

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И БИОМЕДИЦИНЫ

Д.Багров, Г.Мешков, О.Синицына, С.Смирнов, И.Яминский
yaminsky@nanoscopy.net

Современные методы наноаналитики – сканирующая зондовая микроскопия, атомные весы, оптическая микроскопия сверхвысокого разрешения за дифракционным пределом, флуоресцентная и интерференционная микроскопия – открывают новые возможности в медицинской диагностике на уровне отдельных биомакромолекул, вирусных частиц, клеток бактерий и высших организмов [1–3].

С помощью сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) удается наблюдать различия в морфологии кишечной палочки (*Escherichia coli*) и векторной вакцины против дизентерии – гибридной *E. coli*, унаследовавшей патоген от *Shigella flexneri* (рис.1).

Следует отметить, что бактерии *E. coli* в организме человека могут выполнять полезные функции – сбраживать глюкозу, лактозу и другие углеводы, служить вакциной или же, напротив, приводить к серьезным заболеваниям.

Недостаток СЗМ для медицинских приложений – на по-

лучаемые результаты влияют геометрические и механические характеристики исследуемых объектов.

Современная наноаналитика должна обеспечивать многопараметрический анализ образца, регистрируя отклики от него в результате механических, электрических, оптических и биоспецифических взаимодействий.

Ведущие мировые производители наноаналитики, например, компании "Карл Цейсс" и "Джеол" активно работают в области создания многофункциональных приборов. Такой подход наблюдается и у фирм,

выпускающих СЗМ, причем в создании платформ на основе СЗМ участвуют многие игроки.

В частности, немецкая компания "ВИТек" создает оборудование, в котором применяется рамановская микроскопия, совмещенная с атомно-силовым микроскопом (АСМ). Области применения разработки: химия, биология, фармацевтика, материаловедение.

Фирма "Бееко" создала прибор, в котором СЗМ совмещен с высокоапертурной оптической микроскопией. Область применения – биология.

Фирма "Агилент" выпустила совмещенный с АСМ флуоресцентный микроскоп.

В развитие мировых тенденций предлагается платформа «Бионаноскопия», существенное преимущество которой – одновременное применение работающих на предельно высоком разрешении как минимум пяти взаимно дополняющих друг друга наноаналитических методов.

Платформа позволяет проводить всесторонний анализ пробы в фиксированном объеме и потоке, при стабилизации

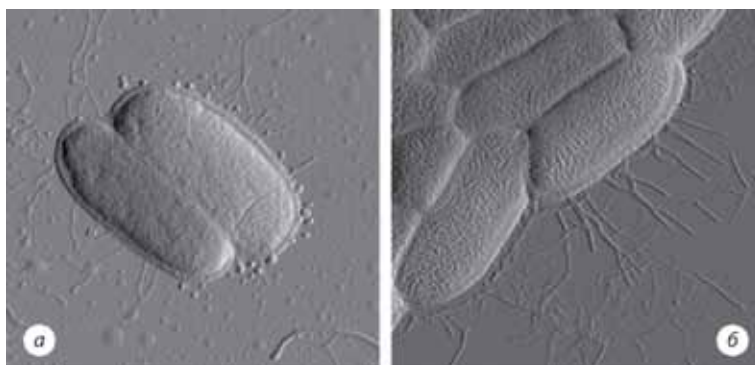


Рис.1. Штамм *E. coli*: исходный родительский (а), трансдуктантный (б) (СЗМ, размер кадра 4x4 мкм² [4])



температуры и регистрации совокупности свойств: геометрических размеров, локальных коэффициентов упругости и трения, кинетических параметров роста, оптических характеристик, электропроводимости, резистентности по отношению к реагентам и медикаментам, особенностей биоспецифического отклика.

В разрабатываемом диагностическом приборе для синхронного применения используются следующие подходы:

- высокоапертурная оптическая микроскопия (обзорное наблюдение пробы и кинетики на микроуровне);
- интерференционная микроскопия (регистрация положения/перемещения поверхности образца по нормали с нанометровым разрешением и поиск особенностей рельефа – локальных вершин и впадин);
- СЗМ (анализ локальных свойств и морфологии критических областей – рецепторов, мембранных пор, трансмембранных белков, пилей);
- атомные весы (точное определение массы вещества на воздухе и изменения поверхностного напряжения в монослойных пленках аналита в жидкости);
- методы нанооптики (регистрация с нанометровой точностью положения оптических маркеров биоспецифического взаимодействия).

Наряду с медицинской диагностикой платформа "Бионаноскопия" (см. табл.) может эффективно применяться в фармацевтике, токсикологии, косметологии, для контроля пищевых продуктов и в других областях, требующих комплексного анализа вещества на молекулярном уровне.

Важно отметить, что комбинация методов обеспечивает результат, который невозможно получить при последовательном использовании отдельных аналитических приборов. Так, с помощью интерференционного микроскопа

Технические параметры платформы "Бионаноскопия"

Технический параметр	Значение
Точность регистрации положения метки (оптические методы)	1 нм
Точность регистрации нанобъектов (зондовая микроскопия)	0,01 нм
Точность регистрации положения вершины по высоте (интерферометрия)	0,1 нм
Количество пикселей оптического изображения	≥2048×2048
Количество пикселей СЗМ-изображения	≥ 1024×1024
Объем пробы	<0,1 мкл
Стабильность температуры	>0,1°C
Суммарное время многопараметрического анализа	≤3 мин
Он-лайн передача данных – с криптографической защитой	Да

можно осуществить быстрый просмотр образца, выбрать на нем по интерференционному контрасту области определенной высоты, а с помощью СЗМ в динамике исследовать детали процесса на нанометровой шкале. С использованием оптического нанорегистратора можно определить положение оптической метки с точностью до нанометра.

Расчеты показывают, что цена платформы молекулярного экспресс-анализа для конечного потребителя в расширенной комплектации (большее количество сменных зондов, различные варианты проточных ячеек, широкоформатные мониторы, производственная компьютерная станция) будет варьироваться от 1,2 млн. до 4 млн. руб., что находится

в нижнем ценовом диапазоне медицинской аналитической аппаратуры и ниже стоимости зондовых микроскопов ряда мировых производителей.

Необходимость создания многофункциональных платформ на основе комбинации приборов наноаналитики обусловлена следующими обстоятельствами.

Современная медицина все более персонализируется. Новые эффективные методики лечения и терапии неизбежно должны в максимальной степени соответствовать особенностям пациента. Это формирует высокую потребность в технологических комплексах, способных быстро и всесторонне анализировать биологический материал конкретного человека на уровне отдельных клеток

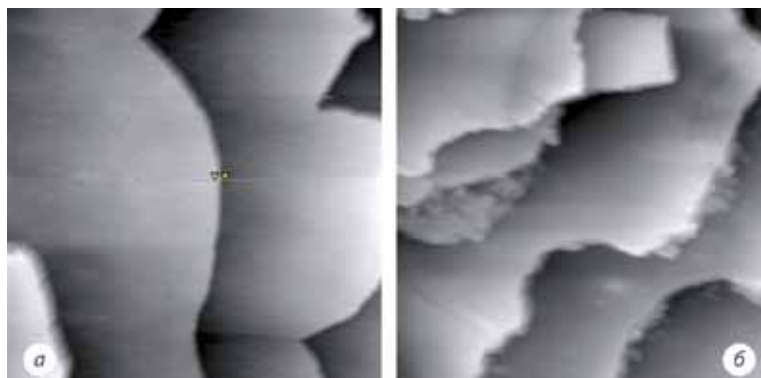


Рис.2. Структуры: (а) нормального волоса, (б) волоса с патологией. Вставка на рис. слева – перепад высот между чешуйками (кутикулой) здорового волоса, по данным АСМ составляющий 380 нм

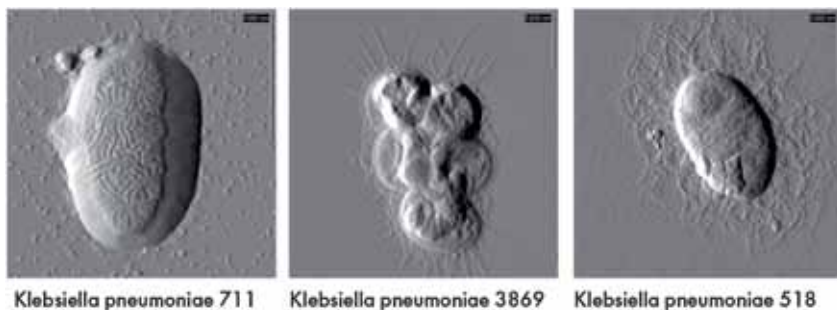


Рис.3. Морфологический анализ бактериальных клеток *Klebsiella pneumoniae*, провоцирующих воспалительные процессы в легких человека

и биомакромолекул. Таким образом, платформа молекулярного экспресс-анализа, позволяющая визуализировать особенности биологических объектов с нанометровой точностью, как нельзя лучше подходит для многих отраслей диагностической медицины, причем интеграция большого количества методов анализа и их предельно высокая чувствительность делает платформу уникальной.

Эксперты отмечают, что платформа "Бионаноскопия" призвана обеспечивать эффективный молекулярный анализ биологического материала человека как с целью назначения адекватного курса лечения, так и предотвращения возможных заболеваний. Особенность платформы состоит в возможности проведения анализа за минимально короткое время при повышении надежности результатов.

Возможно применение разрабатываемой платформы для анализа структуры человеческого волоса, что относится

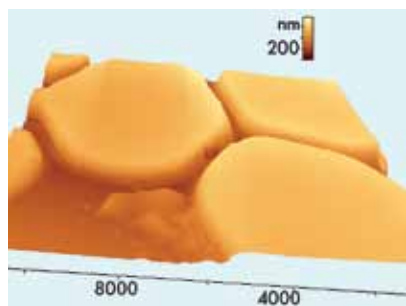


Рис.4. Трехмерное изображение эритроцитов

ся к трихологии – науке о волосах (рис.2).

Другой пример – микрохирургия, точнее, микрохирургия. В клинической практике для повышения вероятности имплантации зародышей в слизистую оболочку матки необходимо локальное высокоточное разрушение прозрачной оболочки ранних эмбрионов. Подобные задачи возникают и при удалении из эмбрионов фрагментов клеток на этапах дробления зародыша (коррекция фрагментации). Они решаются с помощью стеклянных микроинструментов (иглы, скальпеля, присоски), диодного лазера или обработкой эмбрионов специальными растворами. Минимальный размер микрохирургических инструментов ограничен физическими свойствами стекла и составляет не менее 1 мкм для микроиглы и нескольких микрометров для микроскальпеля. Такие микроинструменты оказывают значительное повреждающее действие на клеточный пласт, в том числе, вызывая гибель отдельных клеток в месте повреждения. Диодный лазер создает локальные повреждения с плохо контролируемым диаметром, поскольку его действие связано с термической деструкцией и может оказывать токсическое воздействие на эмбрионы.

Очевидно, что для минимизации травмирующего воздействия на эмбриональные структуры нельзя обойтись без инструмента с характерными размерами в десятки и сотни на-

нометров, дающего возможность проводить высокоточные операции на клеточном и субклеточном уровнях. На решение этих задач нацелена платформа "Бионаноскопия": атомно-силовая микроскопия позволяет делать аккуратный надрез с нанометровой точностью, а расположение надреза задается с помощью оптической и интерферометрической микроскопии.

В клеточной репаративной медицине все чаще используются тканеинженерные конструкции. Распространенным типом воздействия на клетки является, например, химическое воздействие ростовыми и другими факторами, стимулирующими направленную дифференцировку. Модифицированные в результате такого воздействия клетки эффективно используются, однако при введении клеточной суспензии непосредственно в ткани и внутривенно в процесс репарации включается очень небольшая часть клеток (в случае миокарда 1–2%). По этой причине в современной клеточной биотехнологии на первое место выходит направление тканевой и органной инженерии. Основные принципы такого подхода заключаются в разработке и применении для трансплантации в поврежденный орган носителей из биodeградируемых материалов, заселенных донорскими клетками. Для эффективного развития данного направления необходимо иметь инструмент, позволяющий оказывать на определенные клетки химическое воздействие, локализованное в области нескольких сот нанометров, и отслеживать результирующие структурные изменения таких клеток.

В связи с этим также актуальна разработка высокоточного прибора для выполнения микрохирургических операций на клеточных структурах, компартаментах с нанометровой точностью и доставки в определенные клеточные структуры наноконцентраций активных веществ.



Рис.5. Изображение эритроцита – разновидности эритроцита человека [5]

Предлагаемая платформа позволяет воздействовать на клетки механически, доставлять нанолитровые объемы активного вещества в определенные клеточные компартменты, выполнять сложные хирургические операции на таких структурах, а также определять свойства клеток: жесткость оболочек, структуру цитоскелета, упругость мембраны, подвижность мембранных структур.

Важно отметить, что АСМ – единственный метод, позволяющий продвинуть микрохирургию на наноуровень, удовлетворить требования к точности, воспроизводимости и автоматизации воздействий на клетки, придать новый импульс развитию клеточных технологий. Основные его преимущества:

- получение трехмерного изображения объектов с разрешением до атомарного и молекулярного;
- возможность исследовать объекты в жидкой среде;
- высокая пространственная точность и локализация воздействия в методе силовой нанолитографии.

Суть последней состоит в использовании в качестве инструмента для точечного воздействия АСМ-зонда (кантилевера) на поверхность объекта. Хотя этот метод широко используется для формирования микро- и наноразмерных рельефов на неживых объектах (синтетические полимеры, кремний, графит, титан, многие другие материалы), его применение к живым системам ограничивается единичными экспериментами. Поэтому применение АСМ для микрохирургических операций на клетках и клеточных структурах является существенно новым подходом в отечественной и мировой науке.

Характерный радиус закругления АСМ-зонда – 10–25 нм (на два порядка меньше, чем для стеклянного микроинструмента), что позволит свести к минимуму негативное воздействие от хирургического вмешательства в клетку. Положение зонда контролируется системой обратной связи (точность позиционирования в плоскости образца 10–100 нм). Это обеспечивает локализацию силового воздействия



Рис.7. Атомные весы "БиоСкан" – микрокантилеверный анализатор химических и биологических веществ в жидких средах (разработаны совместно с ООО "Академия биосенсоров") (а); проточная жидкостная ячейка и держатель кантилевера атомных весов (б)

в малой области; возможность визуализации исследуемых объектов позволит контролировать результаты микроманипуляций. В целом, применение АСМ представляется чрезвычайно перспективным для микрохирургии и нанохирургии.

Широкие перспективы платформы «Бионаноскопия» для диагностики бактериальных инфекций обусловлены возможностью работы с одноклеточными бактериями – возбудителями заболеваний. В частности, на рис.3 представлены полученные методом зондовой микроскопии изображения микробных клеток *Klebsiella pneumoniae* различных штаммов. СЗМ дает детальное изображение, а оптическая микроскопия и интерферометрия обеспечивают быстрой поиск объектов при широком поле обзора, причем биомаркеры в виде оптических меток позволяют локализовать положение антигенов.

Другое перспективное применение платформы "Бионаноскопия" – наблюдение и диагностика клеток крови человека. На рис.4 приведено изображение эритроцита в норме, характерный диаметр которого – 8 мкм. При тщательном анализе клеток крови можно увидеть и другие типы эритроцитов.

На рис.5 представлено СЗМ-изображение эритроцита – разновидности эритроцита человека. Следует отметить, что рас-



Рис.6. Механическая система АСМ "ФемтоСкан" (Центр перспективных технологий)

смастриваемый метод позволяет наблюдать клетку в трех измерениях. (Перспективы применения методов АСМ в реаниматологии подробно описаны в [5].)

Следует отметить, что концепция платформы молекулярного анализа родилась на основе уже апробированных разработок – многофункционального СЗМ "ФемтоСкан" (рис.6), атомных весов "БиоСкан" (рис.7), оптического нанорегистратора [6], атомно-силового интерференционного микроскопа "ФемтоСкан Инлайт", получившего в 2009 году премию РОСНАНО "Лучшая разработка в области нанотехнологий" [7].

Работа выполнена при поддержке РФФИ (Проект № 10-04-01574-а), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (контракт №П255), ФСР МФП НТС (11277) и Научной программы НАТО «Наука для мира».

Литература

1. **I.Yaminsky.** Three Dimensional Image Analysis in Biomedical Scanning Probe Microscopy.– Second Annual Meeting. American Academy of Nanomedicine. The National Academy of Sciences. 2100 C ST. N. W Washington D.C. USA September 9–10, 2006. Program and Abstracts, p.21.
2. **I.Yaminsky.** Outlook into the Nanomedicine Research in Russia.– Second Annual Meeting. American Academy of Nanomedicine. The National Academy of Sciences. 2100 C ST. N. W Washington D.C. USA September 9–10, 2006. Program and Abstracts, p.33.
3. **Dubrovina E.V., Yaminsky I. V.** Nanoscopy of DNA as a tool for biomedicine technologies.–Moscow International Conference «Biotechnology and medicine». March, 14–17, 2006, Moscow, Russia. Conference proceedings, p.24–25.

4. **Yaminsky I. V., Demin V. V., Bondarenko V. V.** The differences in cellular surface of hybrid bacteria Escherichia coli K12, inheriting rfb-a3,4 gene of Shigella flexneri as revealed by atomic force microscopy. – J. microbiology, epidemiology, and immunology, 1997, №6, p.15–18.
5. **Мороз В. В., Черныш А. М., Яминский И. В., Козлова Е. К., Киселёв Г. А., Филонов А. С., Богушевич М. С., Гудкова О. Е.** Перспективы применения методов атомной силовой микроскопии в реаниматологии. – Общая реаниматология, IV, 2008, №4, с.51–54.
6. **Мухин Д., Яминский И.** Сверхточная регистрация смещения источника света в оптической микроскопии. – Наноиндустрия, 2008, вып.3, с.30–35.
7. **Меньшиков Е., Яминский И.** Атомно-силовой интерференционный микроскоп. – Наноиндустрия, 2009, вып.1, с.26–28.

Новые книги издательства "Техносфера"

Родунер Э.

Размерные эффекты в наноматериалах



Москва: Техносфера, 2011.
352 с.+ 15 с. цв. вклейки
ISBN 978-5-94836-265-6
Цена: 636 р.

Нанотехнологии, позволяющие манипулировать веществом на уровне атомов и молекул и обещающие в значительной степени изменить жизнь будущих поколений, становятся ведущим направлением развития общества в XXI столетии. На основе нанотехнологий можно создавать новые материалы, системы и устройства, которые по своим характеристикам значительно превосходят существующий уровень.

В монографии преимущественно на примере наночастиц рассмотрено проявление физико-химических свойств материалов, связанное с размерными эффектами. Основное внимание уделено структуре, электронному строению, магнитным характеристикам, каталитическим и термодинамическим особенностям. Рассматриваются также разнообразные возможности применения нанотехнологий во многих областях техники, медицины, науки и общественной жизни.

Книга является ценным и интересным современным руководством для студентов, аспирантов, научных сотрудников и разработчиков, специализирующихся в области нанотехнологий и наноматериалов.

Как заказать наши книги?

По почте: 125319, Москва, а/я 91.
По тел./факсу: (495) 956-3346, 234-0110.

E-mail: knigi@technosfera.ru,
sales@technosfera.ru