



Получено: 16.03.2023 г. | Принято: 20.03.2023 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.2.88.94>

Научная статья

ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ: НОВЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ФИЗИКИ, ХИМИИ, БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

А.И.Ахметова^{1, 2}, мл. науч. сотр., вед. спец., ORCID: 0000-0002-5115-8030

О.В.Иванов^{1, 2}, магистр, инженер, ORCID: 0000-0003-2765-2116

Н.Е.Максимова^{1, 2}, магистр, программист, ORCID: 0000-0001-7385-6799

Т.О.Советников^{1, 2}, магистр, инженер, ORCID: 0000-0001-6541-8932

А.Д.Терентьев^{1, 2}, магистр, программист, ORCID: 0009-0009-1528-5284

И.В.Яминский^{1, 2}, д.ф.-м.н., профессор МГУ имени М.В. Ломоносова, генеральный директор Центра перспективных технологий, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Аннотация. С момента первой публикации по сканирующей зондовой микроскопии [1] прошел 41 год. За это время сканирующие зондовые микроскопы, позволяющие заглянуть в наномир, стали практическими инструментами физиков, химиков, биологов, медиков, производителей и учителей. Зондовые микроскопы образовали обширное семейство высокоточных и высокоинформативных приборов для наблюдения топографии, морфологии и широкого спектра физико-химических свойств изучаемых объектов. При этом выдавая детализацию получаемых данных на уровне долей нанометра с временным разрешением в миллисекунды. Остались ли нерешенные задачи? Конечно! Об их небольшой части, о задачах и проблемах в зондовой микроскопии ведется рассказ в этой статье.

Ключевые слова: обменное взаимодействие, шумы и флуктуации, физика живых систем, сканирующая зондовая микроскопия, бионаноскопия, приборостроение

Для цитирования: А.И. Ахметова, О.В. Иванов, Н.Е. Максимова, Т.О. Советников, А.Д. Терентьев, И.В. Яминский. Теория и практика сканирующей зондовой микроскопии: новые решения для физики, химии, биологии и медицины. НАНОИНДУСТРИЯ. 2023. Т. 16, № 2. С. 88–94. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.2.88.94>.

Received: 16.03.2023 | Accepted: 20.03.2023 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.2.88.94>

Original paper

THEORY AND PRACTICE OF SCANNING PROBE MICROSCOPY: NEW SOLUTIONS FOR PHYSICS, CHEMISTRY, BIOLOGY AND MEDICINE

A.I.Akhmetova^{1, 2}, Junior Researcher, Leading Specialist, ORCID: 0000-0002-5115-8030

O.V.Ivanov^{1, 2}, Master, Engineer, ORCID: 0000-0003-2765-2116

N.E.Maksimova^{1, 2}, Master, Programmer, ORCID: 0000-0001-7385-6799

T.O.Sovetnikov^{1, 2}, Master, Engineer, ORCID: 0000-0001-6541-8932

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical department, Moscow, Russia

² ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia



A.D.Terentiev^{1,2}, Master, Programmer, ORCID: 0009-0009-1528-5284

I.V.Yaminsky^{1,2}, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., General Director of Advanced Technologies Center, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Abstract. 41 years have passed since the first scanning probe microscopy publication [1]. During this time, scanning probe microscopes, which make it possible to look into the nanoworld, have become practical tools for physicists, chemists, biologists, doctors, industrialists and teachers. Probe microscopes have formed an extensive family of high-precision and highly informative instruments for observing topography, morphology, and a wide range of physicochemical properties of studied objects. At the same time, detailing of the data obtained is at the level of nanometer with milliseconds time resolution. Are there any unresolved issues? Certainly! Our story is about a small part of them, about the tasks and problems in probe microscopy.

Keywords: exchange interaction, noise and fluctuations, physics of living systems, scanning probe microscopy, bionanoscopia, instrumentation

For citation: A.I. Akhmetova, O.V. Ivanov, N.E. Maximova, T.O. Sovetnikov, A.D. Terentiev, I.V. Yaminsky. Theory and practice of scanning probe microscopy: new solutions for physics, chemistry, biology and medicine. NANOINDUSTRY. 2023. V. 16, no. 2. PP. 88–94. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.2.88.94>.

ВВЕДЕНИЕ

Сканирующая зондовая микроскопия успешно продвигается по пути развития теоретических основ физики поверхности, структуры и локальных свойств наноструктур, в том числе живой материи – биомакромолекул, вирусов, бактерий и клеток (рис.1, 2). За последние четыре десятилетия накоплен большой теоретический и экспериментальный материал. Вместе с тем остается ряд нерешенных вопросов. Среди них следует перечислить следующие проблемы.

В сканирующей туннельной микроскопии нет полной теоретической модели шумов, проявляющихся в туннельном зазоре [2]. Например, интенсивность токового шума для подложки из золота оказывается выше, чем для графита. Кстати, если бы в природе не было бы шумов, флуктуаций и возмущений, то видимо вся физика свелась бы просто к математике с точными конечными результатами. Но это не так, поэтому все гораздо разнообразнее, интереснее и увлекательнее.

В атомно-силовой микроскопии нет точного количественного анализа основного взаимодействия, протекающего между зондом и поверхностью образца. Это взаимодействие, характеризующееся появлением реакции опоры и упругой силы, обусловлено квантово-механическим запретом – принципом Паули [3]. Зонд не проваливается сквозь образец, поскольку в одной точке пространства не могут находиться два электрона с одинаковым полным набором квантовых чисел. По этой же причине

INTRODUCTION

Scanning probe microscopy is successfully advancing the theoretical foundations of surface physics, structure and local properties of nanostructures, including living matter – biomacromolecules, viruses, bacteria and cells (Fig.1, 2). Over the last four decades a lot of theoretical and experimental material has been accumulated. However, there are still a number of unresolved issues. Among them, the following problems should be listed.

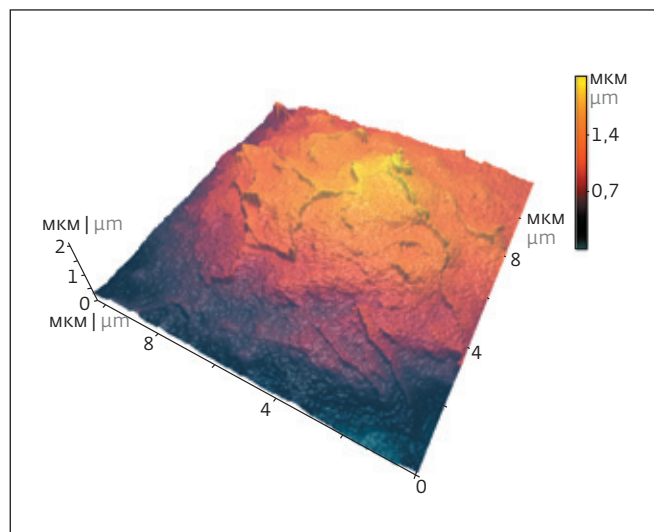


Рис.1. 3D-изображение поверхности клетки фибросаркомы HT1080 в области клеточного ядрышка. Сканирующая капиллярная микроскопия

Fig.1. 3D image of an HT1080 fibrosarcoma cell surface. Scanning capillary microscopy

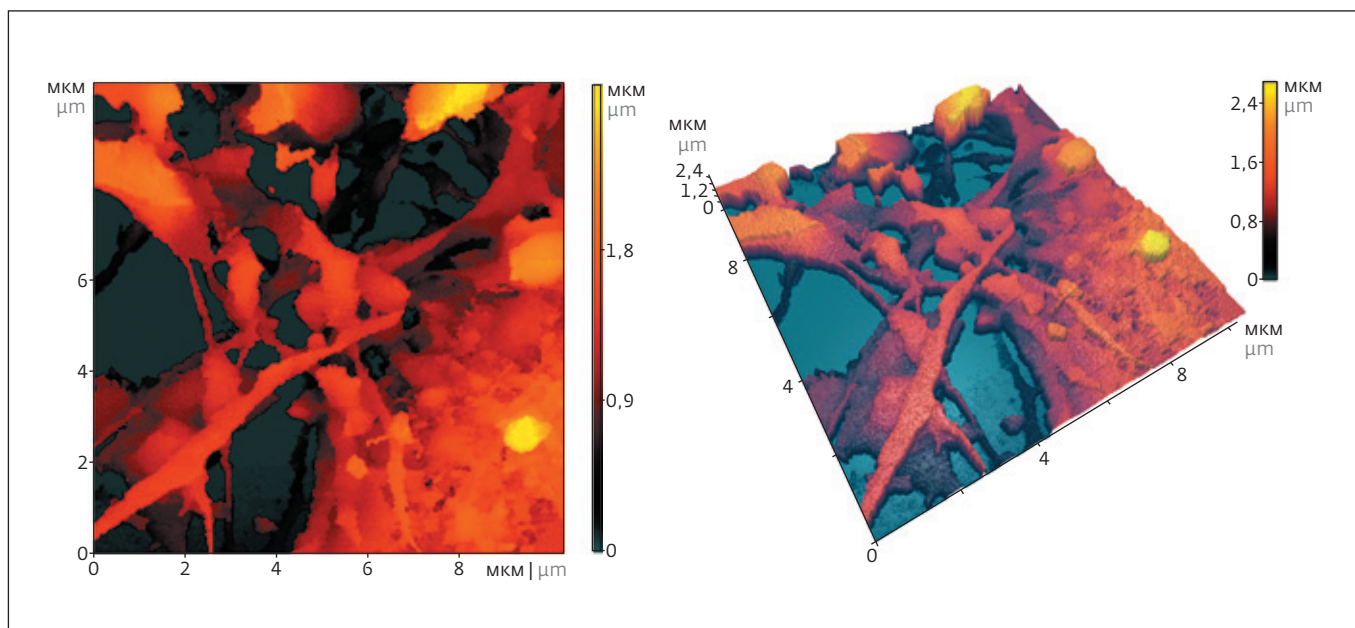


Рис.2. 2D- и 3D-изображения нейронов из эмбрионов крысы примерно на 14 день внутриутробного развития, сканирующая капиллярная микроскопия

Fig.2. 2D and 3D images of neurons from rat embryos approximately at 14 day of intrauterine development, scanning capillary microscopy

мы спокойно ходим по полу верхних этажей зданий, не проваливаясь вниз. Теоретический подход может сформулировать протокол эксперимента для прецизионного измерения характера этого взаимодействия, называемого обменным.

В сканирующей капиллярной микроскопии есть задачи расчета величины ионного тока в тонких капиллярах при наличии внутри капилляра биомакромолекул с учетом состояния поверхности биомакромолекул и внутренней поверхности капилляра. В настоящий момент очень важной задачей является теоретический расчет конфигурации измерительной системы сканирующего зондового микроскопа для обеспечения максимальной скорости и точности проводимых измерений. Существующие решения позволяют повысить скорость лишь за счет снижения качества получаемых изображений и данных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Развитие физических основ, теории и методов сканирующей зондовой микроскопии для различных приложений остается востребованной задачей. К успешным приложениям зондовой микроскопии относятся области биологии и медицины. Здесь важна не

In scanning tunnelling microscopy there is no complete noise theoretical model exhibited in the tunnelling gap [2]. For example, noise current intensity appears to be higher for gold substrate than for graphite. By the way, if there were no noise, fluctuations and disturbances in nature, apparently, all physics would simply reduce to mathematics with the exact final results. That is not the case, so everything is much more varied, interesting and fascinating.

In atomic force microscopy, there is no precise quantitative analysis of the main interaction occurring between the probe and sample surfaces. This interaction, characterized by appearance of a support reaction and an elastic force, is due to the quantum mechanical prohibition, the Pauli principle [3]. The probe does not fall through the sample because two electrons with the same full set of quantum numbers cannot be in the same point of space. For the same reason we walk quietly on the floor of upper floors of buildings without falling through. A theoretical approach can formulate an experimental protocol for precisely measuring the character of this interaction, called an exchange interaction.

In scanning capillary microscopy, the main task is to calculate the ionic current value in thin capillaries with biomacromolecules inside these



только 3D-визуализация объектов с нанометровым пространственным разрешением, но и определение их локальных физических и электрохимических свойств. Среди механических свойств – это жесткость, механическая прочность, стабильность, фрикционные свойства и пр. Важна также информация об адгезивных свойствах поверхности, величине поверхностного заряда, склонности к агрегации, реакционной способности и прочих параметрах.

У нашей группы имеется многолетний опыт развития методов сканирующей зондовой микроскопии, наблюдения и анализа различных объектов (рис.3), в том числе наиболее сложных и структурированных образцов живой материи – нуклеиновых кислот, белков, липидов, вирусов (рис.4), бактерий (рис.5) и живых клеток. Во всех этих случаях в ходе наблюдения проводился теоретический расчет, фильтрация, обработка, рациональная интерпретация и последующий анализ данных.

Для успешного развития любого научного начинания необходима системная работа по привлечению молодых исследователей – студентов и аспирантов к активному научному творчеству. На физическом факультете нами создан Центр молодежного инновационного творчества "Нанотехнологии" для привлечения к креативному научному труду активной молодежи, начиная со школьной скамьи. В этом году мы стали инициаторами и кураторами научного направления олимпиады "Робофест" по сканирующей зондовой микроскопии эритроцитов.

Молодые участники нашей группы часто вносили свой существенный вклад в развитие теории и практики сканирующей зондовой микроскопии. Правда, это происходило только в том случае, если мы с необходимым терпением, заботой, настойчивостью и вниманием оказывали им необходимую помощь для быстрого и эффективного освоения новой для них области знаний. Например, благодаря привлечению студента 2 курса физического факультета Александра Филонова к интенсивной научной работе был создан уникальный программный пакет по управлению сканирующим зондовым микроскопом и обработке наблюдаемых данных "ФемтоСкан Онлайн", который стал де-факто стандартом программного продукта по обработке, анализу и построению изображений в микроскопии сверхвысокого разрешения, включая зондовую, электронную и оптическую микроскопию [4, 5].

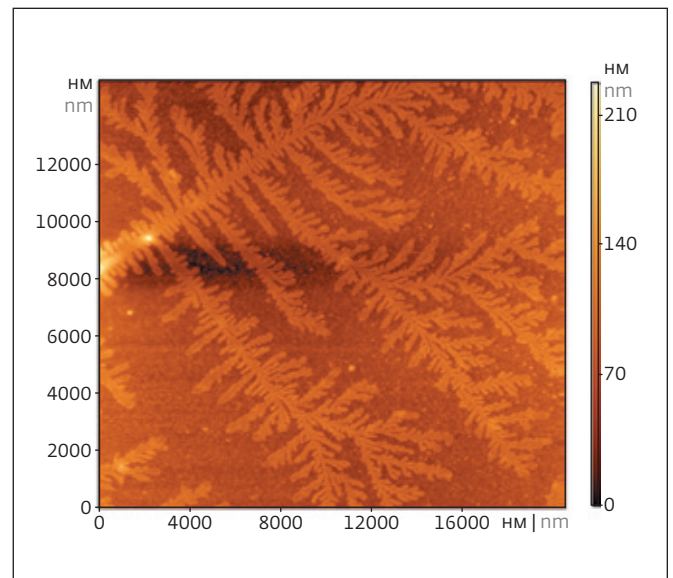


Рис.3. Кристаллы соли на поверхности графита

Fig.3. Salt crystals on the graphite surface

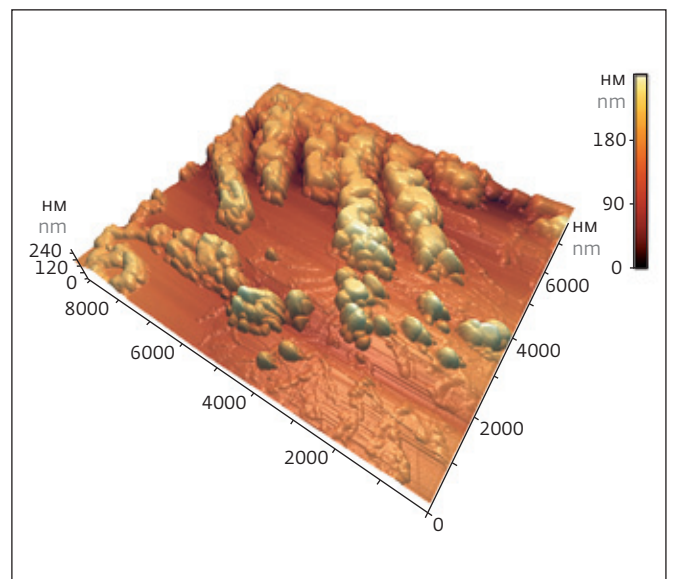


Рис.4. Изображение вируса гриппа на поверхности графита, контактный режим атомно-силовой микроскопии

Fig.4. Image of influenza virus on graphite surface, atomic force microscopy contact mode

capillaries, taking into account the surface state of the biomacromolecules and the state of the capillary inner surface. Currently, a very important task is the theoretical calculation of a scanning probe microscope probing system configuration for maximal measurement speed and accuracy. Existing solutions increase the measuring speed only due to image and data quality decrease.

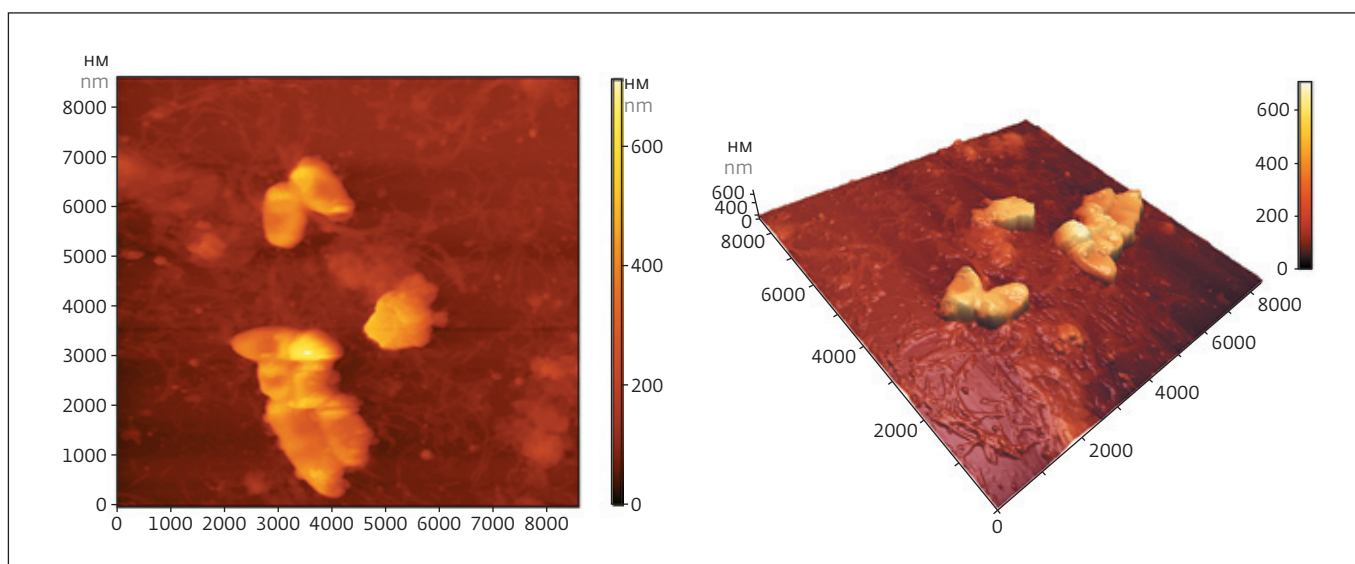


Рис.5. 2D- и 3D-изображения сенной палочки, контактный режим атомно-силовой микроскопии

Fig.5. 2D and 3D images of *Bacillus subtilis*, atomic force microscopy contact mode

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Студенты группы принимают активное участие в теоретическом моделировании протекающих процессов при взаимодействии зонд-образец. Проводят необходимые теоретические расчеты для оптимизации измерений на основе программируемых логических интегральных микросхем, в том числе, для увеличения скорости измерений [6]. В настоящее время студенты приступили к изучению и применению нейронных сетей и искусственного интеллекта как для управления режимами сбора данных, так и последующей обработки изображений. Среди последних достижений – поиск и выделение на полученном изображении характерных частиц, например, макромолекул, везикул, вирусов или бактериальных клеток.

В задачах по модернизации сканирующих зондовых микроскопов остро стоит вопрос дальнейшего проведения теоретического анализа и расчета основных факторов, препятствующих повышению чувствительности, точности и скорости проведения измерений. Часть этих факторов носит непреодолимый характер, обусловленный тепловым шумом, дробовым шумом вследствие дискретности заряда, низкочастотным (1/f) фликкер-шумом, квантовыми шумами. Другие возмущающие воздействия носят устранимый характер и бывают обусловлены различными техническими параметрами (плохо оптимизированной электроникой, неоптимальными техническими решениями и др.).

RESEARCH METHODS

The development of the physical foundations, theory and methods of scanning probe microscopy for a variety of widely necessary applications remains in demand. Successful probe microscopy applications include biology and medicine fields. Not only 3D visualisation of objects with nanometre spatial resolution is important here, but also determination of their local physical and electrochemical properties. Mechanical properties include stiffness, mechanical strength, stability, friction properties, etc. Information about surface adhesion, surface charge, aggregation tendency, reactivity and other parameters is also important.

Our team has many years of experience in developing scanning probe microscopy methods, observing and analysing various objects (Fig.3), including the most complex and structured samples of living matter – nucleic acids, proteins, lipids, viruses (Fig.4), bacteria (Fig.5) and living cells. In all these cases, theoretical calculation, filtering, processing, rational interpretation and subsequent data analysis were carried out during the observation.

The successful development of any scientific endeavour requires systematic work to attract young researchers – undergraduate and postgraduate students – to active scientific creativity. The "Nanotechnology" Youth Innovation Creativity Centre (YICC) was established at the physical department to attract active young people to creative scientific work, starting from their school years. This year, we initiated and supervised the Robofest Science Olympiad on scanning probe microscopy of erythrocytes.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ниже нами сформулированы задачи, решение которых имеет как научный, так и практический интерес. Среди этих задач:

1. Теоретический расчет характера воздействия и энергии возбуждающего сигнала со стороны зонда на поверхность образца для удаления одного атома из кристаллической решетки графита, экспериментальная проверка проведенного расчета.
2. Теоретическая оценка предельной фундаментальной чувствительности туннельного, атомно-силового и капиллярного микроскопов. Разработка метрологического сопровождения зондовой микроскопии.
3. Развитие теоретического подхода для расчета силового взаимодействия зонд-образец в приближении обменного взаимодействия (запрета Паули).
4. Теоретическая оценка спектра колебаний мембраны живой бактериальной клетки. Моделирование воздействия различных антибиотиков на жизненный цикл клетки и характера затухания подвижности мембраны клетки под действием антибиотика. Проведение натурных экспериментов.
5. Разработка теоретических моделей для оценки механической упругости клеток (фибробластов, остеобластов и др.) высших организмов и построения карты распределения жесткости по поверхности клетки.
6. Теоретическая оценка результатов нанолитографии и доставки реагентов в заданную область, осуществленных с помощью сканирующей капиллярной микроскопии.
7. Расчет теоретических моделей перспективных электрохимических и биологических сенсоров с применением многоканальных капилляров. Теоретическая оценка взаимного влияния сигналов с различных каналов.
8. Разработка образовательных программ для школьников и студентов в области теории и практики сканирующей зондовой микроскопии.
9. Другие работы, полезность выполнения которых обнаружится при решении сформулированных выше задач.

Важнейшая задача – это осуществление образовательной и обучающей деятельности, в основном направленной на привлечение студентов к изучению живой материи методами сканирующей зондовой микроскопии. Эта работа может проводиться как в рамках традиционных лекционных курсов и практических занятий лабораторного практикума, так и в проектной

The young members of our team have often made significant contributions to develop theory and practice of scanning probe microscopy. However, this happened only if we, with the necessary patience, care, persistence, and attention, provided them with the necessary assistance to quickly and effectively learn the new field of knowledge. For example, thanks to the involvement of 2nd year physics student Alexander Filonov in intensive research work, a unique software package for scanning probe microscope control and processing of observed data "FemtoScan Online" was developed, which became the de-facto standard software product for processing, analysis and construction of images in super-resolution microscopy including probe, electron and optical microscopy [4, 5].

RESULTS AND DISCUSSION

Students take an active part in theoretical modeling of processes in probe-sample interaction. They carry out necessary theoretical calculations to optimise measurements based on programmable logic integrated circuits, including increasing the speed of measurements [6]. Currently, students have begun to explore and apply neural networks and artificial intelligence to both the data acquisition modes management and subsequent image processing. Recent advances include the search and extraction of characteristic particles such as macromolecules, vesicles, viruses or bacterial cells in the captured image.

Scanning probe microscopes modernization require solving the problem of further theoretical analysis and main factors calculation, impeding the sensitivity increase, accuracy and speed of measurements is urgent. Some of these factors are insurmountable due to thermal noise, shot noise due to charge discreteness, low-frequency (1/f) flicker noise, and quantum noise. Other disturbing influences are avoidable and can be caused by various technical parameters (poorly optimised electronics, sub-optimal technical solutions, etc.).

CONCLUSIONS

Below we formulate the tasks that are of both scientific and practical interest. These tasks include:

1. Theoretical calculation of influence character and excitation signal energy from the probe side on a sample surface for removal of one atom from graphite lattice, and experimental check of calculations to be performed.
2. Theoretical estimation of limited fundamental sensitivity of tunneling, atomic force and capillary microscopes. Development the of probe microscopy metrological support.



работе новых форм обучения зондовой микроскопии. Такая просветительская работа проводится нами в мастерских Центра молодежного инновационного творчества "Нанотехнологии", в ходе работы Лаборатории зондовой микроскопии в рамках проектных школ МГУ "Вернадский" и в конкурсной программе олимпиады "Робофест".

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность правительству Москвы и Фонду "Московский инновационный кластер" за поддержку ЦМИТ "Нанотехнологии".

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Binnig G., Rohrer H., Gerber C., Weibel E.** Tunneling through a Controllable Vacuum Gap. *Appl. Phys. Lett.* 1982. V. 40. P. 178.
2. **Ge J., Ovidia M., Hoffman J.E.** Achieving low noise in scanning tunneling spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 2019. Vol. 90. P. 101401. <https://doi.org/10.1063/1.5111989>
3. **Pauli W.** On the connection between the occupation of groups of electrons in an atom and the complex structure of spectra (Received January 16, 1925) in Wolfgang Pauli Proceedings of Quantum Theory: Quantum Theory. General principles of wave mechanics. Articles 1920–1928. M.: Nauka, 1975. PP. 645–660.
4. **Filonov A.S., Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B.** FemtoScan Online! Why he? *NANOINDUSTRY*, 2018. Vol. 84(5), PP. 339–342. <http://dx.doi.org/10.22184/1993-8578.2018.84.5.336.342>
5. **Yaminsky I.V., Filonov A.S., Sinitsyna O.V., Meshkov G.B.** FemtoScan Online software. *NANOINDUSTRY*, 2016. Vol. 2. PP. 42–46.
6. **Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Maksimova N.E.** Software for scanning probe microscopy of bacterial cells. *Medicine and high technologies*, 2022. Vol. 4. PP. 5–6. <http://dx.doi.org/10.34219/2306-3645-2022-12-4-5-8>

3. Development of theoretical approach for computation of tip-sample force interaction in approximation of exchange interaction (Pauli prohibition).
4. Theoretical evaluation of living bacterial cell spectrum of membrane fluctuations. Modelling the effect of various antibiotics on the cell life cycle and the nature of cell membrane motility attenuation under antibiotic action. Carrying out the experiments in vivo.
5. Development of theoretical models to estimate mechanical stiffness of cells (fibroblasts, osteoblasts etc.) of higher organisms and generate a stiffness distribution map on a cell surface.
6. Theoretical evaluation of nanolithography and reagent delivery to a given area, carried out by scanning capillary microscopy.
7. Calculation of theoretical models of promising electrochemical and biological sensors using multichannel capillaries. Theoretical evaluation of mutual influence of signals from different channels.
8. Development of educational programmes for school-children and students in scanning probe microscopy theory and practice.
9. Other works which will be useful in solving the above-mentioned tasks.

The most important task is to carry out educational and training activities, mainly aimed at involving students in study of living matter by scanning probe microscopy. This work can be carried out as part of traditional lecture courses and practical laboratory practicals as well as in the project work teaching the new forms of probe microscopy. We carry out such educational work in workshops of the "Nanotechnology" Youth Innovation Creativity Centre in the probe microscopy laboratory as part of the Vernadsky Moscow State University project schools and in the Robofest Olympiad competition programme.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Government of Moscow and the Moscow Innovation Cluster Foundation for their substantial support the Energy Efficient Technologies Center.

PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

