "ФемтоСкан X" (2012) пополнилась в настоящее время совмещенным атомно-силовым и сканирующим капиллярным микроскопом "ФемтоСкан Xi" (2019). Возможности сканирующей капиллярной микроскопии существенно шире, чем просто наблюдение трехмерного рельефа поверхности биологических объектов с низкой механической жесткостью [1, 2]. Использование многоканальных капилляров в качестве зондов позволяет проводить мультипараметрический анализ клеток. Химическая модификация одного или нескольких каналов капилляра превращает зонд в электрохимический наносенсор [3]. Капилляры с двумя или несколькими каналами дают возможность реализовать направленный массоперенос веществ, биомакромолекул (пептидов, белков, нуклеиновых кислот и пр.) на поверхность биообъекта или внутрь его объема

(например, доставлять антибиотик к бактерии). Электрохимические электроды, встроенные в капилляр, перспективны для определения концентрации веществ вблизи клеточной мембраны.

Большой потенциал капиллярной микроскопии может быть реализован в биомедицинских приложениях, клинической диагностике, в тестировании лекарственных средств с использованием не культуры клеток, а всего лишь одной клетки.

Таким образом, СЗМ в настоящее время является идеальным и передовым методом для характеристики динамики сложного молекулярно-биологического механизма в условиях, близких *in vivo*.

Развитие зондовой микроскопии идет одновременно с решением сложных радиофизических задач:

- временной синхронизации большого числа независимых приемных и управляющих сигналов для систем нелинейной обратной связи;
- адаптивных алгоритмов цифровой обработки данных с использованием сверхбыстродействующих ПЛИС-контроллеров (FPGA);
- развития элементов искусственного интеллекта и информационной базы данных для принятия решений в сложных системах с нелинейной обратной связью;

Visualization of moving biological objects in natural habitat with high resolution without disturbance of their functionality is an extremely complicated task. Investigations of last years confirm that dynamical structure and morphology of proteins and cells obtained by high-speed scanning probe microscope (SPM) can provide unique information about functionality of various cellular processes at the molecular level.

Because of SPM it has become possible to observe such processes as the movement of RNA polymerase along DNA, conformational changes in membrane proteins, chromatin movement, growth of protein crystals, etc. Despite the fact that a high-speed scanning probe microscope opens up significant prospects for studying biomacromolecules and cellular

processes, it stays a unique instrument available only for the most advanced microscopy laboratories of the world.

The chain of SPM devices we created Scan-8 (1987), FemtoScan (1996), FemtoScan X (2012) has now been replenished with a combined atomic force and scanning capillary microscope FemtoScan Xi (2019). Possibilities of scanning capillary microscopy are much broader than simply observing 3D relief of biological objects surfaces with low mechanical strength [1, 2]. Use of the multichannel capillaries as probes makes it possible to provide a multiparameter analysis of cells. Chemical modification of one or several channels of capillary turns the probe into an electrochemical nanosensor [3]. Capillaries with two or more

channels make it possible to accomplish directed mass transfer of substances, biomacromolecules (peptides, proteins, nucleic acids, etc.) to the surface of a biological object or inside its volume (for example, to deliver an antibiotic to bacteria). Electrochemical electrodes embedded in the capillary are promising for determining the concentration of substances near the cell membrane.

The great potential of capillary microscopy can be realized in biomedical applications, clinical diagnostics, in drug testing using not a cell culture, but just one cell.

Thus, SPM is currently an ideal and advanced method for characterizing the dynamics of a complex molecular biological mechanism under conditions close to *in vivo*.

The probe microscopy development proceeds in parallel with

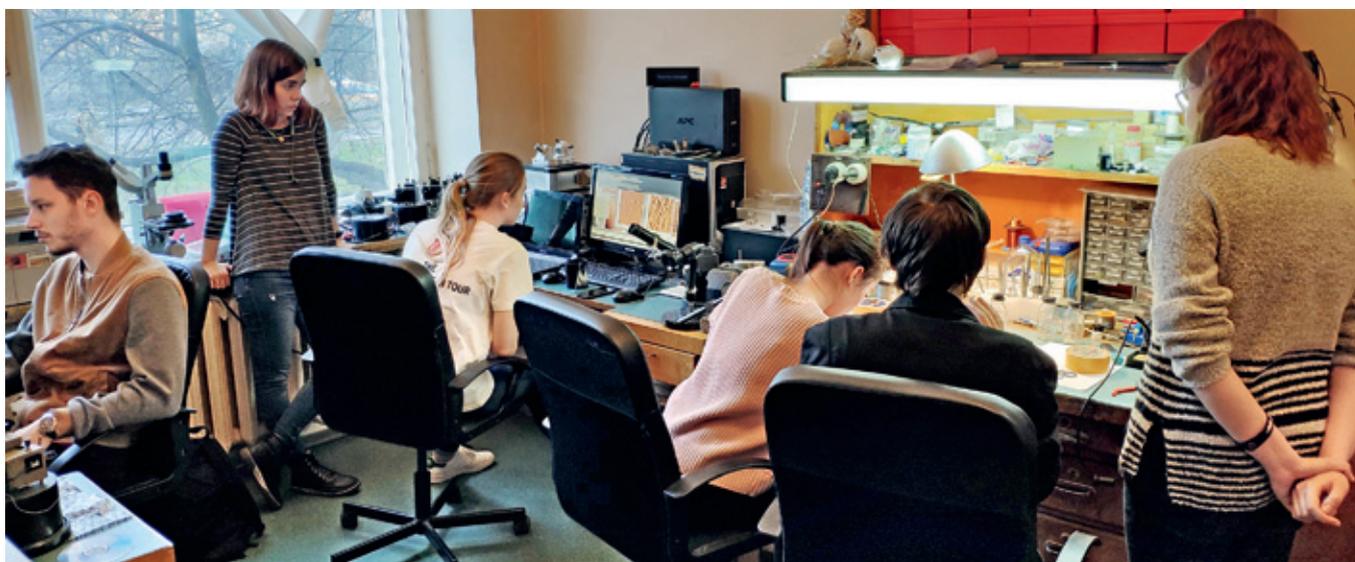


Рис.1. Практическое занятие по сканирующей зондовой микроскопии на химическом факультете МГУ. Занятие проводят преподаватели ЦМИТ "Нанотехнологии" физического факультета И.Пылев и Т.Гончарова

Fig.1. Scanning probe microscopy class at the Chemical Department of MSU. Classes are conducted by lecturers of the YICC "Nanotechnology" of the Physical Department I.Pylev and T.Goncharova

- формирования и обработки сигналов с использованием аналого-цифровых и цифро-аналоговых преобразователей мегагерцового и гигагерцового диапазонов.

В области наномеханики успешно решаются следующие задачи:

- сверхточное позиционирование (с точностью до сотых долей нанометров) зонда на больших полях размером до 200 мкм;

- минимизация температурного дрейфа за счет использования высокой симметрии механической конструкции до сотых долей нанометров в минуту;
- оптимизация габаритных размеров системы сканирования благодаря поиску новых решений – электромагнитного сканирования, пьезо-керамического сканирования с использованием новых материалов, термосканирования на основе минисканеров с низкой теплоемкостью и других

solving of complicated radiophysical problems:

- time synchronization of a large number of independent receiving and control signals for non-linear feedback systems;
- adaptive digital data processing algorithms using ultra-fast FPGAs;
- development of artificial intelligence elements and an information database for decision-making for complex systems with non-linear feedback;
- generation and processing signals using analog-to-digital and digital-to-analog converters in the megahertz and gigahertz ranges.

In the field of nanomechanics, the following tasks are successfully solved:

- probe precise positioning (with an accuracy of hundredths of a nanometer) on large fields up to 200 microns in size;
- temperature drift minimization due to the use of high symmetrical mechanical structure - up to hundredths of nm/min;
- overall dimensions optimization of the scanning system due to the search of new solutions - electromagnetic scanning, piezoceramic scanning using new materials, thermal scanning based on miniscanners

with low heat capacity and other possible principles, selection and justification of optimal modes of movement;

- obtaining high-speed probes with an operating frequency in the range of 10-100 MHz;
- scientific foundations development of the nanometer displacements metrology; In the software field the relevant tasks are the following:
- achieving sustainable adaptive feedback with self-learning elements;
- automatic generation of an image database with storage in an intelligent repository;



возможных принципов, выбор и обоснование оптимальных режимов перемещений;

- получение быстродействующих зондов с рабочей частотой в диапазоне 10–100 МГц;
- разработка научных основ метрологии нанометровых перемещений.

В области программного обеспечения актуальными задачами являются следующие:

- достижение устойчивой адаптивной обратной связи с элементами самообучения;
- автоматическое формирование базы данных изображений с хранением в интеллектуальном репозитории;
- построение системы распознавания образов динамических процессов в живой природе;
- создание новых алгоритмов обработки и визуализации многомерных данных, в том числе с применением режимов виртуальной реальности и искусственного интеллекта.

Среди важных фундаментальных проблем можно назвать задачу определения физико-химических характеристик и свойств отдельных молекул полимера, таких как форма и конформация полимера, молекулярно-массовое распределение, тип ветвления, мобильность, адгезия, индуцированные различными факторами конформационные изменения. Стоит подчеркнуть, что эти характеристики, относящиеся к отдельным молекулам (в отличие от усредненных характеристик по ансамблю), не могут быть получены никакими другими методами, кроме методов СЗМ. Некоторые из этих свойств полимеров, такие как вид и степень разветвленности

(например, у полиолефинов), являются важными для технологических применений, поскольку значительно влияют на ключевые эксплуатационные свойства полимерных материалов.

Еще одним классом фундаментальных проблем является вопрос самоорганизации отдельных макромолекул на различных подложках. Образующиеся в результате молекулярные архитектуры могут быть использованы для дизайна функциональных структур и шаблонов на микро- и нанометровых масштабах. Такие шаблоны, отличающиеся по степени гидрофильности/гидрофобности оптической активностью и электромагнитными свойствами, могут применяться в различных нанобиотехнологиях для создания сенсорных материалов, в нанолитографии, для хранения данных, в оптической связи, в биосенсорике и т.д.

Большое внимание уделяется вопросу исследования многокомпонентных полимерных материалов с помощью СЗМ. Композиционное картирование таких материалов является самым важным примером промышленного применения СЗМ. Многокомпонентные полимерные материалы распространены во многих сферах промышленности и поэтому являются предметом постоянного совершенствования, что требует изучения различных аспектов их морфологии и свойств на нанометровом масштабе. Возникновение в последние годы нерезонансного осциллирующего режима работы атомно-силового микроскопа открывает большие перспективы для композиционного картирования материалов, однако понимание взаимодействия кантилевера

- building a pattern recognition system for dynamic processes in living nature;
- new algorithms creating for processing and visualization of multidimensional data using virtual reality and artificial intelligence modes.

Among the fundamental problems are the task of determining the physicochemical characteristics and properties of individual polymer molecules, such as polymer shape and conformation, molecular weight distribution, branching type, mobility, adhesion, conformational changes induced by various factors. It is worth emphasizing that these

characteristics pertaining to individual molecules (in contrast to the ensemble averaged characteristics) cannot be obtained by any methods other than SPM methods. Some of these polymer properties, such as the type and degree of branching (for example, for polyolefins) are important for technological applications, since they significantly affect the key performance properties of polymer materials.

Another class of fundamental problems is the self-organization of individual macromolecules on various substrates. The resulting molecular architectures can be used to design functional structures and

patterns at micro and nanometer scales. Such patterns, differing in the degree of hydrophilicity/hydrophobicity, optical activity and electromagnetic properties, can be used in various nanobiotechnologies, for creating sensor materials, in nanolithography, for storing data, in optical communication, in biosensorics, etc.

Much attention is paid to the study of multicomponent polymer materials using SPM. Composite mapping of such materials is the most important example of industrial applications of SPM. Multicomponent polymeric materials are widespread in many industries and therefore are

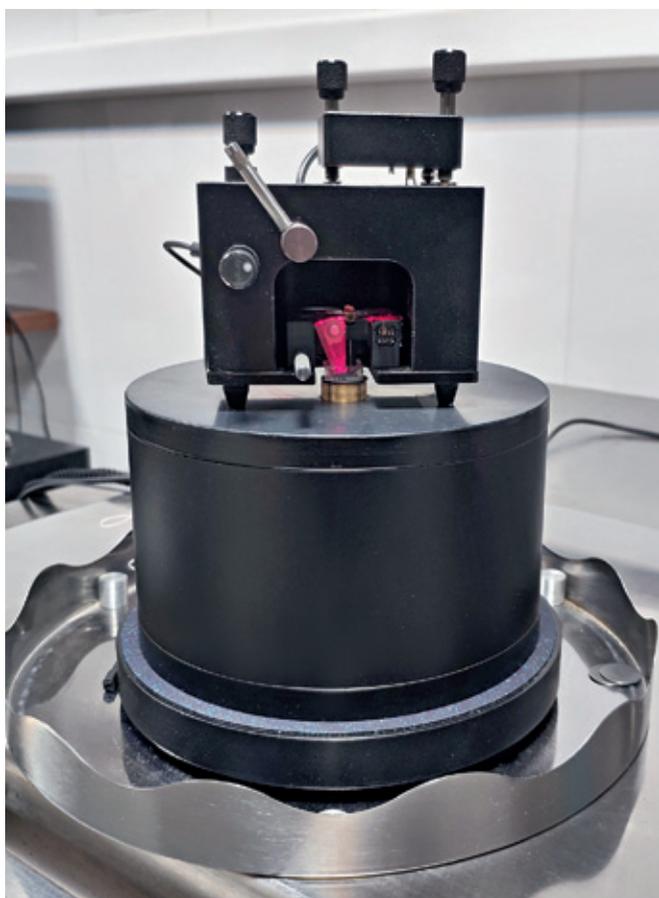


Рис.2. Сканирующий зондовый микроскоп "ФемтоСкан" в Технологическом университете им. Шарифа. Измерения в жидкости

Fig.2. FemtoScan scanning probe microscope at the Sharif University of Technology. Measurements in a liquid

с образцом и интерпретация данных в этом режиме в настоящее время недостаточно развиты.

В настоящее время из-за постоянного уменьшения размеров функциональных структур и устройств существует большая потребность в количественных измерениях локальных механических и электрических свойств полимерных материалов. Большинство существующих методов анализа силового взаимодействия материалов использует консервативные модели (модели Герца, Снеддона, Джонсона – Кендалла – Робертса, Дерягина – Мюллера – Торопова), не учитывающие вязкоупругие эффекты. Использование таких моделей значительно ограничивает область их применимости. Для преодоления этих ограничений требуется разработка методов количественного анализа наномеханических данных с учетом вязкоупругого поведения и результатов электрических режимов работы СЗМ.

В настоящее время не удастся визуализировать биологические процессы (рост клеток высших организмов, инфицирование клеток вирусом, конформационные переходы в хромосомах и пр.) в естественных средах с высоким пространственным разрешением (на уровне долей нанометра) и необходимой временной детализацией в единицы миллисекунд и менее. Изучение спектров колебаний бактерий и клеток в широком диапазоне частот при одновременном измерении их морфологии открывает новые возможности в области структурной биологии: исследование стабильности вирусов, взаимодействие препаратов на бактериальные клетки и вирусы, решение задач адресной доставки

subject to continuous improvement, that requires their morphology and properties at a nanometer scale study. The emergence in recent years of a non-resonant oscillating mode of atomic force microscope operation opens up great prospects for composite mapping of materials, however, understanding of the cantilever interaction with a sample and interpretation of data in this mode is currently underdeveloped.

Currently, due to the functional structures and devices continuous reduction in size, there is a great need for quantitative measurements of the polymer materials local mechanical and electrical

properties. Most of the existing methods for analyzing the materials force interaction use conservative models (models of Hertz, Sneddon, Johnson-Kendall-Roberts, Deryagin-Muller-Toropov) that do not take into account viscoelastic effects. The use of such models significantly limits their applicability. To overcome these limitations, it is required to develop quantitative analysis methods of nanomechanical data, taking into account the viscoelastic behavior and the results of the SPM electrical operating conditions.

At present, it is not possible to visualize biological processes (cell growth of higher organisms, virus

infection of cells, conformational transitions in chromosomes, etc.) in natural environments with high spatial resolution (at the level of fractions of a nanometer) and the necessary temporal detail of a few milliseconds or less. Studying the bacteria and cells vibrational spectra in a wide range of frequencies while measuring their morphology opens up new possibilities in the structural biology field: studying the stability of viruses, the interaction of drugs on bacterial cells and viruses, and solving the problems of targeted biological substances delivery into tissues. The structural and dynamic characteristics of a

биологических веществ в ткани и пр. Структурные и динамические характеристики белковой молекулы играют центральную роль в обеспечении их биологических функций. Быстродействующая сканирующая зондовая микроскопия открывает широкие перспективы изучения белковых макромолекул в динамике. Она становится практическим инструментом при проектировании ДНК- и белковых биочипов, перспективных для дальнейшего использования в медицинской диагностике. При этом становится возможным широкое использование биосенсоров, построенных на биоспецифическом взаимодействии без использования каких-либо маркеров.

Высокоскоростной СЗМ позволяет наблюдать динамические молекулярные процессы, происходящие на поверхностях живых бактерий и в эукариотических клетках.

Актуальность широкого внедрения в научную практику методов высокоскоростной сканирующей зондовой микроскопии (ВСЗМ), включая адресную доставку реагентов, обусловлена требованиями современной медицины, в том числе задачами

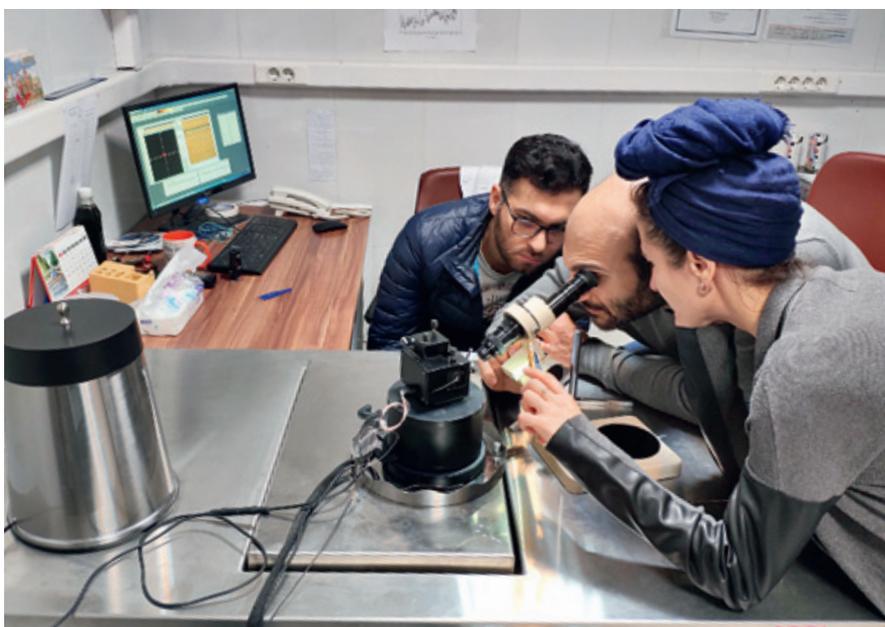


Рис.3. Проведение измерений на сканирующем зондовом микроскопе "ФемтоСкан" в Технологическом университете им. Шарифа

Fig.3. Taking measurements using a FemtoScan scanning probe microscope at the Sharif University of Technology

молекулярной диагностики и персонализированной медицины.

При создании аппаратуры ВСЗМ и появлении ее на рынке высоких технологий появится новая область молекулярной медицины с широким спектром применения и возможностей, многие из которых сейчас предсказать не удастся. Перспективные

protein molecule play a central role in ensuring their biological functions. High-speed scanning probe microscopy opens up broad prospects for a study of protein macromolecules in dynamics. It becomes a practical tool in the design of protein and DNA biochips that are promising for further use in medical diagnostics. At the same time, widespread use of biosensors based on biospecific interaction without the use of any markers becomes possible.

High-speed SPM makes it possible to observe dynamic molecular processes occurring on the surfaces of living bacteria and in eukaryotic cells.

Relevance of the widespread introduction into scientific practice of high-speed scanning probe microscopy (HS SPM) methods, including targeted delivery of reagents, is due to the requirements of modern medicine, including the tasks of molecular diagnostics and personalized medicine.

With the creation of the HSSPM equipment and its emergence on the high-tech market, a new field of molecular medicine will appear with a wide range of applications and capabilities, many of which cannot be predicted now. Promising areas are the clinical diagnosis of infectious diseases, drug screening,

targeted delivery of substances to tissues, etc. In the field of fundamental applications, there is a unique opportunity for experimental observation of processes in living nature in their temporary development in liquid.

Scanning capillary microscopy is necessary in physical basics development of 2D and 3D printing processes with polymers, biomacromolecules, viral and virus-like particles to solve the problems of molecular and cellular medicine, and design biosensors. 2D and 3D printing using capillary microscopy can be carried out with biomacromolecules and biological objects: DNA,



области – клиническая диагностика инфекционных заболеваний, скрининг лекарств, адресная доставка веществ в ткани и пр. В области фундаментальных применений появляется уникальная возможность экспериментальных наблюдений процессов в живой природе в их временном развитии в жидких средах.

Сканирующая капиллярная микроскопия необходима при разработке физических основ процессов 2D- и 3D-печати полимерами, биомакромолекулами, вирусными и вирусоподобными частицами для решения задач молекулярной и клеточной медицины, конструирования биосенсоров. 2D- и 3D-печать с помощью капиллярной микроскопии может проводиться биомакромолекулами и биообъектами: ДНК, РНК, белками, липидами, вирусами и вирусоподобными частицами. Визуализация структур может осуществляться как атомно-силовой, так и сканирующей капиллярной микроскопией.

Последовательность ДНК играет важную роль в сборке нуклеосом. И хотя мотивы ДНК с высокой специфичностью к нуклеосомам были определены, остаются неясными такие важные вопросы: "Как последовательность ДНК меняет ее конформацию и как последовательность ДНК способствует взаимодействию между нуклеосомами?"

Ответы на эти вопросы можно получить с помощью зондовой микроскопии. Высокоскоростная сканирующая зондовая микроскопия используется для прямой визуализации структуры и динамики ДНК. Возможности высокого временного и пространственного разрешения ВСЗМ приведут к новым моделям и описаниям функциональных

механизмов этих биологических систем. ВСЗМ способна непосредственно визуализировать динамику конформации ДНК, комплексов белок-ДНК и белковых олигомеров с временным интервалом сбора данных в единицы микросекунд.

Реализуемый с помощью капиллярного микроскопа метод 2D-печати существенно отличается от метода планарной литографии. Сканирующий капиллярный микроскоп позволяет отслеживать рельеф неровной и шероховатой поверхности и, соответственно, реализовывать 2D-печать на этой поверхности. В этом смысле данный метод фактически является разновидностью 3D-печати.

В настоящем кратком очерке удалось раскрыть только часть того удивительного и увлекательного направления, которым является быстродействующая и совмещенная атомно-силовая и сканирующая капиллярная микроскопия. Многие достижения и открытия еще впереди.

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. Scanning capillary microscopy // NANOINDUSTRY. 2017. № 7 (78). PP. 42–47.
2. Yaminsky I.V. Scanning capillary microscopy // NANOINDUSTRY. 2016. № 1 (63). PP. 76–79.
3. Paolo A., Sergiy T., Jan C. et al. Electrochemical nanopores for single-cell analysis // ACS Nano. 2014. Vol. 8. No. 1. P. 875–884.

RNA, proteins, lipids, viruses and virus-like particles. Visualization of structures can be carried out both by atomic force and scanning capillary microscopy.

The DNA sequence plays an important role in the assembly of nucleosomes. Although DNA motifs with high specificity for nucleosomes have been identified, such important issues as the DNA sequence changes its conformation and how the DNA sequence facilitates the interaction between nucleosomes remain unclear.

Answers to these questions can be obtained using probe microscopy. High-speed scanning probe

microscopy is used to directly visualize the structure and dynamics of DNA. Possibilities of high temporal and spatial resolution of the HS SPM will lead to new models and descriptions of the biological systems functional mechanisms. HS SPM is able to directly visualize the dynamics of DNA conformation, protein-DNA complexes and protein oligomers with a time interval of data collection in units of milliseconds.

The 2D printing method implemented with the aid of a capillary microscope differs significantly from the planar lithography method. A scanning capillary microscope

allows you to track the relief of an uneven and rough surface and, accordingly, implement 2D printing on this surface. In this sense, this method is actually a form of 3D printing.

In this short essay, we managed to reveal only part of that amazing and fascinating direction, which is high-speed and combined atomic force and scanning capillary microscopy. Many achievements and discoveries are yet to come. ■

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

Testing&Control

27–29 октября 2020
Москва, Крокус Экспо

17-я Международная выставка
испытательного и контрольно-
измерительного оборудования



testing-control.ru



Измерительное
и метрологическое
оборудование



Оборудование
для лабораторного
контроля



Испытательное
оборудование



Оборудование
для неразрушающего
контроля и технической
диагностики



Производственный
контроль и машинное
зрение



Системы диагностики
и мониторинга

Получите бесплатный
электронный билет по промокоду
technosphera20

Организатор



Международная
Выставочная
Компания

+7 (495) 252 11 07
control@mvk.ru