

5. *Deeva V., Slobodyan S.* Mathematical model of tip oscillations: Influence on image quality // *Applied Surface Science*. 2020. Vol. 516. P. 146144.
6. *Schwille P.* There and back again: From the origin of life to single molecules // *European Biophysics Journal*. 2018. Vol. 47. PP. 493-498.
7. *Ozer H.O.* Atomic resolution force imaging through the static deflection of the cantilever in simultaneous scanning tunneling/atomic force microscopy // *Ultramicroscopy*. 2019. Vol. 196. PP. 54-57.
8. *Shestakova V.G., Vetrov A.N., Dmitriev G.A.* Assessment of skin wound healing by digital image analysis // *Biomedical Engineering*. 2020. Vol. 53. PP. 402-406.
9. *Cho Y., Shin N., Kim D., Park J., Hong S.* Nanoscale hybrid systems based on cnt for biological sensing and control // *Bioscience Reports*. 2017. Vol. 37. PP. 3-30.
10. *Zhang B., Liu Y., Chen Q., Lai Z., Sheng P.* Observation of high  $T_c$  one dimensional super conductivity in 4 angstrom carbon nanotube arrays // *AIP Advances*. 2017. Vol. 7. P. 025305.
11. *Heath G.R., Scheuring S.* High-speed AFM height spectroscopy reveals  $\mu$ s-dynamics of unlabeled biomolecules // *Nature Commun.* 2018. Vol. 9. PP. 1-11.
12. *Caplins B., Holm J.D., Keller R.* Transmission imaging with a programmable detector in a scanning electron microscope // *Ultramicroscopy*. 2019. Vol. 196. PP. 40-48.
13. *Wagner T.* Steady-state and transient behavior in dynamic atomic force microscopy // *Journal of Applied Physics*. 2019. Vol. 125. P. 044301.
14. *Burke P.J.* An RF circuit model for carbon nanotubes // *IEEE Transaction of Nanotechnology*. 2003. Vol. 2. PP. 55-58.
15. *Gonzalez R., Woods R.* *Digital Image Processing*. – Pearson, 2018. 1192 p.

*Вера Степановна Деева,*  
канд. техн. наук, доцент,  
школа инженерного предпринимательства,  
ФГАОУ ВО «Томский  
политехнический университет»,  
г. Томск,  
Степан Михайлович Слободян,  
д-р техн. наук, профессор,  
кафедра материаловедения,  
ФГБОУ ВО «Тверской  
государственный технический университет»,  
г. Тверь,  
e-mail: sms\_46@ngs.ru

*А.И. Ахметова, В.М. Гукасов, Ю.Л. Рыбаков, И.В. Яминский*

## Быстродействующая сканирующая зондовая микроскопия в биомедицине

### Аннотация

Статья посвящена сканирующей зондовой микроскопии и ее эффективному применению в медицинских целях. Приведены обзор возможностей и перспективы использования полученных при помощи зондовой микроскопии результатов в биомедицине. Описаны принципы измерений и преимущества по сравнению с другими методами диагностики, такими как оптическая микроскопия высокого разрешения и электронная микроскопия.

### Введение

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) – это мощная многофункциональная исследовательская платформа, которая позволяет визуализировать биологические объекты и манипулировать ими [1]. У СЗМ имеется широкий арсенал наблюдаемых объектов – от отдельных молекул до живых клеток и тканей. Вскоре после изобретения прибора стало понятно, что для улучшения возможностей визуализации в биологии потребуются новые технологические разработки для устранения определенных ограничений метода. Это привело к созданию различных режимов визуализации, которые продолжают расширять возможности этой техники сегодня. Для биологических систем СЗМ дает много полезной информации, которую невозможно получить другими методами. Помимо получения данных о морфологии поверхности, при помощи СЗМ исследуют механические свойства биологических систем. Это важно, потому что соответствующие клеточные функции зависят от их механических свойств. Исследование вязкоупругости неопухолевых клеток и тканей молочной железы показало, что они менее деформируемы по сравнению с раковыми клетками и злокачественными тканями молочной железы [2]– [3]. Таким образом, большие клеточные системы демонстрируют измененные механические свойства.

**Цель нашей работы** – это практическое внедрение инструментальных методов сканирующей зондовой микроскопии в медицинскую технику для визуализации с высоким пространственным разрешением и исследования структуры, механических,

электрофизических и электрохимических свойств биологических объектов – вирусов, бактерий, клеток высших организмов – и определение реакции биообъектов на внешние воздействия.

### Материалы и методы

В объединенной лаборатории бионаноскопии (физический и химический факультеты МГУ имени М.В. Ломоносова и Центр перспективных технологий) при помощи зондовой микроскопии реализуются исследования биополимеров, их морфологии и конформации, проводятся эксперименты по определению антибиотикорезистентности бактерий, а также по раннему обнаружению биологических агентов (вирусов и бактерий) и т. д. Другими перспективными направлениями в зондовой микроскопии являются адресная доставка биомолекул, 3D-биопечать и создание молекулярного принтера, что имеет большой потенциал для применения в медицинских целях. При помощи зондовой микроскопии возможна визуализация биологических объектов в естественных средах в движении с высокой разрешающей способностью без нарушения их функций. СЗМ позволяет получать информацию о функционировании клеточных систем, а также измерять последствия воздействия на клетки от применения реагентов, лекарств, при механических повреждениях.

Уникальной способностью СЗМ является визуализация структуры поверхности с высоким разрешением, вплоть до атомного масштаба. Эта способность прибора постоянно совершенствуется, и новые инструментальные методы помога-

ют сделать такие измерения обычной практикой прикладных и фундаментальных работ. При визуализации в контактном режиме, когда кончик кантилевера скользит по поверхности образца, мы получаем изображения различного вида: высоты, отклонения и трения. Изображение высоты соответствует топографии образца с разрешением, зависящим от радиуса кончика кантилевера, неровности и физических свойств образца, а также того, как точно система обратной связи позиционирует кантилевер над мягким биологическим образцом. Для работы в контактном режиме с биологическими образцами необходимо аккуратно подбирать параметры, а конкретно – силу, с которой кантилевер давит на образец. Этот режим вполне применим для сканирования бактериальных клеток, так как они имеют жесткую мембрану. Для сканирования более мягких образцов используется динамический режим. В этом режиме кантилевер при сканировании образца колеблется на частоте, близкой к резонансу. Кончик кантилевера касается образца только в самом конце его движения вниз, что значительно уменьшает трение. В непосредственной близости от поверхности образца взаимодействия между кантилевером и образцом изменяют как амплитуду колебаний кантилевера, фазу, так и резонансную частоту, что позволяет использовать их в качестве параметров обратной связи для сканирования обладающих низкой механической жесткостью биологических образцов [4]. Использование амплитуды колебаний в качестве параметра обратной связи технически проще по сравнению с использованием частоты в качестве обратной связи. Динамическим режимом зачастую применяется при сканировании объектов, которые слабо адсорбируются на подложках, например ДНК, отдельных белков и др. Динамический режим позволяет визуализировать даже очень неровные поверхности, такие как живые клетки, в естественном состоянии. Однако жесткость, шероховатость, поверхностный заряд и химический состав или трение образца могут изменить колебания кантилевера и тем самым изменить или повлиять на контрастность изображения. Поэтому новые неисследованные образцы лучше сканировать в присутствии известных, которые выполняют функцию контроля [5]. Разрешение атомно-силовой микроскопии при сканировании бактериальных клеток может достигать доли нанометра. В настоящее время зависимость наблюдаемого рельефа от приложенной силы позволяет получать дополнительную информацию о механических свойствах биосистем.

Для сканирования живых образцов в естественной среде возможно использовать сканирующую капиллярную (или ионопроводящую) микроскопию, в которой в качестве зонда выступает капилляр, а позиционирование над образцом осуществляется по изменению ионного тока. Капилляр наполняется электролитом, в него помещается Ag/AgCl-электрод, второй электрод помещается в буфер с образцами клеток. При помощи прецизионной электроники осуществляется перемещение капилляра над поверхностью клетки; изменение ионного тока, проходящего через кончик капилляра, позволяет контролировать положение капилляра над образцом. Тем самым исключается вероятность касания клетки капилляром, обратная связь останавливает движение капилляра, когда ионный ток падает на доли процента. Это обеспечивает бесконтактный режим сканирования: капилляр останавливается на расстоянии от поверхности, примерно равном диаметру капилляра. Благодаря данной методике возможно осуществлять сканирование живых объектов в естественной среде и получать изображения, не боясь нанести вред образцу; особенно это касается таких мягких образцов, как живые клетки. В английской литературе данный метод получил название «ионопроводящая микроскопия (SICM)» [6], [7]. При использовании двухканальных капилляров мы имеем возможность электрохимического анализа. Второй канал может использоваться как сенсор или как средство доставки. В этом случае мы имеем дело с электрохимической микроскопией. В частности, если модифицировать один канал посредством платины, то возможно обнаружение активных форм кислорода вблизи поверхности клетки [8]. Однако для более широкого применения капилляр-

ной микроскопии в биологических исследованиях необходимо преодолеть узкие места, в том числе медленный процесс формирования изображения.

Отличительная особенность биологической сканирующей зондовой микроскопии состоит в обязательном проведении широкого арсенала измерений в жидкости, в том числе в условиях гидродинамического потока, при детальном контроле физико-химического состава, температуры, ионной силы, pH, освещенности и других параметров среды.

## Результаты

В нашей лаборатории для биомедицинских исследований мы используем сканирующий зондовый микроскоп «ФемтоСканХi», разработанный в 2019 году (рис. 1).



Рис. 1. Сканирующий зондовый микроскоп «ФемтоСканХi» на базе оптического инвертированного микроскопа «Nikon Ti-U»

Установка позволяет проводить измерения как в режиме атомно-силовой микроскопии, так и в режиме капиллярной микроскопии. Основные технические параметры установки приведены в табл. 1. Специально созданная для биомедицинских исследований проточная жидкостная ячейка позволяет наблюдать объекты в буферных растворах и жидкой среде. Ячейка выполнена в полностью герметичном варианте, что исключает случайный контакт исследователя с изучаемыми биологическими материалами, расположенными в ней. Ячейка с образцом может быть снята с микроскопа и перемещена в другое лабораторное помещение без ее разгерметизации, что делает работу с вирусами, патогенными бактериями и другими биологическими агентами безопасной.

Таблица 1

Технические параметры установки «ФемтоСканХi»

Размер поля сканирования, мкм <sup>2</sup>	20 x 20
Перемещение по нормали к образцу, мкм	2,5
Разрешение в плоскости образца (механика и электроника), нм	0,003
Разрешение по нормали к образцу (механика и электроника), нм	0,001
Диапазон частоты обратной связи, МГц	0...1
Время снятия одного кадра, с	0,001...1000
Среда измерений	Воздух, жидкость
Используемые зонды	Кантилеверы, нанокапилляры, PtIr-проволока

В рассматриваемой работе с использованием представленной аппаратуры серии «ФемтоСкан» проведены исследования бактериальных клеток. В частности, на рис. 2 и 3 представлены изображения бактериальных клеток золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и *Klebsiella pneumoniae*, полученные методом атомно-силовой микроскопии. Проводились исследования о том, как на бактериальные клетки воздействуют биохимические реагенты, происходят ли при этом изменения в осаждении бактериальной пленки на подложке и повреждается ли поверхностная структура клеток.

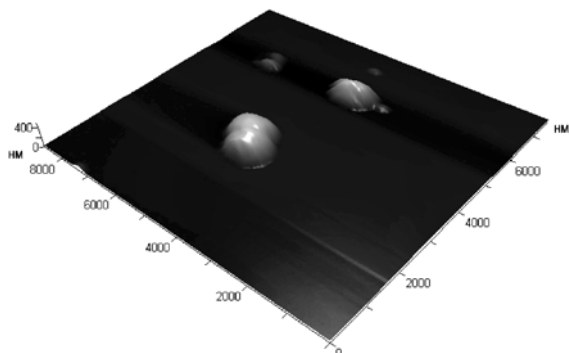


Рис. 2. Изображение бактериальных клеток *Staphylococcus aureus* в режиме 3D-СЗМ-визуализации. Обработка осуществлена в ПО «ФемтоСкан Онлайн» [9]

Столь высокое достигаемое сканирующей зондовой микроскопией пространственное разрешение вплоть до долей нанометра недостижимо в оптических методах высокого разрешения. Сканирующая зондовая микроскопия не требует для визуализации биологических объектов использования контрастирующих агентов или меток, используемых в электронной микроскопии. В отличие от электронной микроскопии, наблюдающей биообъекты в условиях вакуума, сканирующая зондовая микроскопия визуализирует живые объекты в их естественной среде – на воздухе или в жидкости. Это позволяет наблюдать многие процессы с биообъектами в процессе их жизнедеятельности.

## Заключение

В лаборатории бионаноскопии постоянно ведется работа по совершенствованию аппаратуры СЗМ.

В частности, более высокая скорость сканирования (в 10 раз большая) может быть достигнута за счет перемещения зонда по плавным траекториям (в простейшем случае – по спирали), а также за счет использования высокочастотных многокаскадных манипуляторов, быстрых цифро-аналоговых систем развертки и других решений.

Существенное преимущество дает наличие сверхбыстродействующей электроники с частотой обработки сигнала до единиц гигагерц.

В следующем десятилетии сканирующая зондовая и капиллярная микроскопия окажет большое влияние на то, как исследователи смотрят на биологические системы, помогая им решать фундаментальные вопросы, которые не были рассмотрены и изучены посредством традиционных методов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 20-12-00389, и Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-32-90036.*

*Результаты получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России № 075-01394-20-02.*

### Список литературы:

1. Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch. Atomic Force Microscope // Physical Review Letters. 1986. № 56 (9). PP. 930-933.
2. Plodinec M., Loparic M., Monnier C.A., Obermann E.C., Zanetti-Dallenbach R., Oertle P. et al. Thenanomechanical signature of breast cancer // Nat. Nanotechnol. 2012. № 7. PP. 757-765.
3. Rebelo L.M., de Sousa J.S., Mendes Filho J., Radmacher M. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy // Nanotechnology. 2013. № 24. P. 055102.
4. Putman C.A.J., Vanderwerf K.O., Degrooth B.G., Vanhulst N.F., Greve J. Tapping mode atomic-force microscopy in liquid // Appl. Phys. Lett. 1994. № 64. PP. 2454-2456.

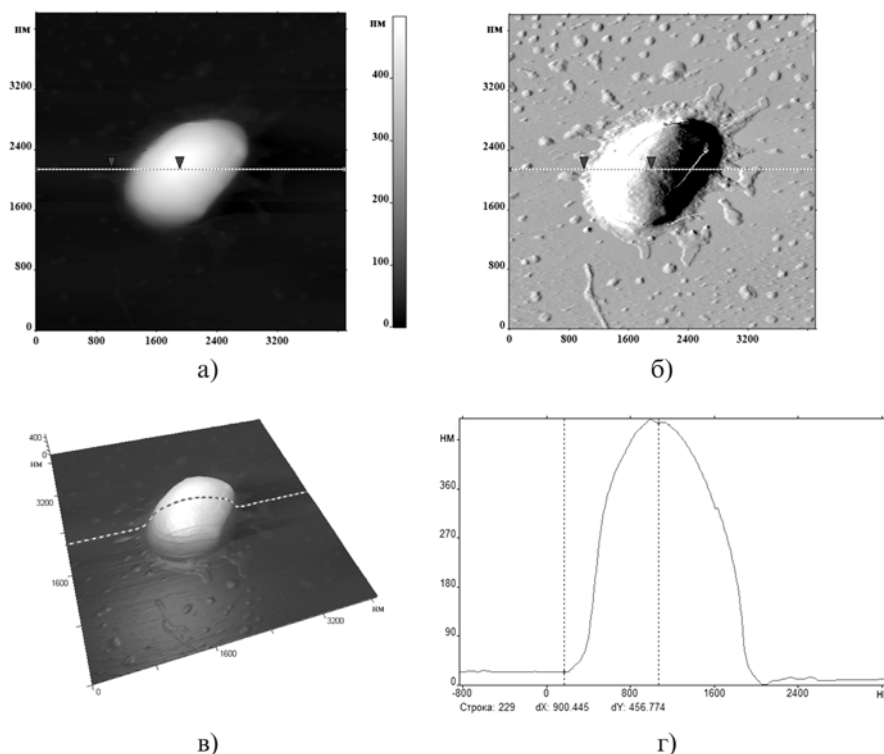


Рис. 3. Изображение бактерии *Klebsiella pneumoniae*: а) изображение высоты; б) изображение в режиме трения; в) 3D-визуализация; г) сечение выбранной области на изображениях (а)-(в)

5. *Dufrène Y.F., Ando T., Garcia R., Alsteens D., Martinez-Martin D., Engel A., Gerber C., Müller D.J.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology // *Nature Nanotechnology*. 2017. Vol. 12. PP. 295-307.
6. *Novak P., Li C., Shevchuk A.I., Stepanyan R., Caldwell M., Hughes S. et al.* Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion-conductance microscopy // *Nat. Methods*. 2009. № 6. PP. 279-281.
7. *Drake B., Randall C., Bridges D., Hansma P.K.* A new ion sensing deep atomic force microscope // *Rev. Sci. Instrum.* 2014. № 85. P. 083706.
8. *Paolo A., Sergiy T., Jan C. et al.* Electrochemical nanoprobe for single-cell analysis // *ACS Nano*. 2014. Vol. 8. № 1. PP. 875-884.
9. *Яминский И.В., Ахметова А.И., Мешков Г.Б.* Программное обеспечение FemtoСкан Онлайн и визуализация нанообъектов в микроскопии высокого разрешения // *Наноиндустрия*. 2018. Т. 11. № 6 (85). С. 414-416.

*Ассель Иосифовна Ахметова,*  
инженер,  
*Научно-исследовательский институт*  
*физико-химической биологии*  
*им. А.Н. Белозерского МГУ,*  
*ведущий специалист,*  
*ООО «Центр перспективных технологий»,*  
*ведущий специалист,*  
*ООО «Энергоэффективные технологии»,*

*Вадим Михайлович Гукасов,*  
д-р биол. наук, гл. научный сотрудник,  
*Юрий Леонидович Рыбаков,*  
д-р биол. наук, директор,  
*Государственный центр экспертизы*  
*в сфере науки и инноваций,*  
*ФГБНУ НИИ «Республиканский*  
*исследовательский научно-консультативный*  
*центр экспертизы» Министерства науки*  
*и образования России,*  
*Игорь Владимирович Яминский,*  
д-р физ.-мат. наук, профессор,  
*физический и химический факультеты,*  
*МГУ им. М.В. Ломоносова,*  
генеральный директор,  
*ООО «Центр перспективных технологий»,*  
директор,  
*ООО «Энергоэффективные технологии»,*  
ведущ. научный сотрудник,  
*ФГБУН «Институт элементоорганических*  
*соединений им. А.Н. Несмеянова РАН»,*  
г. Москва,  
e-mail: akhmetova@nanoscopy.ru

*Л.В. Осипов, Н.С. Кульберг, С.В. Скосырев, Д.В. Леонов,*  
*Г.К. Григорьев, А.В. Владзимирский, С.П. Морозов*

## **Система для транскраниальной ультразвуковой диагностики с коррекцией искажений волнового фронта**

### **Аннотация**

Создана и испытана экспериментальная ультразвуковая диагностическая система, предназначенная для исследования мозга и сосудов через кости черепа. Система позволяет получать изображения высокого качества за счет коррекции аберраций. Для работы системы необходимы два датчика, которые прикладываются соосно с двух сторон головы в областях окон акустической прозрачности.

### **Введение**

При исследовании мозга через кости черепа неизбежно возникают амплитудные и фазовые искажения, являющиеся результатом неравномерности скорости распространения ультразвуковой (УЗ) волны в тканях. Они приводят к расширению главного лепестка и увеличению уровня боковых лепестков диаграммы направленности, в результате ухудшаются качество фокусировки и соответственно пространственное и контрастное разрешения УЗ-изображения.

Ухудшение качества изображения из-за фазовых искажений может оказаться приемлемым только при достаточно низких значениях несущей частоты (менее 1 МГц) и небольших значениях апертуры. В то же время основными способами улучшения латерального и продольного разрешений УЗ-изображения являются именно повышение частоты УЗ-сигнала и увеличение размера апертуры. На практике же с увеличением УЗ-частоты и размера апертуры система фокусировки становится все более чувствительной к изменениям скорости распространения УЗ-сигнала в тканях с неоднородными акустическими характеристиками.

Искажения волнового фронта состоят в изменении амплитуды, фазы и искажений формы УЗ-сигнала. Большинство известных алгоритмов связаны только с компенсацией фазовых искажений и не касаются искажений формы сигнала [1]-[3]. Посредством этих алгоритмов осуществляется коррекция временных задержек сигналов от различных элементов датчика, обусловленных неоднородностью среды распространения ультразвука, с использованием данных, полученных в результате юстировки. В настоящей статье описывается разработанная система для транскраниальных исследований, способная исправлять искажения амплитуды, фазы и формы УЗ-сигнала.

### **Способ исправления аберраций**

В основе разработанной диагностической системы лежит способ, предложенный Л.В. Осиповым [4], позволяющий обеспечить компенсацию расфокусирующего влияния черепной кости. Этот способ основан на использовании опорного излучателя, прилегающего к поверхности головы в височной области с противоположной стороны от секторного датчика, при помощи которого проводится УЗ-исследование (рис. 1а-в). Датчики на голове фиксируются при помощи шлема (рис. 1г),