

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования Санкт-Петербургский национальный  
исследовательский университет информационных технологий, механики и  
оптики**

На правах рукописи



Тимощук Кирилл Игоревич

**МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ МЯГКИХ ОБЪЕКТОВ В АТОМНО-СИЛОВОЙ  
МИКРОСКОПИИ**

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук,  
Анкудинов А.В.

Санкт-Петербург – 2019

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. МЕХАНИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МЯГКИХ МИКРО- И НАНО- ОБЪЕКТОВ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ДЕЛ НА ПРИМЕРЕ НАТИВНОЙ КЛЕТКИ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	11
1.1 Нативная клетка как объект исследования.....	12
1.2 Обзор методов изучения механических параметров клеток.....	14
1.2.1 Механические параметры клеток животных.....	14
1.2.2 Методы изучения механических параметров клеток.....	18
1.3 Атомно-силовая микроскопия как инструмент изучения морфологии и механических параметров образца.....	20
1.3.1 АСМ – вид сканирующей зондовой микроскопии.....	20
1.3.2 Возможности АСМ для метрологии механических параметров микро- и нано-объектов.....	23
1.3.3 Механические модели для анализа АСМ-данных.....	26
1.3.4 Квазистатические режимы АСМ.....	32
1.3.5 Особенности применения АСМ в исследованиях животных клеток, достоинства и недостатки.....	35
1.4 Выводы. Постановка целей и задач диссертационного исследования.....	37
ГЛАВА 2. ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА АСМ В МЕТРОЛОГИИ МЯГКИХ ОБЪЕКТОВ.....	39
2.1 Основные компоненты и принцип работы АСМ.....	39
2.2 АСМ для биологических приложений Bruker BioScope Catalyst.....	44
2.3 Режим поточечного зондирования PeakForce QNM и его особенности.....	46
2.4 Выбор зондового датчика для измерения эффективного модуля Юнга нативных клеток в режиме PeakForce QNM.....	52
2.5 Пробоподготовка образцов нативных клеток и выбор подложки для их иммобилизации.....	54

2.6	Измерение эффективного модуля Юнга нативных клеток в PeakForce QNM.....	56
2.6.1	Калибровка АСМ-кантилевера.....	59
2.7	Выбор параметров сканирования и особенности экспериментов по изучению клеток в режиме PeakForce QNM.....	63
2.8	Общая информация об обработке данных атомно-силовой микроскопии.....	65
ГЛАВА 3.	ЭФФЕКТ ДЛИНЫ ЗОНДА В АСМ-ИЗМЕРЕНИЯХ МЕХАНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НАТИВНЫХ НЕЙРОНОВ.....	66
3.1	Особенности экспериментов по зондированию клеток.....	66
3.2	Результаты исследования нативных нейронов кантилеверами с разной длиной зонда.....	68
3.3	Обсуждение. Выводы.....	71
ГЛАВА 4.	МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ АСМ-ИЗМЕРЕНИЙ МЕХАНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МЯГКИХ ОБЪЕКТОВ НА ПРИМЕРЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ.....	75
4.1	Пробоподготовка нативных фибробластов для АСМ-исследования.....	75
4.2	Проявление вкладов различных экспериментальных факторов в значение эффективного модуля Юнга нативных фибробластов.....	76
4.2.1	Временной фактор.....	76
4.2.2	Сила взаимодействия.....	79
4.2.3	Форма зонда.....	81
4.2.4	Положение точки фокуса лазерного луча системы регистрации деформаций кантилевера.....	82
4.2.5	Артефакты в АСМ-сигналах на наклонных участках образца.....	91
4.3	Алгоритм методики. Выводы.....	96
ГЛАВА 5.	РЕАКЦИЯ НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА КОЛХИЦИН.....	99

5.1	Результаты исследования динамики поведения нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина.....	99
5.2	Комплементарные конфокальные оптические исследования.....	106
5.3	Выводы.....	109
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
	БЛАГОДАРНОСТИ.....	113
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

## ВВЕДЕНИЕ

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) считается перспективным в исследованиях по охарактеризации индивидуальных геометрических и механических параметров мягких объектов, ярким представителем которых являются нативные клетки, определению их физиологического и патологических состояний, тестированию действия различных токсинов или лекарств.

Несмотря на популярность метода АСМ, ощущается явное отсутствие стандартизации и единства измерений: результаты измерений одних и тех же объектов у разных исследователей сильно разнятся. В особенности это касается исследований т.н. «мягких объектов» – таких, контактная жесткость зонда АСМ-кантилевера с которыми существенно меньше жесткости консоли АСМ-кантилевера. Такая ситуация может являться следствием упрощенного взгляда на контакт АСМ-зонда с образцом. Обычно считается, что в образце нет сдвиговых напряжений, он индентируется только в нормальном направлении, т.е. АСМ-зонд не деформирует его в плоскости сканирования, поскольку скользит по поверхности. Исходя из этого предположения, для обработки результатов экспериментов используются основанные на теории Герца модели упругого контакта. Если же зонд не скользит по поверхности образца, применять такие модели в принципе нельзя, и корректная постановка вопроса о точности измерений становится невозможной.

Ряд исследователей указывали на проблему, обусловленную ограниченностью методики детектирования отклонений АСМ-кантилевера – оптического рычага. В такой схеме измеряется два параметра: угол изгиба и угол кручения консоли АСМ-кантилевера в точке фокуса лазерного луча, выбранной обычно на конце консоли, в то время как вектор смещения и приложенной силы имеет три компоненты. Поскольку угол изгиба определяется по наклону лишь в одной точке консоли АСМ-кантилевера, невозможно распознать аномальный

прогиб консоли, который, в свою очередь, может служить причиной ошибочных измерений амплитуды и направления силы взаимодействия.

Если зонд заземляется на поверхности образца, то консоль АСМ-кантилевера во время вертикального движения прогнётся, т.е. профиль угла прогиба будет иметь экстремум, в отличие от ситуации, когда зондовый датчик скользит по образцу и консоль изгибается, т.е. угол изгиба монотонно возрастает либо убывает к концу консоли АСМ-кантилевера.

Такая неопределенность создает дополнительные трудности при интерпретации результатов измерений в большинстве современных атомно-силовых микроскопов, оснащенных стандартной системой регистрации отклонения консоли оптического рычага.

Особенно важно иметь в виду этот факт при анализе результатов исследований таких объектов, как: гидрогели, полимеры и нативные клетки.

Лишь недавно начали предлагаться конструктивные решения проблемы, и, наконец, появилась схема измерения отклонения кантилевера, совмещающая в себе методы оптического рычага и интерферометра.

Как следствие рассмотренного состояния дел, в вопросе о точности АСМ-измерений механических параметров образца оказывается весьма актуальным критический анализ стандартных силовых кривых, учитывающий граничные условия в контакте зонд-образец: скольжение контакта, защемление, а также переходы между такими состояниями.

Все вышесказанное обосновывает актуальность диссертационного исследования.

**Цель работы:** создать новые методики атомно-силовой микроскопии для адекватных измерений механических параметров (деформации, контактной жесткости, модуля Юнга) и рельефа морфологии нативных клеток животных, полимерных гидрогелей, других мягких объектов.

**Задачи работы:**

- Сформировать критерии классификации контакта АСМ-зонда с мягкими объектами по принципу «липкий-скользящий» для обеспечения адекватности АСМ-измерений их механических и геометрических параметров.
- Разработать методику определения вклада геометрической формы кантилевера в результаты измерений кажущейся контактной жесткости и эффективного модуля Юнга мягких объектов. Апробировать данную методику на нативных нейронах, исследуя их методом АСМ в условиях близких к физиологическим.
- Разработать методику выявления состояний скольжения-залипания в контакте АСМ-зонда с индивидуальным мягким объектом. Апробировать данную методику на нативных фибробластах, исследуя их методом АСМ в условиях близких к физиологическим.

**Научная новизна работы:**

1. Впервые предложено по зависимости измеряемого модуля Юнга,  $E_A$ , от  $\lambda$  – отношения высоты зонда к длине консоли используемого АСМ-кантилевера, определять состояния защемления или скольжения в контакте АСМ-зонд–мягкий объект. Наличие зависимости  $E_A(\lambda)$  характеризует контакт АСМ-зонда со среднестатистическим объектом из группы однотипных объектов как липкий, отсутствие – как скользящий. Такая условная классификация важна, так как в случае липкого контакта зонда с объектом АСМ-данные получают неоднозначную трактовку.
2. Впервые предложено идентифицировать скользящий тип контакта АСМ-зонда с мягким объектом по положительным экстремумам кривой деформации на его наклонных участках, получаемых при АСМ-исследовании.
3. Разработанная методика определения липкого или скользящего контакта АСМ-зонда с мягким объектом по зависимости  $E_A(\lambda)$  впервые позволила детектировать фибробласты, тип контакта АСМ-зонда с которыми является скользящим, и достоверно зарегистрировать уменьшение их податливости после

воздействия колхицина, способствующего деполимеризации тубулиновых микротрубочек.

### **Практическая значимость работы:**

1. Разработаны две методики сортировки мягких объектов по принципу «липкого-скользящего» контакта с АСМ-зондом, которые способствуют адекватной интерпретации результатов АСМ-измерений механических параметров мягких объектов. Первая методика позволяет классифицировать среднестатистический объект из группы однотипных объектов, вторая методика позволяет классифицировать каждый отдельный объект.

2. Показана необходимость контролировать значения параметра  $\lambda$  – отношения длины зонда к длине консоли кантилевера, в процессе накопления статистических данных измерений эффективного модуля Юнга однотипных мягких объектов методом АСМ для обеспечения адекватности таких измерений.

3. Установлено, что при отсутствии информации об удельном вкладе латеральных и нормальных компонент силы взаимодействия АСМ-зонда с образцом, следует для изучения механических параметров образца выбирать АСМ-кантилеверы с минимальным  $\lambda$ .

4. Предложенная методика классификации контакта АСМ-зонда с индивидуальным объектом по принципу «липкий-скользящий» позволяет на основе сделанной оценки типа контакта оценивать адекватность результатов литературных данных, накопленных в АСМ-измерениях механических параметров мягких объектов.

5. Результаты, представленные в диссертационной работе, были получены на установке BioScope Catalyst с режимом PeakForce QNM компании Bruker. Однако, разработанные методики можно также успешно применять при использовании приборов с аналогичными режимами других производителей (HybriD mode, НТ-МДТ СИ; Quantitative Imaging (QI), JPK Instruments; Digital Pulsed Force Mode, WITec; Fast Force Mapping Mode, Asylum Research).



**Положения, выносимые на защиту:**

1. При АСМ-исследовании мягких объектов необходимо классифицировать их по преобладанию вклада нормальных ( $F_Z$ ; скользящий контакт) или латеральных ( $F_Y$ ; заземленный, липкий контакт) сил в контакте зонд-объект в изгиб консоли кантилевера, поскольку АСМ-измерения механических параметров в условиях липкого контакта с объектом трактуются неоднозначно. Вклад нормальных сил преобладает, когда  $F_Z/F_Y \gg \lambda$ , где  $\lambda$  – это отношение высоты зонда к длине консоли кантилевера.

2. Адекватность АСМ-измерений средних значений кажущихся модуля Юнга, контактной жесткости, деформации мягкого объекта обеспечивается независимостью измеряемых значений от  $\lambda$ .

3. Рост кажущейся деформации, измеряемой в АСМ на наклонных участках однородного образца, относительно значений на его горизонтальных участках, свидетельствует о проскальзывании на образце зонда в момент взаимодействия. Выявленный эффект классифицирует контакт с индивидуальным объектом как скользящий непосредственно в ходе АСМ-измерений, не требуя использования кантилеверов с различным  $\lambda$ .

**Апробация работы**

Основные положения и результаты работы докладывались и обсуждались на Первой российской конференции "Физика – наукам о жизни" ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН (Санкт-Петербург, 2016); Международной зимней школе по физике полупроводников 2016 (Санкт-Петербург, 2016); XXI Международном симпозиуме «Нанопизика и наноэлектроника» (Нижний Новгород, 2017); Всероссийской молодежной конференции с международным участием "Современные аспекты интегративной физиологии" (Санкт-Петербург, 2018); XIII Международной научной конференции "Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии" (Минск, 2018); XLVII Научной конференции с международным участием "Неделя науки СПбПУ" (Санкт-Петербург, 2018); XXVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов" (Москва, 2019).

### **Публикации**

Основные результаты диссертации изложены в 12 печатных работах, из них 4 в научных журналах, рекомендованных ВАК, и 8 в материалах международных и российских конференций.

### **Достоверность и надежность результатов**

Достоверность результатов обусловлена: достаточным объемом выборок при сравнительном анализе групп нативных клеток по геометрическим и механическим параметрам, измеренным посредством атомно-силового микроскопа; использованием современных знаний об устройстве нативных клеток и теоретических представлений о взаимодействии зондового датчика сканирующего зондового микроскопа с мягкими и вязкими объектами, помещенными в жидкую среду; использованием методов оптической и лазерной конфокальной микроскопии, дополняющих сканирующую зондовую микроскопию.

### **Личный вклад автора**

Автором получены все основные оригинальные и рутинные экспериментальные результаты диссертации. Анализ экспериментальных и теоретических результатов, а также подготовка публикаций проводились совместно с соавторами из Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН, ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, Университета ИТМО и научным руководителем. Вклад автора диссертационной работы в анализ результатов и подготовку публикаций сопоставим со вкладами соавторов публикаций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации составляет 129 страниц машинописного текста, включая 24 рисунка по тексту, 10 таблиц и список цитируемой литературы из 158 наименований работ отечественных и зарубежных авторов.

## **ГЛАВА 1. МЕХАНИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МЯГКИХ МИКРО- И НАНО- ОБЪЕКТОВ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ДЕЛ НА ПРИМЕРЕ НАТИВНОЙ КЛЕТКИ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)**

Данная глава представляет собой литературный обзор по теме диссертационного исследования. В ней приводится краткая информация об объекте изучения данной работы – нативной клетке. Рассматриваются распространенные методы изучения механических параметров индивидуальных клеток: активные (регистрирующие отклик клетки на деформацию под действием внешних сил), такие как микропипеточная аспирация и оптический пинцет, и пассивные (позволяющие детектировать генерируемые самой клеткой силы), такие как микрореология и методы деформируемых подложек, а так же результаты, достигнутые при применении описанных методов. Излагается суть АСМ в качестве активного метода измерения механических параметров (деформации, контактной жесткости, модуля Юнга) клеток, основного метода исследования, используемого в данной работе, и его возможности для метрологии механических параметров. Кратко описываются основные механические модели для анализа АСМ-данных, их основные достоинства и недостатки. Представляется обзор квазистатических режимов АСМ для изучения механических параметров образца (PeakForce QNM, Bruker; HybriD mode, НТ-МДТ и др.) и преимущества их применения в работе с нативными клетками. Перечисляются основные достоинства и недостатки АСМ при исследовании нативных клеток. Рассматривается проблема отсутствия стандартизации результатов АСМ-измерений механических параметров нативных клеток. По результатам и выводам, сделанным в процессе написания литературного обзора, определяются цель и задачи диссертационного исследования.

## 1.1 Нативная клетка как объект исследования

На всем протяжении истории создания и своего развития клеточная теория была тесно связана с использованием методов микроскопии. Именно в качестве предпосылок создания клеточной теории принято рассматривать открытие клеток, которое стало возможным лишь благодаря изобретению и дальнейшему совершенствованию микроскопа. Еще в 1665 году Р. Гук открыл факт существования растительных клеток, которые стали объектами исследования на первоначальном этапе. Принято считать, что большую роль в формировании правильного представления о строении растений сыграла глава XVII написанной Р. Гуком «Микрографии», которая называлась «О схематизме или строении пробки и о клетках и порах в некоторых других рыхлых телах» [1], в которой автор описал обнаруженные с помощью микроскопа пузырьки или ячейки (cellula), получившие в результате перевода название «клетка».

Затем, в работах всемирно известных ученых-микроскопистов Антони ван Левенгука, Неемия Грю и Марчелло Мальпиги были представлены результаты исследований, которые не только подтвердили, что растительные организмы состоят из клеток, но и продвинулись дальше. Так, именно исследования М. Мальпиги позволили ему сделать ряд открытий в области анатомии и гистологии. Ему принадлежит открытие лейкоцитов, а затем и других форменных элементов крови, что не удалось сделать У. Гарвею, который открыл кровообращение [2].

О клетках в тот период упоминали многие авторы, однако, должного внимания их исследованию не уделяли. Во-первых, разрешающая способность микроскопов того периода времени не позволяла ученым заметно продвинуться в исследовании животных клеток. Во-вторых, развитию вопроса так же не способствовал тот факт, что практически отсутствовали рациональные методы подготовки образцов для микроскопического исследования, а существовавшие не носили системного характера. В силу этого справедливым представляется вывод о том, что исследования М. Мальпиги фактически предшествовали формированию

клеточной теории [3]. Также как исследования Н. Грю и А. ван Левенгука. Последний увидел, что кровь циркулирует в сосудах, что она представляет собой не однородную жидкость, а поток частиц, которые современная наука именуется эритроцитами. Однако не предполагал, что изучением этих частиц будет заниматься самостоятельная наука микробиология [4].

Основателем клеточной теории считается Теодор Шванн, который в 1839 г. опубликовал совместно с Маттиасом Шлейденем работу «Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений». К числу основных выводов, сформулированных авторами, следует относить положения о том, что клетка выступает основной структурной единицей всех живых организмов (как растительного, так и животного происхождения); что образование, видимое под микроскопом и обладающее ядром, можно считать клеткой, а также тот факт, что формирование новых клеток обуславливает рост, развитие и последующую дифференцировку как животных, так и растительных клеток [5].

С учетом дополнений, внесенных в клеточную теорию Р. Вирховом, который обосновал вывод о том, что новые клетки получаются в результате деления существующих [6], были сформулированы наиболее значимые положения современной клеточной теории. Принимая во внимание сложившиеся в науке традиции, к числу наиболее значимых положений клеточной теории на современном этапе ее развития в контексте настоящего исследования представляется необходимым отнести следующие: клетка является основной структурной единицей строения и развития всех живых организмов, а клетки всех организмов в свою очередь схожи по химическому составу, строению и основным проявлениям жизнедеятельности. Следовательно, результаты изучения физических свойств отдельных животных клеток могут быть экстраполированы на все их множество с учетом отдельных особенностей строения и химического состава. Именно этим обусловлено, что в качестве объекта исследования с использованием методов АСМ были выбраны животные клетки, представляющие

собой важную составную часть любого сложного живого организма, в том числе человека.

Функционирование организма напрямую зависит от функционирования отдельных клеток. Результаты предыдущих исследований свидетельствуют о том, что многие заболевания сопровождаются изменениями в механических параметрах клеток. Указанные зависимости установлены для болезней сердца, возникновения и развития злокачественных опухолей и др. Они столь существенны, что могут быть использованы в качестве средства диагностики [8]. Однако, поскольку при этом имеет значение количественное определение механических параметров [7], то существенное значение приобретает адекватность получаемых в процессе исследования данных. Таким образом, важной представляется разработка таких методов и методик исследования на базе АСМ, которые бы гарантировали необходимый уровень достоверности и надежности получаемых результатов.

## **1.2 Обзор методов изучения механических параметров клеток**

### **1.2.1 Механические параметры клеток животных**

Существующие в литературе модели, разработанные для интерпретации результатов экспериментальных исследований и предсказания механических параметров клетки, могут быть разделены на две группы в зависимости от подхода к пониманию структуры клетки. Модели, включаемые в первую группу, описывают клетку, как сплошную среду, в том числе, как мягкое, стеклоподобное тело. При этом именно модели, описывающие клетку, как стеклоподобное тело близкое к стеклованию, получили в последнее время серьезное развитие [9–11]. Теория мягкой стеклообразной реологии (Soft Glassy Rheology – SGR)

использовалась прежде всего для изучения механических параметров коллоидов, эмульсий и суспензий, а также структурных элементов клеток, и позволила обосновать вывод о сходности механического поведения каждого из этих веществ [12, 13]. В настоящей работе акцент сделан на исследовании механических параметров животной клетки, как единой системы. Поскольку в данной работе акцент делается на методах и методиках АСМ, их принципах работы и физических явлениях, кроющихся за ними, этот подход представляется более предпочтительным. В соответствии с ним клетка рассматривается, как гомогенная абсолютно упругая среда (модель Герца/Снеддона) [14–16] либо как комбинация пружин и вязких элементов [13, 17].

Во вторую группу традиционно включают модели, в которых основное внимание уделяется элементам цитоскелета [18, 19]. В моделях данной группы клетка представлена как набор, с одной стороны натянутых и стремящихся к сжатию элементов (таких как актомиозиновые фибриллы), и, с другой стороны, препятствующих этому элементов (таких как микротрубочки и внеклеточный матрикс) [7]. В эту группу включаются модели, которые описывают цитоскелет клетки с использованием различных цепей. Некоторые из них достаточно успешно описывают степень зависимости модуля Юнга от частоты и жесткости клетки от величины деформации [10, 20, 21].

Существенный прорыв в исследованиях механических параметров живых клеток стал возможен благодаря методу АСМ, который позволяет эффективно изучать микро- и наноструктуры, в том числе, живые клетки. Известно, что функции клетки определяются ее структурой, которая характеризуется определенными механическими параметрами. Исходя из этого тезиса на протяжении значительного промежутка времени существовало два подхода к изучению механических параметров клетки. Один из них базировался на том, что клетка рассматривалась, как единое целое, а второй – на том, что детально изучались механические параметры отдельных структурных компонентов. Относительно недавно появилась возможность исследовать пространственное

распределение механических параметров структурных элементов клеток с помощью АСМ [22].

Проведенные исследования позволили констатировать, что АСМ является методом, позволяющим получать изображения исследуемых поверхностей в достаточно высоком разрешении [23–25].

Принцип работы метода АСМ основан на детектировании изменений Ван-дер-Ваальсовых сил. При этом взаимодействие между поверхностью исследуемого образца и наконечником (зондом) соответствует силе взаимодействия между атомами образца и наконечника, который сканирует его поверхность [26] и вызывает изгиб или скручивание кантилевера, пропорциональное силе взаимодействия. Угол изгиба кантилевера в результате взаимодействия с элементами на поверхности образца контролируется во время сканирования и конвертируется в трехмерное изображение поверхности [27]. Более подробно на принципе работы атомно-силового микроскопа мы остановимся в следующей главе.

Микромеханические параметры поверхностных и подповерхностных слоев клетки могут быть обнаружены с помощью контактного режима АСМ или методом фазовой визуализации в тэппинг-режиме или режиме постукивания, который также называется прерывистым или полуконтактным. При этом зондирование поверхности клетки методом АСМ может выявить неоднородность механических параметров поверхностных и подповерхностных слоев клеток [26].

Чувствительность и разрешение метода АСМ зависит также от таких технических характеристик зонда и кантилевера, как его радиус, форма или материал, из которого он изготовлен [28].

Базовой технологией АСМ для целей количественного изучения механических параметров клеток и тканей является силовая спектроскопия или анализ силовых кривых. Получаемая атомно-силовым микроскопом силовая кривая содержит информацию о взаимодействии между зондовым датчиком и поверхностью исследуемого образца на длинных и коротких расстояниях и представляет собой основу для оценки модуля Юнга образца. В литературе



отмечается, что на современном этапе имеется весьма серьезная проблема, связанная с оценкой абсолютного значения модуля Юнга клеток с использованием АСМ, обусловленная сложностью выбора подходящей механической модели [26].

До настоящего времени в большинстве исследований при оценке модуля Юнга клеток использовалась модель Герца, которая описывает простой случай упругой деформации двух совершенно однородных гладких тел соприкасающихся под нагрузкой [29, 30]. Два важных допущения модели Герца состоят в том, что индентор должен иметь параболическую форму и образец считается обладающим бесконечной толщиной по сравнению с глубиной индентирования.

Первое положение остается верным для случая, когда радиус наконечника намного больше, чем глубина индентирования ( $h < 0,3R$ ) [31].

Для изучения упругих свойств клеток методом АСМ также используется модель, основанная на так называемой теории упругих оболочек [32–34]. Данная теория утверждает, что клетка представляет собой некую оболочку, заполненную жидкостью. Поэтому эффективный модуль Юнга можно оценить, исходя из взаимосвязи между ним, толщиной оболочки клетки и модулем изгиба. Серьезная проблема использования таких процедур оценки заключается в сложности определения граничных условий для расчета любых констант, участвующих в основных уравнениях и определении радиуса контакта наконечника с образцом [26].

В качестве еще одной заслуживающей внимания теоретической модели, используемой в АСМ для оценки механических параметров клетки, в исследованиях используется модель конечных элементов, которая является самой популярной моделью для анализа проблем упругости в технике [35].

Значения параметров упругости рассчитывают с использованием различных моделей, существенно отличающихся друг от друга. Например, результаты исследования механических параметров эндотелиальных клеток, испытывающих напряжение, с использованием различных моделей свидетельствуют о том, что значения модуля Юнга, рассчитанные с помощью модели конечных элементов

оказались следующими:  $12,2 \pm 4,2$  кПа и  $18,7 \pm 5,7$  кПа для контрольных образцов и эндотелиальных клеток, испытывающих напряжение, соответственно. При этом значение модуля Юнга, рассчитанное с использованием модели Герца, отражает ту же тенденцию, но имеет другие значения:  $0,87 \pm 0,23$  кПа и  $1,75 \pm 0,43$  кПа для контрольных образцов и клеток, испытывающих напряжение, соответственно) [35].

В целом, полученные результаты удовлетворяли требования исследователей, что позволило признать АСМ-зондирование эффективным инструментом для изучения интактных клеток, в том числе, мембранных и субмембранных клеточных структур, как в количественном, так и в качественном отношении [26]. Однако, автору работы представляются не совсем верными интерпретация результатов измерений и их метрологичность.

### 1.2.2 Методы изучения механических параметров клеток

Для правильного понимания значения и возможных перспектив развития использования АСМ и ниши, которую этот метод занимает в исследованиях живых клеток, большое значение имеют опубликованные обзоры результатов соответствующих исследований в отечественных и зарубежных публикациях.

Рассматривая возможности исследования механических параметров живых клеток как *in vivo*, так и *in vitro* [36–38], отмечают, что большинство используемых методов были разработаны и использовались для исследования именно *in vitro* [39, 40], что влечет определенную условность в интерпретации результатов.

Механические параметры клеток, а также их патологии, были предметами многих исследований, как физиологии, так и патофизиологии человека. При этом методы, которые были разработаны для изучения механических параметров клеток, принято классифицировать по различным основаниям. К числу наиболее

значимых относится разделение методов на активные, в которых измеряются силы, создаваемые внешним воздействием на клетку, и пассивные, которые используются для исследования сил, создаваемых самой клеткой [40, 41].

К числу активных методов относятся различные виды индентирования, оптический и магнитный пинцеты, микропипеточная аспирация и другие [42–44], а также атомно-силовая микроскопия [40].

При использовании пассивных методов силовое воздействие к клетке напрямую не прикладывается, а, как было сказано выше, изучаются её собственная механическая активность и способность к генерации сил. К числу пассивных относят методы микрореологии и методы деформируемых подложек. Принцип работы метода микрореологии основывается на наблюдении за движением микрочастиц в клетке — эндогенных, присущих клетке в её нативном физиологическом состоянии, либо искусственно введенных в неё извне [45].

Все исследования подтверждают наличие связей между структурой и механическими параметрами клеток. Не только АСМ, но и многие другие методы и методики были разработаны и используются для исследования механических параметров клеток *in vitro*. Большинство существующих методов способны генерировать или детектировать силы в диапазоне от пиконьютонов до наноньютонов. Однако, если требуется более высокое разрешение или чувствительность, например, в диапазоне фемто Ньютонов, возникают проблемы [40].

Не считая АСМ, наиболее перспективным методом является оптический пинцет, который использовался для исследований в диапазоне нескольких пиконьютонов при изучении механических параметров молекулы миозина [46], а также одноцепочечных (ssDNA) и двухцепочечных (dsDNA) молекул ДНК [47, 48]. В последнее время было создано множество модификаций данного метода [49–52], которые расширяют его возможности и позволяют находить для него новые варианты применения. Однако, у данного метода есть существенный недостаток: он не позволяет исследовать и фиксировать временную и пространственную динамику [40].

Частично существующие проблемы могут быть решены за счет комплексного использования активных и пассивных методов исследования механических параметров клеток, однако, весьма перспективным представляется совершенствование существующих методов.

Этот и другие вышеперечисленные факторы обусловили обращение автора работы к разработке новых методик АСМ. Рассмотрим сущность, возможности и механические модели, используемые для анализа АСМ-данных.

### **1.3 Атомно-силовая микроскопия как инструмент изучения морфологии и механических параметров образца**

#### **1.3.1 АСМ – вид сканирующей зондовой микроскопии**

АСМ, как уже подчеркивалось, будучи разновидностью сканирующей зондовой микроскопии, имеет весьма хорошие перспективы. Измерение механических параметров клеток является довольно сложной задачей из-за малых размеров клеток (десятки микрометров), необходимости поддерживать их жизнеспособность во время экспериментов и ряда других факторов. И для решения соответствующих задач должна быть обеспечена необходимая точность измерений, их стандартизация и унификация. В целях разработки способов внедрения описанных характеристик необходимо формулирование и обоснование адекватного представления о сущности и возможностях АСМ для рассматриваемых целей.

Сканирующая зондовая микроскопия, подвидом которой является АСМ, для получения информации об объекте изучения использует зондовый датчик, или просто зонд – нанометрово острую иглу, которой прибор как бы "ощупывает" образец, аналогично тому, как человек получает информацию об окружающей

среде с помощью осязания. Тот факт, что зондовый датчик обладает сверхмалыми размерами, позволяет исследовать объекты с достаточно высокой степенью пространственного разрешения.

В целом, сканирующая зондовая микроскопия в наше время являет собой целый класс методов исследования и включает в себя методы, принцип работы, которых основывается на самых разных физических явлениях. На сегодняшний день, сканирующая зондовая микроскопия насчитывает несколько десятков разновидностей таких методов. В эти методы входит в первую очередь, конечно, сканирующая туннельная микроскопия, являющаяся родоначальницей всего класса методов сканирующей зондовой микроскопии, а так же атомно-силовая микроскопия, магнитно-силовая микроскопия, электросиловая микроскопия, сканирующая емкостная микроскопия, сканирующая тепловая микроскопия, ближнепольная оптическая микроскопия и множество других методов [53, 54].

Как уже ранее упоминалось, в классе методов сканирующей зондовой микроскопии первым исторически стал метод сканирующей туннельной микроскопии. В 1981-ом году Герд Бинниг и Генрих Рорер сконструировали первый в истории сканирующий туннельный микроскоп [55–58]. Принцип работы сканирующего туннельного микроскопа основывается на квантовом эффекте туннелирования электронов через потенциальный барьер, который выражается в возникновении туннельного тока в субнанометровом зазоре между зондом и образцом при наличии разности потенциалов между ними. При этом значение величины туннельного тока находится в экспоненциальной зависимости от значения величины зазора. Таким образом, поддерживая постоянное значение силы туннельного тока при перемещении зонда вдоль поверхности исследуемого образца, можно получать информацию о топографии исследуемой поверхности в виде карты распределения высот. Метод сканирующей туннельной микроскопии сразу привлек большое внимание научного сообщества, поскольку позволял исследовать поверхности твердых тел с недостижимым до сих пор разрешением вплоть до атомарного, и в 1986-ом году, всего через 5 лет после создания первого

сканирующего туннельного микроскопа, Г. Бинниг и Г. Рорер за его создание удостоились Нобелевской премии по физике.

Существенным ограничением в условиях работы сканирующего туннельного микроскопа, которого АСМ лишен, является тот факт, что в сканирующем туннельном микроскопе возможно исследовать только проводящие образцы. Именно создание в 1986-ом году атомно-силового микроскопа, в котором Биннинг так же принимал участие, позволило существенно расширить область применения зондовой микроскопии [59]. Этот прибор объединил в себе основные преимущества сканирующего туннельного микроскопа и позволил выбирать объектами исследования не только проводящие материалы, но также и полупроводники и диэлектрики.

Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силового взаимодействия, возникающего при изменении расстояния между зондовым датчиком (АСМ-кантилевером) и поверхностью исследуемого образца. В реальном случае между зондовым датчиком и поверхностью образца могут действовать силы различной физической природы: капиллярные, магнитные, электростатические, Ван-дер-Ваальсовы и другие. Благодаря этому фактору, атомно-силовой микроскоп позволяет кроме рельефа поверхности образца изучать также его электрические и магнитные свойства, механические параметры и так далее. Дополнительно атомно-силовой микроскоп может быть использован для модификации поверхности образца, например, с помощью методов силовой литографии [60].

АСМ-кантилевер обычно представляет собой упругую консоль, или балку, с одним жестко закрепленным концом. На противоположном конце расположена игла, с помощью которой происходит зондирование поверхности образца [61]. Основным конструкционным материалом для большинства стандартных коммерчески доступных АСМ-зондов является кремний (Si), не менее распространенными являются зонды на основе нитрида кремния ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). Варьироваться может также форма консоли: наибольшую популярность среди производителей получили прямоугольные и треугольные (или V-образные) АСМ-

зонды. Типичный АСМ-кантилевер имеет длину порядка 100–200 мкм, ширину 20–40 мкм и толщину 0,5–1 мкм [62]. Длина иглы типичного АСМ-зонда составляет несколько микрон, а радиус острия – от единиц до десятков нанометров.

Обычно для обеспечения высокого уровня чувствительности сканирования и во избежание чрезмерного разрушающего воздействия зонда на изучаемый объект используются АСМ-кантилеверы с относительно небольшим коэффициентом жесткости [61].

Универсальность метода АСМ, а также широкий спектр доступных к исследованию параметров образца, наряду с высоким пространственным разрешением, способствовали популяризации данного метода. В наши дни атомно-силовой микроскоп это наиболее часто используемая разновидность сканирующего зондового микроскопа. Метод с успехом применяется в таких областях как физика, нанотехнологии, материаловедение, биология и т.д. Являясь относительно новым методом, АСМ продолжает стремительно развиваться как в фундаментальном, так и в прикладном отношении, по причине чего постоянно находят новые способы применения в различных отраслях науки, а разработка методов и методик, направленных на совершенствование метода АСМ, представляется перспективной отраслью науки.

### **1.3.2 Возможности АСМ для метрологии механических параметров**

Характер силового взаимодействия, на котором основан принцип работы атомно-силового микроскопа, опосредованно содержит в себе информацию об изучаемом образце, и правильная интерпретация данного характера может предоставлять информацию в том числе о механических параметрах образца. Особенно важным является тот факт, что вследствие нанометровых размеров

зондового датчика атомно-силового микроскопа, механические параметры изучаемого образца исследуются на сопоставимом нано-уровне.

Например, режим работы атомно-силового микроскопа, получивший название "тэппинг", от английского "постукивание", даёт возможность получения в качестве результатов работы микроскопа карт распределения механических параметров поверхности изучаемого образца с помощью отслеживания изменений фазы колебания АСМ-кантилевера. Этот режим даёт возможность успешного отслеживания различий механических параметров разных изучаемых образцов, но, к сожалению, результаты его работы несут только качественный, а не количественный характер, поскольку изменения фазы колебания АСМ-кантилевера определяется различными факторами и может зависеть, в частности, от таких свойств исследуемого материала, как адгезивность, упругость или вязкость, а также от величины площади поверхности в контакте системы зонд-образец.

Основной методикой исследования механических параметров в атомно-силовом микроскопе является наноиндентирование, то есть деформация образца под воздействием давления зондового датчика, а основным источником количественных данных механических параметров изучаемого образца являются так называемые силовые кривые, которые отражают зависимость силы взаимодействия зондового датчика с поверхностью образца от расстояния между ними. Именно анализ силовых кривых, обычно проводимый автоматически с помощью специализированного программного обеспечения, встроенного в конструкцию атомно-силового микроскопа, позволяет осуществлять количественную интерпретацию таких механических параметров исследуемого образца, как деформация, жесткость, модуль Юнга, а также адгезия между зондовым датчиком и поверхностью исследуемого образца или диссипация энергии в процессе индентирования. В наше время существуют и применяются несколько разновидностей методов АСМ, основанных на детектировании, фиксации и интерпретации этих силовых кривых. В [63] такие режимы



обобщенно называются "force-distance curve-based AFM", или АСМ на основе кривых зависимости силы от расстояния.

Ярким представителем таких режимов является режим силовой спектроскопии [64]. В ней проводятся измерения в точках, задаваемых оператором прибора, а результаты измерений требуют дополнительной пост-обработки для получения требуемых количественных данных. Данный способ является выгодным при отсутствии необходимости в объемной выборке значений измеряемых величин, но неэффективен при анализе большого количества данных одновременно по причине больших временных затрат и низкой степени автоматизированности процесса.

Другой пример такого режима, Force Volume [65], осуществляет измерение механических параметров исследуемого образца с помощью координатной сетки – целой матрице из точек, которая накладывается на выбранный участок поверхности исследуемого образца. Результатом работы данного режима является массив данных в виде карты распределения изучаемого параметра, таких как деформация, модуль Юнга, сила адгезии или диссипация, которая также характеризует поверхность исследуемого образца. Поскольку в данном режиме измерение проводится в каждой точке матрицы, а частота индентации составляет от 0,1 до 10 Гц [66], время проведения эксперимента напрямую зависит от выбора разрешения результирующей АСМ-карты распределения интересующего параметра, то есть количества точек в матрице. Например, при частоте индентирования 1 Гц и разрешении 128×128 точек продолжительность эксперимента составит более четырех часов.

Ещё один режим, HarmoniX [67], основанный на "тэппинг" режиме, значительно увеличил производительность экспериментов по исследованиям механических параметров за счет использования специального зондового датчика в форме буквы "Т", который регистрирует деформацию кручения АСМ-кантилевера. В свою очередь, это позволяет измерять механические параметры изучаемого образца с таким же разрешением, как у изображения топографии исследуемой поверхности.

Однако, несмотря на такие очевидные преимущества, данный режим также обладает и набором существенных недостатков: во-первых, возможно использовать только специально-предназначенные для режима зонды; во-вторых, присутствует определенная дополнительная сложность в процессах проведения измерений и последующей обработке результатов измерений [67]; в-третьих, необходимость использования большой амплитуды пиковой силы, что может отрицательно сказаться на образце в случае изучения нативных клеток.

Наиболее выгодным и удобным режимом работы атомно-силового микроскопа в условиях поставленных целей и задач исследования представляется режим PeakForce QNM [68] от "Quantitative Nanomechanical property Mapping", то есть "количественное картирование наномеханических параметров", о котором будет более подробно рассказано в отдельном разделе данной работы.

### **1.3.3 Механические модели для анализа АСМ-данных**

Как уже описывалось выше, современной наукой установлено, что изменение механических параметров индивидуальных клеток может являться следствием протекания в организме патологических процессов, а модуль Юнга клеток, как одна из основных её механических параметров, может успешно служить индикатором физиологического состояния клетки [69–73], поэтому правильное измерение модуля упругости клетки носит важное фундаментальное и прикладное значение для многих отраслей научного знания. Однако, в современных методах, в том числе в методе АСМ, измерение модуля Юнга нативных клеток по-прежнему остается нетривиальной задачей и пока ещё не достигло стадии рутинных измерений. Кроме того, имеет место ряд фактов, указывающих на неправильный подход к интерпретации результатов измерений [74, 75].

В измерении модуля Юнга нативных клеток одной из ключевых проблем является существование одновременно нескольких теоретических моделей расчета модуля Юнга в контакте мягкой нативной клетки и твердого АСМ-зонда. Наибольшее распространение в современных атомно-силовых микроскопах получили упомянутые ранее модели Герца [15, 62, 76] и Снеддона [16], а также Дерягина-Мюллера-Топорова (ДМТ) [77] и Джонсона-Кендалла-Робертса, более известная по латинской аббревиатуре JKR [78, 79].

Модель Герца, которая так или иначе легла в основу остальных упомянутых моделей, была разработана им ещё в 1882-ом году и описала силовое контактное взаимодействие двух идеальных однородных упругих гладких тел. Как и любая другая модель, теория Герца предполагает некоторые допущения в своих расчетах, а именно отсутствие силы трения и адгезии между телами и ничтожная малость глубины индентации по сравнению с толщиной образца. К сожалению, на практике при работе с таким исследуемым образцом, как нативные клетки, не всегда удается эти допущения соблюсти.

Модели, ДМТ и JKR, будучи, как уже было упомянуто выше, основанными на модели Герца, имели целью своего создания расширение и уточнение первоначальной модели. Например, Снеддон вывел выражения для расчета модуля Юнга при учете допущения цилиндрической, конусообразной и других форм АСМ-зонда [80], а в работе [81] так же рассматривается случай допущения формы индентора, представляющей собой пирамиду.

Вопрос о выборе формы индентора также является важным, поскольку она оказывает непосредственное влияние на площадь контакта АСМ-зонда с поверхностью исследуемого образца и, соответственно, на величину давления, которое испытывает последний.

Модели ДМТ и JKR, в свою очередь, позволили учитывать силы адгезии между зондом и образцом. Однако, в данных моделях присутствует важное различие: в модели ДМТ считается, что адгезионные силы действуют только вне области контакта, а в JKR – только внутри этой области [82]. Вследствие разницы подходов к проблеме, ДМТ является более точной моделью описания контакта

твердых материалов со слабой силой адгезии, а модель JKR дает лучшие результаты при описании контакта липких податливых материалов [83].

В вопросе использования в процессе интерпретации результатов работы атомно-силового микроскопа моделей для определения модуля Юнга в случае нативных клеток имеются некоторые разночтения. Некоторые исследователи предполагают, что такие модели могут предоставлять лишь качественную информацию о механических параметрах этих объектов [74, 84], в то время как другие не сомневаются в достоверности получаемых ими результатов [85–104]. Решением проблемы могла бы стать разработка более точных моделей, позволяющих учитывать сложное и неоднородное строение клеток, их морфологические особенности и отсутствие абсолютной упругости среди их механических параметров, однако автору работы видится более правильным с прикладной точки зрения подход, подразумевающий стандартизацию протоколов измерений и модернизацию процесса интерпретации результатов измерений механических параметров нативных клеток методом АСМ.

Тем не менее, модель Герца и другие модели, основанные на ней, активно применяются на практике, несмотря на их явные недостатки. В первую очередь это связано с простотой этих моделей. Не менее важным является тот факт, что точность измерений, представляемая данными моделями, в большинстве случаев является удовлетворительной.

Отдельное внимание хотелось бы обратить на одно весьма спорное допущение, присутствующее во всех рассмотренных моделях. Проблема заключается в том, что все эти модели рассматривают только идеальный случай отсутствия трения между зондом и поверхностью исследуемого образца, то есть ситуацию скольжения зонда по поверхности, в то время как в реальности, учитывая некоторые свойства клеток, например, природную предрасположенность тромбоцитов к прилипанию к другим клеткам, вполне может иметь место случай защемления в контакте системы зонд-образец. В таком случае, исследуемый образец будет деформироваться не только в плоскости индентирования  $Z$ , но и в латеральных плоскостях  $XY$ , и при оценке модуля Юнга

исследуемого объекта может допускаться существенная ошибка в величинах получаемых результатов.

Дело в том, что в случае заземленного контакта в системе зонд-образец может происходить аномальный изгиб АСМ-кантилевера, что, в свою очередь, может привести к дополнительной погрешности измерений, поскольку по умолчанию такой случай прогиба консоли не учитывается. На рисунке 1.1 представлено сравнение двух крайних случаев поведения АСМ-консоли при различном взаимодействии с исследуемым образцом.

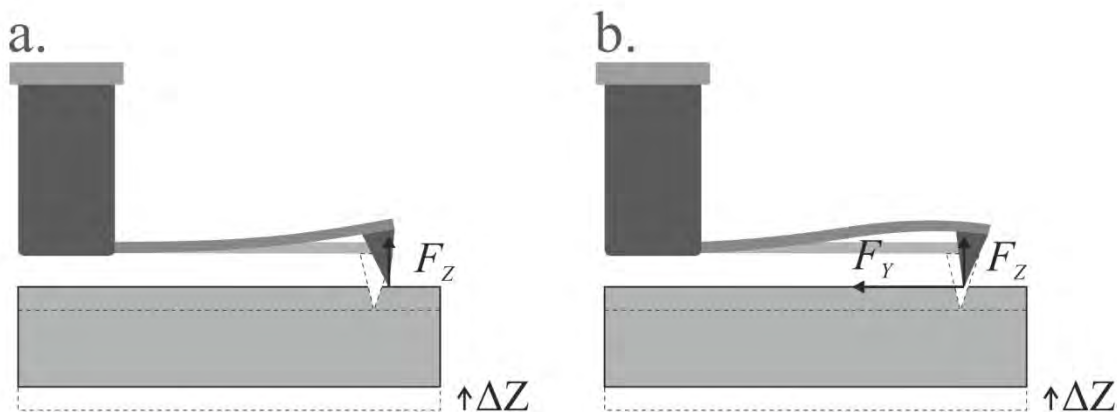


Рисунок 1.1 – Деформация консоли при смещении образца на высоту  $\Delta Z$ : а) – в условиях скользящего контакта (трения нет, действует только  $F_z$ ); б) – зонд защемился на образце (добавилось трение и  $F_y$ ).

Данную проблему можно учесть и успешно нивелировать в случае использования двухлучевую систему детектирования изгибов кантилевера вместо стандартной [105, 106]. Такая система отличается от стандартной наличием дополнительной пары лазер-фотодиод (рисунок 1.2). Первая пара лазер-фотодиод юстируется по стандартной процедуре – основной лазерный луч падает на конец консоли АСМ-кантилевера и, отражаясь, попадает на основной фотодетектор, а дополнительная пара настраивается таким образом, что дополнительный луч падает на середину консоли и попадает в дополнительный фотодетектор соответственно.

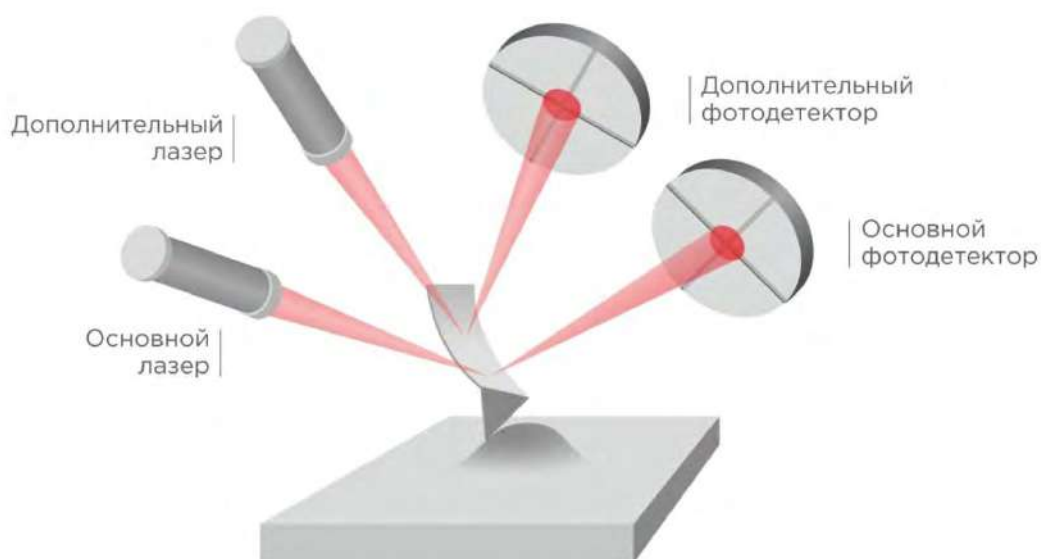


Рисунок 1.2 – Система, описанная в [105].

Похожая система детектирования с некоторыми модификациями описана в [107]. В ней так же используется основной и дополнительный лазер, но уже только один фотодетектор (рисунок 1.3), а разделение сигналов от лазеров происходит за счет временного разделения их импульсов.

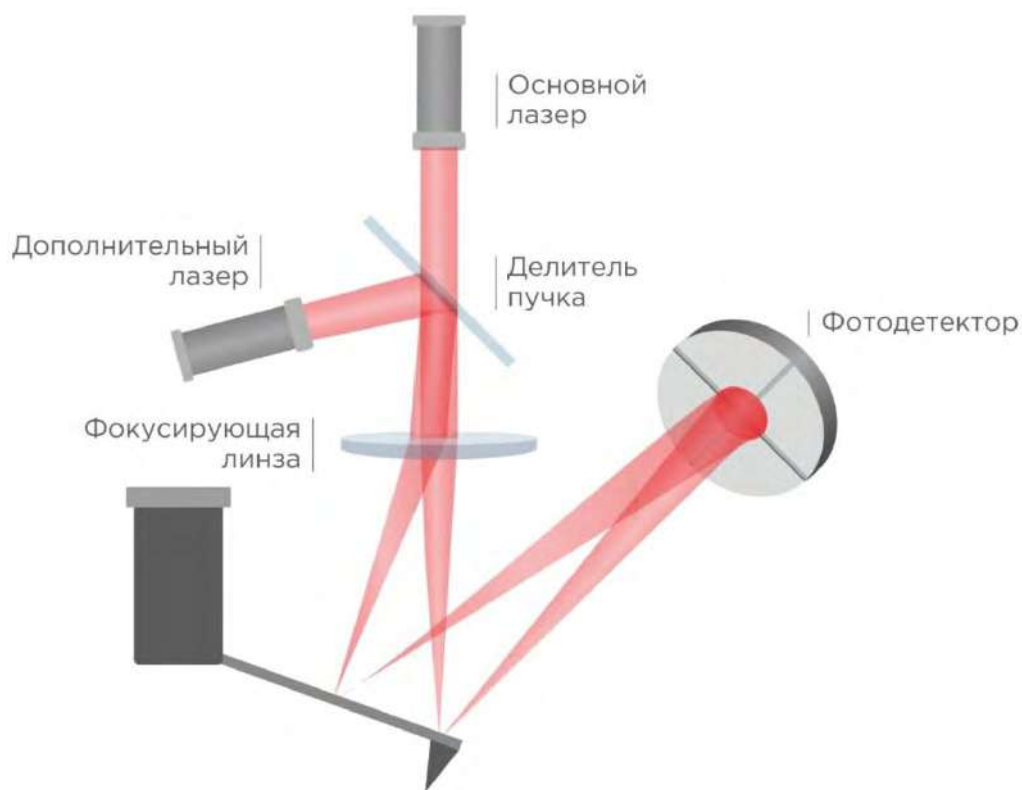


Рисунок 1.3 – Система, описанная в [107].

Однако, данные описанные схемы так же не лишены недостатков. Во-первых, по причине относительно недавнего появления на рынке АСМ-устройств [108], еще только предстоит установить степень их надежности. Во-вторых, данные системы являются дорогостоящим дополнением к и так недешевым атомно-силовым микроскопам.

Также, не совсем корректным представляется выбор точки дополнительной фокусировки лазерного луча на консоли кантилевера.

Также, вместо использования описанных модификаций, практически такой же результат даст применение конструктивно более простой методики измерений. Один и тот же объект следует последовательно сканировать сначала, юстируя лазерный луч на конце консоли кантилевера, затем на одной трети длины консоли от чипа кантилевера. Результаты применения данной методики подробно описываются далее в работе.

Ранее было не установлено, имеет ли место аномальные прогиб консоли при взаимодействии зондового датчика с нативными клетками [84], однако данная работа не только представляет результаты, демонстрирующие наличие такой ситуации, но и предлагает способы их детектирования и компенсации.

Как уже было описано выше, существующие методы исследования механических параметров позволяют оценивать реакцию клеток на деформацию в случае активных методов, и регистрировать силы, которые клетки создают сами в случае пассивных методов. АСМ выгодно выделяется на фоне остальных активных методов измерения механических параметров нативных клеток даже в свете определенных ее недостатков. Относительно недавно в АСМ появились новые режимы работы – квазистатические, которые на данном этапе еще не очень активно применяются в исследованиях нативных клеток, однако, могут помочь увеличить степень эффективности измерений, поскольку представляют возможность существенного уменьшения времени сканирования, что является существенным фактором при изучении нативных клеток, практически без потерь информативности. Модуль Юнга клеток, измеряемый в том числе методом АСМ, активно используется в качестве индикатора физиологического состояния

нативных клеток и может использоваться для отслеживания реакции клеток на различные внешние воздействия. Однако, как уже было показано на примере других авторов, интерпретировать результаты измерений этого параметра следует крайне осторожно и обязательно с учетом многочисленных факторов, влияющих на точность его измерений. Именно на учет, компенсацию вкладов и нивелирование последствий этих факторов и направлены в конечном счете методики, представленные в данной работе.

### **1.3.4 Квазистатические режимы АСМ**

Ещё в конце XX века возникла идея создания квазистатического режима работы АСМ [109], который бы объединял достоинство контактного и "тэппинг" режимов, то есть работал бы при постоянной нагрузке и с минимизацией латеральных сил, однако, реализовать эту идею тогда не представлялось возможным, поскольку принцип работы данного режима предполагает обработку огромных объемов информации. И только относительно недавно появилась техническая возможность воплотить идею этого режима в реальность за счет создания системы обработки сигналов и сбора данных в режиме реального времени с необходимым и достаточным уровнем быстродействия [110]. Принцип работы квазистатического режима заключается в регистрации и анализе силовых кривых, однако, квазистатический режим работы атомно-силового микроскопа позволяет регистрировать силовые кривые с гораздо большей скоростью по сравнению с другими режимами работы, что в свою очередь обеспечивает получение АСМ-карт распределения различных свойств поверхности исследуемого образца с достаточно высоким пространственным разрешением при гораздо меньше временных затратах.

Передвижение зондового датчика в квазистатическом режиме работы очень похоже на передвижение в режиме "тэппинг", но имеется существенное различие:



в квазистатическом режиме колебания АСМ-кантилевера происходят на частоте гораздо более низкой, чем собственная резонансная частота зонда. В свою очередь с контактным режимом у квазистатического тоже имеются общие точки соприкосновения, например, параметром обратной связи так же случит сила или отклонение кантилевера. Однако, использование квазистатического режима работы атомно-силового микроскопа предоставляет возможность получения гораздо большего количества информации об объекте изучения, поскольку регистрация силовой кривой проводится в каждой точке измерения. Эта особенность данного режима также позволяет изучать одновременно топографию, механические, адгезивные, электро- и магнитостатические и другие параметры поверхности исследуемого образца. Как уже упоминалось ранее, силовая кривая, получаемая атомно-силовым микроскопом, содержит информацию о взаимодействии зондового датчика с поверхностью исследуемого образца, в том числе о его упругих, вязкоупругих и пластических свойствах [110]. В результате анализа и интерпретации силовых кривых можно количественно определить величину деформации, жесткости, модуля Юнга образца, а так же других его свойств, в том числе механических параметров.

Описанная выше концепция квазистатического режима работы атомно-силового микроскопа была впервые реализована в виде режима импульсной силы [111]. В этом режиме АСМ-кантилевер совершает непрерывные синусоидальные колебания с частотой, величина которой гораздо ниже резонансной частоты самого кантилевера, и индентирует изучаемый образец в каждой точке измерения, затем отводится на безопасное расстояние и перемещается к новой точке индентации. В совокупности, все вышеперечисленные особенности режима позволяют использовать стандартные коммерчески доступные АСМ-кантилеверы, в то же время существенно увеличивая скорость проведения экспериментов по изучения механических параметров.

Тот факт, что в настоящее время описанный квазистатический режим работы активно внедряется в коммерчески доступные модели атомно-силовых микроскопов, также свидетельствует в пользу преимущества данного режима

перед другими. Так, фирма Bruker в своих приборах внедряет этот режим под названием PeakForce QNM, о котором уже упоминалось выше, а компания НТ-МДТ СИ называет его Hybrid mode [112]. Также существуют режимы QI [113] и DPFM [114] в приборах компаний JPK Instruments и WITec соответственно.

Перечисленные режимы работы атомно-силового микроскопа, естественно, имеют некоторые отличия, например, в алгоритмах обработки получаемых данных, но, принципиально все описанные режимы весьма схожи.

Как уже говорилось ранее, режим работы атомно-силового микроскопа PeakForce QNM был создан на основе режима PeakForce Tapping, также созданного компанией Bruker [115]. Доступный в данном режиме диапазон частот измерений (0,25–2 кГц) представляет возможность получения АСМ-карт распределения различных свойств поверхности исследуемого образца с высоким разрешением за считанные минуты, в отличие от своих предшественников. В этом режиме параметром обратной связи является пиковая сила индентации, что, видимо, и послужило причиной для выбора названия режима. Модуляция силы в режиме PeakForce QNM осуществляется синусоидально. Таким образом, зондовый датчик замедляет скорость передвижения, когда приближается к точке, в которой действующая сила является максимальной. В результате в каждой точке измерения ошибка сигнала обратной связи минимизируется, равно как и степень воздействия зондового датчика на поверхность образца, что в свою очередь позволяет более успешно сохранять и зондовый датчик и образец неповрежденными.

Компания-производитель утверждает, что режим PeakForce QNM позволяет контролировать силу взаимодействия зондового датчика с поверхностью изучаемого образца на уровне менее 100 пкН [67, 109]. Также заявляется достаточно широкий диапазон сил взаимодействия в системе зонд-образец: от пиконьютонов до микроьютонов, который гарантируется широким ассортиментом коммерчески-доступных АСМ-кантилеверов с различным уровнем жесткости консоли кантилевера [109].

Таким образом, квазистатический режим работы атомно-силового микроскопа исторически положительно зарекомендовал себя в экспериментах по исследованию морфологии и механических параметров в том числе таких биологических образцов, как нативные клетки, за счет точного контроля силы индентации, возможности проведения эксперимента в жидкости, высокого разрешения АСМ-карт распределения различных свойств изучаемого образца и высокой скорости проведения экспериментов по сравнению с обычным "тэппинг" режимом. В литературе упоминается успешное применение режима PeakForce QNM для таких объектов как биополимеры [116, 117], бактерии [66, 118], клеточные стенки эукариот [119, 120], животные клетки [66, 118, 121], раковые клетки [122, 123], и тому подобные.

### **1.3.5 Особенности применения АСМ в исследованиях животных клеток, достоинства и недостатки**

АСМ выгодно выделяется на фоне других описанных выше методов изучения механических параметров нативных клеток. Одним из основных преимуществ данного метода является в первую очередь его универсальность, в том смысле, что АСМ позволяет одновременно изучать морфологические и механические параметры клеток. Затем следует отметить высокое пространственное разрешение, сравнимое с электронным микроскопом. Не менее важным фактором является возможность проведения экспериментов с нативными клетками в физиологически-адекватных условиях за счет возможности работы зондового датчика атомно-силового микроскопа как на воздухе, так и в жидкости и при разных температурных условиях. Также не следует упускать из виду простые относительно других методов способы пробоподготовки образцов для изучения атомно-силовым микроскопом. И, конечно, стоит отметить крайне важную при работе с нативными клетками малую степень инвазивности метода,

которая позволяет успешнее сохранять клетки в интактном, то есть не подверженном внешнему воздействию, состоянии.

Однако, метод АСМ, конечно, не является идеальным, и имеет и свои недостатки. Во-первых, даже несмотря на малоинвазивность метода, реакция нативной клетки на внешнее воздействие остается достаточно непредсказуемой. Поскольку сила, действующая на клетку со стороны зонда, и размеры самой клетки являются сопоставимыми величинами – такая сила может вызывать некоторое изменение её свойств. Из этого недостатка прямо вытекает следующий: невозможность полного исключения вероятности чисто механического повреждения или даже разрушения клетки зондовым датчиком. Также, среди недостатков метода АСМ следует отметить временной фактор. Даже не смотря на существование режимов, позволяющих сильно ускорять процесс сканирования без потерь качества получаемых АСМ-карт, получение изображения все еще может занимать слишком длительный для сохранения нормальной жизнедеятельности клетки период времени. Эту проблему так же пытаются решать с помощью развития высокоскоростной АСМ [124], однако, этот метод является достаточно новым, и степень его надежности и применимости к биологическим объектам еще предстоит установить. Ещё одним серьезным недостатком, о котором уже упоминалось в пункте 1.3.3 настоящей работы, является несовершенство механических моделей вычисления модуля Юнга, которые используются в программном обеспечении прибора.

Однако, несмотря на ряд своих недостатков, метод АСМ по-прежнему остается крайне удобным и продуктивным при исследовании механических параметров нативных клеток, чем полностью удовлетворяет целям и задачам данной работы. Метод также имеет перспективу дальнейшего развития, заключающуюся в преодолении существующих недостатков, и не меньшую перспективу дальнейшего распространения в различных биомедицинских исследованиях.

#### 1.4 Выводы. Постановка целей и задач диссертационного исследования

Таким образом, вышеперечисленные факты позволяют сделать следующие выводы. Метод АСМ считается перспективным в биомедицинских исследованиях по: охарактеризации индивидуальных геометрических и механических параметров нативных клеток, определению физиологического и патологических состояний, тестированию действия различных токсинов или лекарств. Несмотря на популярность АСМ, ощущается явное отсутствие стандартизации: результаты измерений одних и тех же объектов у разных исследователей сильно разнятся. Такая ситуация может быть следствием упрощенного взгляда на контакт зонда с образцом. Считается, что в образце нет сдвиговых напряжений, он индентируется только в нормальном направлении, т.е. зонд не деформирует его в плоскости сканирования, поскольку скользит по поверхности. Исходя из этого предположения, для обработки результатов экспериментов используются основанные на теории Герца модели упругого контакта.

Ряд исследователей указывали на проблему, обусловленную ограниченностью методики детектирования отклонений кантилевера – оптического рычага. В такой схеме измеряется два параметра: угол изгиба и угол кручения консоли в точке фокуса лазерного луча, выбранной обычно на конце консоли, в то время как вектор смещения и приложенной силы имеет три компоненты. Поскольку угол изгиба определяется по наклону лишь в одной точке консоли, невозможно распознать аномальный прогиб консоли, который, в свою очередь, может служить причиной ошибочных измерений амплитуды и направления силы взаимодействия.

Если зонд защемляется образцом, то консоль во время вертикального движения прогнётся, т.е. профиль угла прогиба будет иметь экстремум, в отличие от ситуации, когда зонд скользит по образцу и консоль изгибается, т.е. угол изгиба монотонно возрастает либо убывает к концу консоли. Такая неопределенность создает дополнительные трудности при интерпретации

результатов измерений в большинстве современных АСМ. Особенно важно иметь в виду этот факт при анализе результатов исследований мягких и липких объектов, таких как: гидрогели, полимеры, живые клетки. Лишь недавно начали предлагаться конструктивные решения проблемы, и, наконец, появилась схема измерения отклонения кантилевера, совмещающая в себе методы оптического рычага и интерферометра.

Как следствие рассмотренного состояния дел, в вопросе о точности АСМ-измерений механических параметров образца оказывается весьма актуальными теоретический и практический анализ стандартных силовых кривых, учитывающий граничные условия в контакте зонд-образец: скольжение контакта, заземление, а также переходы между такими состояниями.

Из данных выводов формируется цель настоящей работы: создать новые методики атомно-силовой микроскопии для адекватных измерений механических параметров (деформации, контактной жесткости, модуля Юнга) и рельефа морфологии нативных клеток животных, полимерных гидрогелей, других мягких объектов. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сформировать критерии классификации контакта АСМ-зонда с мягкими объектами по принципу «липкий-скользкий» для обеспечения адекватности АСМ-измерений их механических и геометрических параметров.

2. Разработать методику определения вклада геометрической формы кантилевера в результаты измерений кажущейся контактной жесткости и эффективного модуля Юнга мягких объектов. Апробировать данную методику на нативных нейронах, исследуя их методом АСМ в условиях близких к физиологическим.

3. Разработать методику выявления состояний скольжения-залипания в контакте АСМ-зонда с индивидуальным мягким объектом. Апробировать данную методику на нативных фибробластах, исследуя их методом АСМ в условиях близких к физиологическим.

## **ГЛАВА 2. ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА АСМ В МЕТРОЛОГИИ МЯГКИХ ОБЪЕКТОВ**

Данная глава является методической, а также содержит отдельные оригинальные результаты, полученные автором работы. В ней приводится принцип действия атомно-силового микроскопа. Рассматривается оптимизированный для биологических образцов зондовый микроскоп Bruker BioScope Catalyst и особенности квазистатического режима PeakForce QNM, которые выступили основными инструментами получения результатов данной работы. Описываются особенности выбора зондового АСМ-датчика для измерений механических параметров нативных клеток и их пробоподготовки для АСМ-исследований. Демонстрируются варианты определения эффективного модуля Юнга в режиме PeakForce QNM. Излагаются условия и параметры сканирования клеток в PeakForce QNM. Кроме того, описывается процесс калибровки АСМ-кантилеверов, особенности экспериментов по изучению клеток, обосновывается выбор параметров сканирования нативных клеток в режиме PeakForce QNM и приведена общая информация об обработке АСМ-данных. Также в данной главе определяются такие термины, как "мягкий объект", "скользящий объект" и "липкий объект".

### **2.1 Основные компоненты и принцип работы АСМ**

Как уже указывалось выше, атомно-силовой микроскоп является разновидностью сканирующего зондового микроскопа. Впервые атомно-силовой микроскоп был сконструирован в 1982-ом году и с тех пор его принципиальное устройство почти не изменилось. Однако, современный атомно-силовой микроскоп представляет из себя конструктивно сложный и многокомпонентный

прибор, к обязательным составляющим которого относятся следующие элементы: зонд, система регистрации отклонения зонда, система обратной связи, система управления микроскопом, система обработки и хранения информации и другие факультативные элементы.

Представленные на рынке современные атомно-силовые микроскопы обычно укомплектованы также оптическим микроскопом, который предназначается для упрощения процесса поиска необходимой области АСМ-сканирования и настройки системы регистрации отклонения зонда в случае использования системы из лазерного луча и фотодетектора.

Основным функциональным элементом атомно-силового микроскопа является зонд, или зондовый датчик, который используется для измерения морфологических, механических и других параметров изучаемого объекта, а также участвует в процессе регистрации силовых кривых, вызванных взаимодействием зонда с образцом. Изменение положения зондового датчика относительно образца в атомно-силовом микроскопе происходит за счет пьезокерамического сканера. Принцип его действия основан на так называемом обратном пьезоэффекте – геометрические параметры тела изменяются в ответ на приложенное электрическое поле. Таким образом, вследствие того, что функциональные элементы АСМ-сканеры производятся из пьезоматериала, это наличие в них этого обратного пьезоэффекта позволяет осуществлять очень точные перемещения, что в свою очередь создает возможность достижения высокого пространственного разрешения АСМ-изображений и, как следствие, их высокого качества.

Процесс сканирования в атомно-силовом микроскопе принципиально напоминает движение пучка электронов в электронно-лучевой трубке (ЭЛТ). Как и поток электронов, который движется по люминофорному экрану в ЭЛТ строка за строкой, АСМ-зонд перемещается вдоль поверхности образца, построчно регистрируя морфологические особенности рельефа его поверхности. В различных моделях атомно-силовых микроскопов может быть реализована разная концепция сканирования в зависимости от тех или иных конструктивных



особенностей. Например, в некоторых атомно-силовых микроскопах образец устанавливается на сканер и перемещается вместе с ним вдоль остающегося неподвижным зондового датчика. Такая разновидность АСМ-сканирования также иногда называется "сканирование образцом". В других приборах, наоборот, образец остается неподвижным, а движется закрепленный на пьезосканере зондовый датчик. Такой вид АСМ-сканирования называется "сканирование зондом". Встречаются также и гибридные системы АСМ-сканирования, в которых совмещаются оба описанных варианта.

В результате взаимодействия зондового датчика с поверхностью исследуемого образца во время АСМ-сканирования возникают Ван-дер-Ваальсовы силы, под действием которых АСМ-кантилевер изгибается. Существуют различные способы регистрации величины изгиба консоли кантилевера, угла  $\theta$ . Наиболее распространенной в современных атомно-силовых микроскопах является система оптического детектирования. В такой системе на тыльную сторону консоли кантилевера, поверхность которой специально покрывается материалами с большим коэффициентом отражения, падает лазерный луч, который затем, отражаясь от этой поверхности, попадает на фотодетектор, представляющий из себя четырехсекционный фотодиод. В фотодетекторе затем преобразует полученный сигнал лазерного луча в электрический ток таким образом, что общий суммарный сигнал складывается из суммы компонентов сигнала, возникающих в каждой отдельной секции фотодиода.

Когда АСМ-кантилевер находится в изначальном, то есть неизогнутом состоянии на большом расстоянии от поверхности образца, производится юстировка системы детектирования отклонения консоли кантилевера таким образом, чтобы отраженный от тыльной поверхности консоли кантилевера луч лазера точно попадал в центр фотодетектора. В таком случае разностный сигнал между верхними и нижними секциями, то есть парами секций А-В и С-Д на рисунке 2.1 (4) будет равняться нулю. Изгиб консоли АСМ-кантилевера, таким образом, повлечет за собой смещение пятна от лазерного луча относительно

начального положения, то есть центра фотодетектора, и пропорциональное изменение электрического сигнала (напряжение,  $\Delta U$ , или ток,  $\Delta I$ ) на фотодиоде, т.е.  $\theta \sim \Delta U$  (или  $\Delta I$ ). В случае работы системы детектирования за счет измерения напряжения,  $\Delta U$  определяется следующим образом:

$$\Delta U = (\Delta U_A + \Delta U_B) - (\Delta U_C + \Delta U_D) \quad (2.1)$$

где  $\Delta U$  – изменение напряжение на  $i$ -том сегменте фотодиода.

Таким образом, в процессе АСМ-сканирования по изменениям сигнала, принимаемого фотодетектером, вызываемым изгибами консоли АСМ-кантилевера, можно отслеживать размер и форму морфологических особенностей поверхности исследуемого образца.

На рисунке 2.1 показана упрощенная принципиальная схема устройства атомно-силового микроскопа. Трубчатый пьезодвигатель (5) передвигает образец по  $XYZ$  направлениям. Вследствие силового взаимодействия зондового датчика с поверхностью образца (3), кантилевер (2) изгибается. Величина изгиба кантилевера регистрируется оптической системой, состоящей из лазера (1) и четырехсекционного фотодиода (4).

Управление процессом сканирования в атомно-силовом микроскопе производится за счет работы системы обратной связи. Принцип действия данной системы основан на поддержании на постоянном определенном "нулевом" уровне некоего интересующего нас параметра сканирования  $P$ , позволяющего отслеживать рельеф изучаемой поверхности [120]. Этот параметр варьируется в разных конструкциях атомно-силовых микроскопов и разных режимах его работы. Пусть исходное значение выбранного параметра будет  $P_0$ , тогда при изменении расстояния между зондом и образцом мы получим выражение  $P_i = P_0 + \Delta P$ . Для компенсации  $\Delta P$  будет сгенерирован управляющий сигнал  $\Delta U_{упр}$ , который увеличит или уменьшит длину Z-сканера от знака  $\Delta P$ . В результате, величины смещения сканера под действием  $\Delta U_{упр}$ , будут использованы для построения высотного распределения поверхности исследуемого образца.

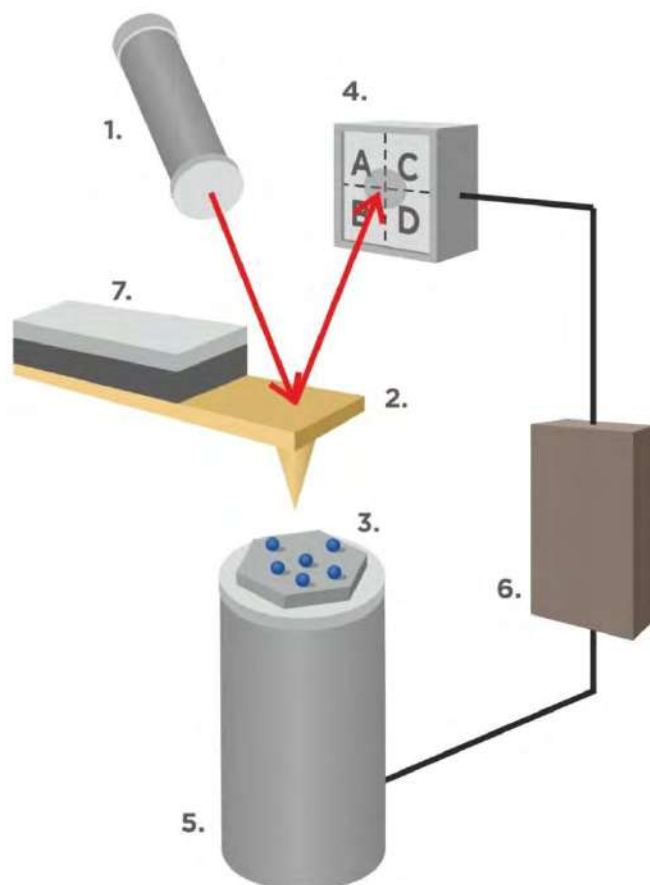


Рисунок 2.1 – Упрощенная принципиальная схема атомно-силового микроскопа с оптической системой детектирования (1 – лазер, 2 – кантилевер, 3 – образец, 4 – фотодиод, 5 – трубчатый пьезодвигатель, 6 – блок обратной связи, 7 – пьезомодулятор).

Чаще всего осуществляющий управление атомно-силовым микроскопом контроллер конструктивно выполняется в виде отдельного блока электроники соединяющего рабочую часть прибора с персональным компьютером, который с помощью установленного специально предназначенного для этих целей программного обеспечения предоставляет возможность давать управляющие команды, а также собирать, обрабатывать и хранить получаемые атомно-силовым микроскопом данные. Сканирование изучаемого образца зондовым датчиком позволяет осуществлять визуализацию рельефа поверхности образца за счет получаемого с помощью программного обеспечения объединения отдельных профилей высоты в единое трехмерное изображение.

Существует определенное ограничение допустимого размера области сканирования и максимального возможного перепада высот изучаемого образца, которые варьируются в зависимости от установленного в атомно-силовом образце сканера. Обычно эти величины составляют порядка 10–100 мкм и 1–10 мкм соответственно.

В современных атомно-силовых микроскопах реализуется несколько различных режимов работы. Чаще всего встречаются контактный и так называемый тэппинговый режимы. В случае контактного режима работы зондовый датчик находится в постоянном непрерывном контакте с поверхностью исследуемого образца. Во время сканирования зонд движется по поверхности образца, повторяя все её морфологические особенности. Параметром обратной связи в этом случае выступает отклонение АСМ-кантилевера от выбранного первоначального "нулевого" положения.

В случае тэппинг режима зондовый датчик постукивает по поверхности исследуемого образца, контактируя с последним лишь кратковременными интервалами. Для этого колебания кантилевера требуется возбудить на величине, близкой к его резонансной частоте. В качестве параметра обратной связи в данном случае обычно используется амплитуда вертикальных колебаний зонда, которая изменяется в зависимости от высоты поверхности исследуемого образца.

## **2.2 АСМ для биологических приложений Bruker BioScope Catalyst**

Возрастающий интерес к биологическим АСМ-исследованиям повлек за собой активное появление на рынке атомно-силовых микроскопов, специально оптимизированных для таких целей. Именно к таким приборам относится атомно-силовой микроскоп Bruker BioScope Catalyst [125], который был использован в рамках данного исследования. Все эксперименты по АСМ проводились с

использованием микроскопа Bruker BioScope Catalyst, который находится в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Bruker BioScope Catalyst, изображенный на рисунке 2.2, совмещен с инвертированным оптическим микроскопом Carl Zeiss Axio Observer Z1, который позволяет визуализировать прозрачные образцы, в том числе биологические. Эта конструкция в свою очередь находится на виброизоляциином столе, позволяющем нивелировать внешние колебания, уменьшающие точность эксперимента. Bruker BioScope Catalyst так же оснащен отдельным юстировочным столиком, предназначенным для упрощения процесса юстировки оптической системы детектирования EasyAlign. Рабочий узел атомно-силового микроскопа BioScope Catalyst, в свою очередь, состоит из базовой плиты и сканирующей головки. XY-сканер встроен в базовую плиту, а в сканирующей головке атомно-силового микроскопа располагается пьезоэлемент, ответственный за перемещения зонда по оси Z. Данный атомно-силовой микроскоп выгодно отличается от своих коммерчески-доступных аналогов большими диапазонами сканирования, составляющими 150 мкм и 20 мкм по осям XY и Z соответственно [125].



Рисунок 2.2 – Атомно-силовой микроскоп Bruker BioScope Catalyst со вспомогательным оборудованием [126].

Дополнительные физиологические условия эксперимента обеспечивает нагревательный столик, интегрированный в базовую плиту, и управляемый с помощью температурного контроллера LakeShore Model 335 [127]. С их помощью возможно контролировать температуру образца и поддерживать ее около 37°C. Поскольку Bruker BioScope Catalyst позволяет использовать не только стандартные предметные и покровные стекла, но и чашки Петри, это позволяет проводить эксперименты как на воздухе, так и в жидкости, что также повышает качество физиологических условий эксперимента. Совокупность этих параметров прибора делает его превосходно приспособленным для работы с биологическими образцами, что целиком удовлетворяет целям и задачам настоящей работы.

Управление прибором осуществляется посредством специально предназначенного программного обеспечения NanoScope 8.19 с помощью блока электроники E-Vox и контроллера NanoScope V. В программном обеспечении NanoScope 8.19 наряду с обычными режимами работы прибора, такими как контактный и тэппинг режимы, доступен к использованию режим, вкратце описанный в пункте 1.3.4 настоящей работы – режим количественной наномеханики PeakForce QNM, который использовался в данной работе в исследованиях нативных клеток, в том числе их механических параметров.

### **2.3 Режим поточечного зондирования PeakForce QNM и его особенности**

Вследствие того, что нативные клетки представляют из себя весьма деликатный образец, возможность исследования их традиционными контактными или тэппинг режимами работы атомно-слового микроскопа крайне ограничена.

В первом случае, в результате постоянного контактирования зондового датчика с поверхностью исследуемого образца в процессе АСМ-сканирования возникают значительные латеральные силы, которые способны приводить к

повреждению таких объектов, как нативные клетки, в результате их соприкосновения с острым АСМ-зондом, или к откреплению их от подложки.

В тэппинг режиме латеральные силы не так ярко выражены, как в контактном, поэтому данный режим лучше подходит для работы с нативными клетками, но, поскольку такие клетки необходимо исследовать в жидкости, в этом режиме возникают проблемы с калибровкой резонансной частоты зонда по причине его низкой добротности ( $Q$ ) в жидкой среде, которая падает со значений  $\sim 100$ – $500$  на воздухе до  $\sim 1$  в жидкости.

Кроме того, тэппинг режим не предоставляет возможностей для количественных измерений механических параметров исследуемого образца, а отсутствие возможности напрямую контролировать силу индентации не способствует безопасности эксперимента для целостности объекта исследования.

Режим PeakForce QNM был создан и предназначен для того, чтобы нивелировать недостатки контактного режима и режима "тэппинг". В режиме PeakForce QNM зондовый датчик индентирует поверхность исследуемого образца в каждой из точек измерения, затем отводится по оси  $Z$  на безопасное расстояние, совершает перемещение к следующей точке и снова индентирует поверхность. Таким образом, в процессе сканирования не возникает слишком больших латеральных сил, которые могли бы повредить исследуемый объект. А необходимость в калибровке резонансной частоты отсутствует, поскольку кантилевер колеблется на другой частоте. Параметром обратной связи в данном режиме служит пиковая сила индентации с возможностью ее контроля вплоть до  $10$  пН, и поэтому становится гораздо легче подбирать подходящую силу, которая обеспечит одновременно и высокое разрешение АСМ-карт распределения параметров исследуемого образца и сохранность объекта исследований [68].

Как уже упоминалось выше, в случае использования режима PeakForce QNM прибор в каждой точке измерения регистрирует кривую зависимости силы индентации от времени. Такая кривая обычно называется "пульс"-кривая (от англ. heartbeat), и на ее регистрацию обычно уходит от  $4$  до  $0,5$  мс при частоте колебаний зонда равной от  $0,25$  до  $2$  кГц соответственно. Пример такой кривой

представлен на рисунке 2.3 а. Методами специально предназначенного программного обеспечения в процессе работы атомно-силового микроскопа кривая "пульс" преобразуется в стандартную АСМ-силовую кривую. Такая силовая кривая описывает зависимость силы взаимодействия зондового датчика и образца от расстояния между ними. Пример такой кривой представлен на рисунке 2.3 б. Анализируя эту кривую, можно рассчитать такие параметры образца, как его деформация, модуль Юнга, сила адгезии и диссипация. Поскольку программная обработка силовых кривых и их анализ производятся непосредственно в процессе АСМ-сканирования, это позволяет одновременно получать информацию о рельефе поверхности изучаемого образца и его механических параметрах без дополнительной постобработки.

Горизонтальная часть зеленой кривой до точки 1 (рисунок 2.3 а) демонстрирует отсутствие силового контактного взаимодействия между зондовым датчиком и поверхностью исследуемого образца, в точке 1 АСМ-кантилевер вступает в соприкосновение с поверхностью образца. На отрезке 1–2 зондовый датчик начинает с возрастающей силой индентировать объект исследования, максимум силы достигается в экстремуме кривой в точке 2. Отрезок красной кривой 2–3 демонстрирует отведение зонда от поверхности исследуемого образца и соответствующим последовательным уменьшением силы взаимодействия между зондом и поверхностью исследуемого образца. В точке 3 происходит отрыв зондового датчика от поверхности образца, а затем зондовый датчик более не испытывает силу отталкивания со стороны поверхности образца (горизонтальная часть красной кривой после точки 3).



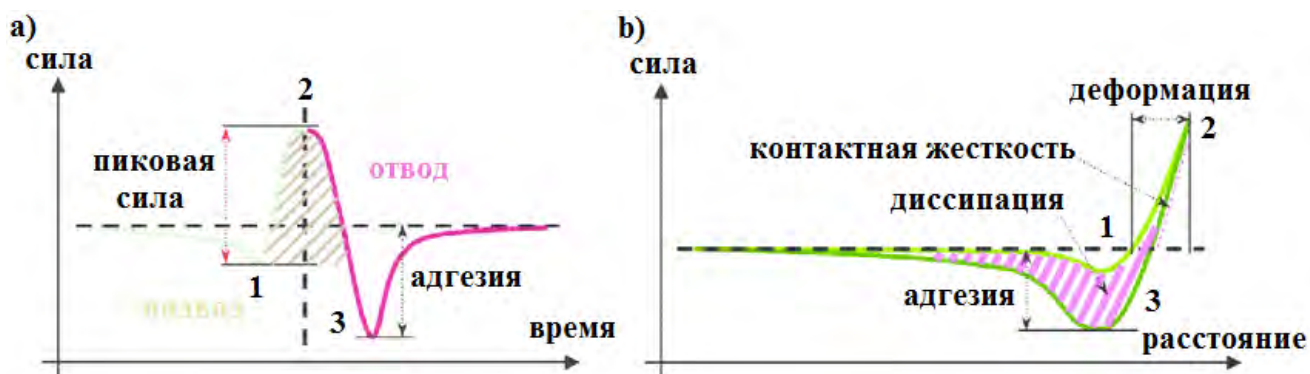


Рисунок 2.3 – а) "пульс"-кривая, регистрируемая в каждой точке измерения в режиме PeakForce QNM, б) силовая кривая, получаемая в результате программной обработки "пульс"-кривой.

На рисунке 2.3 а, б продемонстрированы свойства, вычисляемые по силовой кривой: диссипация, пиковая сила, сила адгезии, величина деформации и т.д. Пиковая сила является суммой выбранного опорного значения силы и ошибки в конкретной точке измерения. Величина деформации отражает податливость образца при индентации его зондовым датчиком (мягкий, податливый, образец демонстрирует большую деформацию, твердый – маленькую). Также параметром, отражающим податливость образца, может успешно служить модуль Юнга.

Сила адгезии демонстрирует то, как сильно зондовый датчик прилипает к поверхности исследуемого образца. При увеличении расстояния между зондовым датчиком и образцом острие зондового датчика еще какое-то время остается в контакте с поверхностью образца, что заставляет консоль АСМ-кантилевера аномально изгибаться. В этом и заключается действие силы адгезии. Сила адгезии зависит не только от характеристик самого исследуемого образца, но и от величины площади контакта зондового датчика и поверхности образца, а также наличия посторонних тел на ней.

Диссипация – это величина, свидетельствующая о наличии эффекта пластической деформации в образце в результате индентации его зондовым датчиком, либо о наличии у образца вязкоупругих свойств. Количественная величина диссипации определяется интегралом по площади фигуры, созданной расхождением кривых подвода и отвода (рисунок 2.3 б).

Крайне полезной и удобной особенностью данного режима является возможность получения АСМ-карт распределения 8 разных характеристик исследуемого участка поверхности за одно сканирование, поскольку прибор позволяет одновременно регистрировать до восьми каналов. Отдельно следует упомянуть, что для точного количественного определения механических параметров исследуемого образца требуется правильное проведение процедуры калибровки зондового датчика.

Обычно результаты АСМ-сканирования поверхности исследуемого образца в режиме PeakForce QNM представляются в виде тоновых изображений, в которых тон каждой отдельной точки изображения, т.е. пикселя, отражает величину того или иного параметра в точке на поверхности образца таким образом, что более светлый пиксель отражает большее значение параметра и наоборот, как на рисунке 2.4. Это значение определяется по силовым кривым, причем каждый пиксель результирующего изображения может содержать и обычно содержит усредненную информацию от нескольких силовых кривых одновременно.

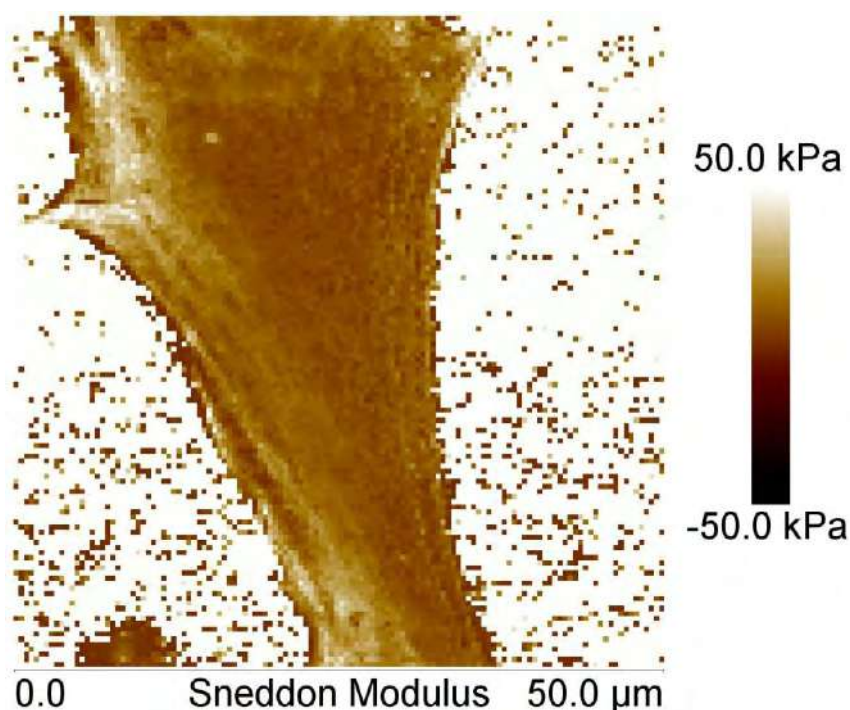


Рисунок 2.4 – Типичная АСМ-карта распределения эффективного модуля Юнга нативного фибробласта (Тимощук К.И., Халисов М.М., Пеннийнен В.А. Неопубликованные результаты).

Режим работы атомно-силового микроскопа PeakForce QNM представляется более эффективным, чем другие режимы, позволяющие исследовать механические параметры объекта изучения, по таким параметрам, как скорость АСМ-сканирования и объем получаемых данных, и, таким образом, превосходящим их в случае, когда стоит задача по сбору и обработке статистических данных о распределении механических параметров по поверхности исследуемого образца. И тем не менее, режим PeakForce QNM и, например, Force Volume, следует рассматривать не как конкурирующие или взаимоисключающие, а как взаимодополняющие, поскольку Force Volume обладает более гибкими настройками параметров индентирования, а также обладает более низкой частотой, что в свою очередь уменьшает гистерезис силовых кривых, получаемых при индентации образцов, обладающих вязкоупругими свойствами.

Достоинства, которыми обладает режим работы атомно-силового микроскопа PeakForce QNM, позволяют считать его перспективным в исследованиях механических параметров нативных клеток. Возможность прямого контроля силы индентации обеспечивает уменьшение инвазивности метода. Быстрый процесс сканирования позволяет за относительно небольшой период времени визуализировать такие параметры поверхности исследуемого образца, как топография и механические параметры, и также уменьшает степень инвазивности воздействия на образец.

Однако, данный режим обладает также и рядом не очень существенных, хотя и очевидных недостатков. Во-первых, электрический сигнал, управляющий Z-сканером, имеет синусоидальную форму, что предполагает неравномерную скорость передвижения зондового датчика при индентации поверхности исследуемого образца. Во-вторых, частота вертикальных осцилляций АСМ-кантилевера является достаточно большой, что в свою очередь затрудняет эксперименты с образцами, находящимися в жидкости, по причине того, что вязкостное сопротивление напрямую зависит от скорости передвижения

зондового датчика и растет вместе с ней. Но несмотря на эти недостатки, режим по-прежнему остается оптимальным для целей и задач данной работы.

#### **2.4 Выбор зондового датчика для измерения эффективного модуля Юнга нативных клеток в режиме PeakForce QNM**

Правильный выбор зондового датчика является одним из самых важных факторов в исследовании нативных клеток, поскольку, во-первых, клетки необходимо подвергать деформации для правильного измерения их механических параметров, в том числе модуля Юнга, а во-вторых, в биологических исследованиях требуется минимальная степень инвазивности воздействия для обеспечения чистоты эксперимента. Жесткость зондового датчика, сопоставимая с жесткостью исследуемого образца, считается наиболее оптимальной [128]. Не менее важным является тот факт, что в режиме работы атомно-силового микроскопа PeakForce QNM кантилевер совершает движения колебательного характера в жидкости с большой скоростью, а жидкость, в свою очередь, оказывает сопротивление движениям зонда, вызывая его изгибы, за счет своей вязкости. В режиме PeakForce QNM реализован способ нивелирования вклада таких изгибов кантилевера с помощью фильтрации силовых кривых, но основная проблема заключается в том, что вклад этого эффект в результаты АСМ-измерений будет тем больше, чем меньше константа жесткости зонда.

Нативные клетки достаточно часто имеют высоту порядка нескольких микрон, что является относительно большой высотой для объекта АСМ-исследований. К тому же, форма нативных клеток чаще всего является сильно выпуклой. Все это может приводить к тому, что консоль АСМ-кантилевера, если АСМ-зонд является недостаточно длинным, может соприкоснуться с нативной клеткой и вносить таким образом дополнительную погрешность в результаты АСМ-измерений механических параметров исследуемого образца.

Вышеупомянутые факты означают, что следует выбирать зондовый датчик с длиной больше средней высоты исследуемых клеток, то есть форма клеток так же является фактором, который следует учитывать при выборе АСМ-кантилевера.

Также, немаловажным фактором является угол между АСМ-зондом и консолью кантилевера. В свою очередь, АСМ-кантилевер обычно устанавливается под небольшим углом к поверхности исследуемого образца. Например, в микроскопах Veeco фирмы Bruker величина этого угла составляет  $12^\circ$  [129]. Выбирать угол наклона оси АСМ-зонда следует таким образом, чтобы он, компенсируя наклон всей АСМ-консоли кантилевера, оставался перпендикулярен к поверхности исследуемого образца.

Форма зондового датчика консоли АСМ-кантилевера и острота его кончика также являются существенными при измерении механических параметров нативных клеток, поскольку максимально достигаемое разрешение АСМ-карт распределения параметров поверхности исследуемого образца напрямую зависит от остроты и формы индентора и величины деформации, причиняемой зондовым датчиком клетке. Чем острее зондовый датчик, тем больше он будет деформировать объект изучения по причине большего создаваемого давления. Поэтому наилучшее разрешение АСМ-сканирования достигается при использовании оптимально острого зондового датчика: не слишком тупого и не слишком острого. Немаловажным также является тот факт, что нативная клетка – это крайне деликатный объект, изначальные параметры которого легко могут быть повреждены при избыточном воздействии.

В рамках данного исследования использовались стандартные коммерчески-доступные зонды SNL-(D), DNP-(C) (Bruker, США) и NITRA-TALL-V-G-(A) (AppNano, США) с жесткостью  $\sim 0,01\text{--}0,1$  Н/м, что полностью удовлетворяет целям и задачам настоящей диссертационной работы.

## **2.5 Пробоподготовка образцов нативных клеток и выбор подложки для их иммобилизации**

Как уже упоминалось в главах 1 и 2, АСМ выгодно отличается от ряда других методов исследования механических параметров нативных клеток тем, что не требует сложной пробоподготовки. Обычно применяется стандартная методика клеточного культивирования, которая широко используется в исследованиях механизмов, протекающих в клетках, а также в испытаниях лекарственных препаратов в различных отраслях науки [130]. Культивированием называется специальное выращивание клеток в условиях установленных температуры и состава атмосферы и в питательной среде.

Необходимым условием исследования нативных клеток методом АСМ ввиду технических особенностей метода является надежная иммобилизация клеток на подложке. Обычно, подложкой является предметное стекло, стеклянная или пластиковая чашка Петри. Разные клетки проявляют разную способность прикрепления к подложке, и иногда для увеличения степени фиксации используются различные дополнительные вещества, например: полилизин, являющийся продуктом бактериального синтеза [87, 102, 131], желатин, являющийся продуктом переработки коллагена [95, 132], сам коллаген [96], ламинин [103, 131, 133], фибронектин [131, 134], запатентованный состав Cell-Tak [135] и другие.

На поверхности плазматической мембраны клеток животных располагаются рецепторы, которые могут взаимодействовать с другими клетками и внеклеточным матриксом – трансмембранные белки интегрины. Интегрины образуют связи между клеткой и подложкой таким образом, что клетка фиксируется необходимым для АСМ-исследования способом.

Тонкий слой выбранного из перечисленных выше вещества наносится на стеклянную или пластиковую подложку заранее, перед осаждением на нее клеток.

В данной работе закрепление клеток в пластиковой чашке Петри осуществлялось с помощью полилизина, если не указано иное.

Заслуживающим отдельного внимания фактором является чистота образца, поскольку присутствующие в жидкости незакрепленные и поэтому свободно плавающие клетки или их отдельные части могут привести к загрязнению зондового датчика и потому внести дополнительный негативный вклад в результаты АСМ-измерений. Также стоит учитывать, что передвижение зондового датчика в процессе сканирования и конвекция, вызванная разницей температур разных слоев жидкости, могут привести к возмущениям жидкости, окружающей клетки, и также спровоцировать произвольные перемещения незафиксированных клеток или их отдельных частей. Такие клетки при попадании между АСМ-кантилевером и источником лазерного луча или фотодетектором могут привести к искажению сигнала отклонения консоли АСМ-кантилевера и нарушению фиксирования силовых кривых.

Не менее важный вклад могут также вносить загрязнители, появляющиеся в процессе приготовления образцов, такие как прикрепленные к подложке остатки соединительной ткани, агрегированные фрагменты мертвых клеток, и тому подобные. Если такие объекты являются достаточно большими, то они могут мешать контакту острия зондового датчика и поверхности исследуемого образца, соприкасаясь с консолью АСМ-кантилевера так, что изгибаться он будет по причине взаимодействия с таким объектом, а не с поверхностью клетки.

Суммируя все вышесказанное, следует отметить, что для получения лучших результатов АСМ-исследования нативных клеток, эти клетки требуется надежно зафиксировать на подложке, которая с этой целью модифицируется веществами, улучшающими адгезивные свойства подложки по отношению к клеткам. Такое вещество следует выбирать, соотносясь с типом исследуемых клеток, поскольку, как было показано в [136], отдельные вещества могут нести негативный вклад в результаты исследования отдельных клеток, например, использование полилизиновой подложки плохо отражается на результатах измерений модуля Юнга нативных эритроцитов.

## 2.6 Измерение эффективного модуля Юнга нативных клеток в PeakForce QNM

В штатном специально предназначенном для управления атомно-силовым микроскопом Bruker BioScope Catalyst программном обеспечении NanoScope 8.19 реализованы две разные модели расчета модуля Юнга, которые были подробно рассмотрены в части 1.2.3 – модели ДМТ и Снеддона. Модель ДМТ, так же как и модель Герца, считает форму зонда сферической (рисунок 2.5 а), в то время как модель Снеддона – конической (рисунок 2.5 б).

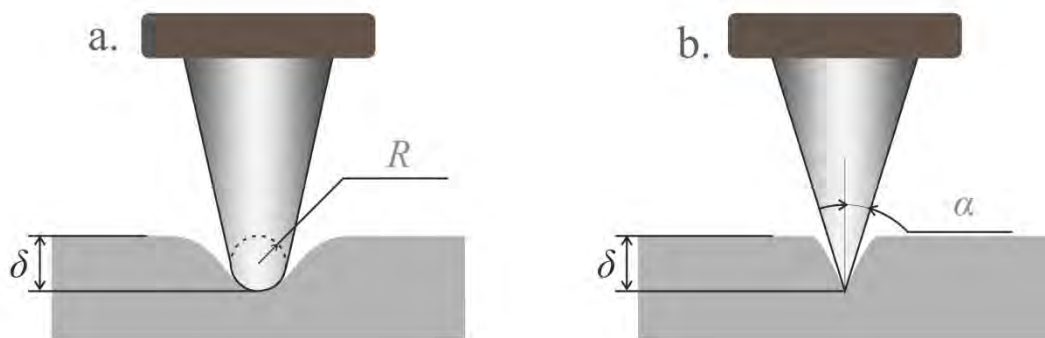


Рисунок 2.5 – Схематичное представление АСМ-зонда в моделях: а) ДМТ и б) Снеддона.

В общем виде модуль Юнга в рамках моделей Снеддона и ДМТ вычисляется по следующей формуле:

$$F = \Gamma E^* \delta^n, \quad (2.2)$$

где  $F$  – это сила взаимодействия между АСМ-зондом и поверхностью исследуемого образца в моделях ДМТ ( $F_{DMT}$ ) и Снеддона ( $F_S$ ) соответственно,  $\Gamma$  – это коэффициент, зависящий от геометрии индентора [88], то есть зондового датчика, и для индентора сферической и конической форм соответственно он равен:



$$\Gamma_{sphere} = \frac{4}{3}\sqrt{R}, \quad (2.3)$$

$$\Gamma_{cone} = \frac{2}{\pi}tg\alpha, \quad (2.4)$$

где  $R$  – это радиус острия,  $\alpha$  –  $1/2$  угла раствора конуса зондового датчика,  $E^*$  – приведенный модуль Юнга системы зонд-образец,  $\delta$  – величина деформации, степень  $n$  зависит от формы индентора:  $n_{sphere} = 3/2$ ,  $n_{cone} = 2$ .

Приведенный модуль Юнга зависит от модуля Юнга зонда ( $E_{tip}$ ) и образца ( $E_{sample}$ ) через следующее выражение [137]:

$$\frac{1}{E^*} \approx \frac{1 - \nu_{tip}^2}{E_{tip}} + \frac{1 - \nu_{sample}^2}{E_{sample}}, \quad (2.5)$$

где  $\nu_{tip}$  и  $\nu_{sample}$  – это коэффициенты Пуассона зонда и образца соответственно. Модуль Юнга АСМ-зондов существенно больше, чем у изучаемых в данном случае образцов – мягких объектов вообще, и нативных клеток в частности ( $E_{tip} \gg E_{sample}$ ). Например, модуль Юнга кремния составляет  $\sim 130$ – $185$  ГПа, а нитрида кремния ( $Si_3N_4$ ), в свою очередь –  $\sim 160$ – $290$  ГПа [62], а нативные клетки характеризуются обычно модулем Юнга  $\sim 1$ – $10$  кПа. Таким образом, получается, что разница значений модуля Юнга зондового датчика и исследуемого образца составляет семь-восемь порядков, что в свою очередь позволяет пренебречь первым слагаемым выражения. С учетом вышесказанного, вычисление модуля Юнга клетки ( $E_{cell}$ ) несколько упрощается:

$$E_{sample} = E_{cell} \approx E^*(1 - \nu_{cell}^2) = \frac{F(1 - \nu_{cell}^2)}{\Gamma\delta^n}, \quad (2.6)$$

где  $\nu_{cell}$  – коэффициент Пуассона клетки.

Как уже указывалось ранее, модель ДМТ, в отличие от теории Герца и модели Снеддона, допускает действие силы адгезии  $F_{adh}$  между соприкасающимися индентором и поверхностью образца, что и наблюдается в реальном случае контакта АСМ-зонда с нативной клеткой:

$$E_{cell} = \frac{3 F_{DMT} - F_{adh}}{4 \sqrt{R} \delta^{\frac{3}{2}}} (1 - \nu_{cell}^2) \quad (2.7)$$

Коэффициент Пуассона является безразмерной величиной, которая характеризует степень сжимаемости тела. Нативные клетки в большинстве своем обычно считаются абсолютно несжимаемыми с коэффициентом Пуассона равным 0,5 [138]. Поэтому справедливым становится выражение:

$$E_{cell} = \frac{9 F_{DMT} - F_{adh}}{16 \sqrt{R} \delta^{\frac{3}{2}}} \quad (2.8)$$

А для модели Снеддона:

$$E_{cell} = \frac{3\pi F_S}{8 \operatorname{tg} \alpha * \delta^2} \quad (2.9)$$

Однако, вычисление модуля Юнга в программном пакете NanoScope 8.19 в режиме PeakForce QNM практически осуществляется по линейризованным силовым кривым. Так, для сферической и конической формы инденторов соответственно:

$$(F_{DMT} - F_{adh})^{\frac{2}{3}} = \left( \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \sqrt{R} \right)^{\frac{2}{3}} * \delta \quad (2.10)$$

$$\sqrt{F_S} = \sqrt{\frac{2}{\pi} \frac{E}{1 - \nu^2} \operatorname{tg} \alpha * \delta}, \quad (2.11)$$

в которых  $F_{DMT}$ ,  $F_{adh}$ ,  $F_S$  определяются через силовые кривые, регистрируемые в каждой точке измерения.

В модели Снеддона модуль Юнга вычисляется по контактной части силовой кривой подвода, а в модели ДМТ, наоборот – по кривой отвода. При работе атомно-силового микроскопа в режиме PeakForce QNM, при использовании острых АСМ-зондов более точно форму зонда описывает форма конуса, то есть в

рамках данной работы более целесообразным представляется использование модели Снеддона.

### 2.6.1 Калибровка АСМ-кантилевера

В режиме работы атомно-силового микроскопа PeakForce QNM процедура калибровки АСМ-кантилевера является необходимым этапом работы, если ее целью является изучение количественных характеристик механических параметров образца. Внимательно изучение формул для вычисления модуля Юнга в моделях ДМТ и Снеддона дает понять, что для его правильного измерения нужно знать радиус сферы и половину угла раствора конуса соответственно. Обычно, производители коммерчески доступных АСМ-кантилеверов указывают данные параметры на своем сайте или даже непосредственно на упаковке с кантилеверами.

Точный контроль сил между поверхностью исследуемого образца и зондовым датчиком также крайне важен для точного и правильного определения механических параметров. АСМ-кантилевер можно представить в виде пружины, и тогда, в соответствии с законом Гука, сила, действующая на зондовый датчик при контакте с поверхностью образца, будет:

$$F = k_c * x, \quad (2.12)$$

где  $k_c$  – это коэффициент жесткости АСМ-кантилевера, а  $x$  – это величина деформации пружины, пропорциональная величине изгиба консоли АСМ-кантилевера. Коэффициент жесткость АСМ-кантилевера обычно также указывается производителем, но из-за несовершенства технологического процесса производства АСМ-кантилеверов, константу жесткости каждого зондового датчика рекомендуется калибровать отдельно. В программном обеспечении

Bruker BioScope Catalyst для этих целей предусмотрена возможность калибровки методом тепловых шумов [129].

Перед калибровкой коэффициента жесткости АСМ-кантилевера методом тепловых шумов необходимо предварительно установить взаимосвязь между перемещением Z-пьезосканера и величиной отклонения АСМ-кантилевера, и таким образом откалибровать чувствительность фотодетектора. Такая калибровка обычно производится на поверхности образца, величина деформации которого вследствие индентации АСМ-зондом настолько мала, что ей можно пренебречь. При этом также допускается предположение, что зондовый датчик также не деформируется, а вся энергия взаимодействия уходит на изгиб консоли АСМ-кантилевера.

Величину перемещения Z-пьезосканера становится возможно определить при заданном управляющем напряжении с помощью емкостного датчика перемещений. В свою очередь изгиб консоли АСМ-кантилевера можно определить зная величину изменения длины сканера при контакте зондового датчика с поверхностью образца. В результате будет получен калибровочный коэффициент, измеряемый в нм/В, который будет отражать изменение величины электрического сигнала на фотодетекторе в результате изгиба АСМ-зонда, вызванного приближением Z-пьезосканера.

В рамках исследований, описанных в данной диссертационной работе, калибровка чувствительности отклонения фотодетектора проводилась с использованием калибровочного сапфирового образца SAPPHIRE-12M из стандартного калибровочного набора PFQNM-SMPKIT-12M, предназначенного специально для режима PeakForce QNM. Калибровка коэффициента жесткости зонда производилась в воздушной среде, если зонд обладал низкой жесткостью и резонансной частотой  $f_0 < 32$  кГц, или в жидкости в чашке Петри, если зонд обладал высокой жесткостью и резонансной частотой  $f_0 > 32$  кГц [139]. Использованные значения углов раствора конуса зондовых датчиков соответствовали заявленным производителями.

Отдельного упоминания заслуживает тот факт, что недостаточная воспроизводимость силовых кривых даже на свободной от посторонних тел поверхности чашки Петри, которая может быть связана с наличием адгезивных веществ или конвекцией жидкости по причине подогрева дна чашки Петри, сильно затрудняет процесс калибровки чувствительности отклонения фотодетектора. Поэтому калибровка чувствительности отклонения фотодетектора и коэффициента жесткости АСМ-кантилевера в жидкости использовалась только в случае применения АСМ-кантилеверов с большим паспортным коэффициентом жесткости, калибровка которых в воздушной среде могла давать не достаточно точные результаты [139].

В случае изгиба АСМ-кантилевера, вызванного силовым контактным взаимодействием между зондовым датчиком и поверхностью твердого калибровочного образца, приложение такой же силы к мягкому образцу повлечет за собой не только такой же изгиб АСМ-кантилевера, но и деформацию самого образца. По этой причине увеличение длины Z-сканера на более податливом образце будет больше, чем на твердом, при условии равной нагрузки. Таким образом, угол наклона контактной части силовой кривой на мягком образце (зеленая кривая на рисунке 2.6) будет меньше, чем на твердом калибровочном образце (красная кривая на рисунке 2.6). Величину деформации, или глубину индентации, мягкого податливого образца (рисунок 2.6) можно вычислить, используя следующую формулу:

$$\delta = \Delta Z - d, \quad (2.13)$$

где  $\Delta Z$  и  $d$  – это величины увеличения длины Z-сканера на мягком податливом образце и на твердом калибровочном образце соответственно (рисунок 2.6). Модуль Юнга образца, таким образом, можно вычислить, если известна величина деформации образца при заданной силе.

Как уже указывалось ранее, режим работы атомно-силового микроскопа PeakForce QNM позволяет получать АСМ-карты распределения не только модуля Юнга, но и максимальной локальной величины деформации поверхности

исследуемого образца. На практике канал деформации отражает заниженные значения величины деформации, поскольку при анализе силовой кривой учитывается только верхняя часть отрезка, соответствующего контакту зондового датчика с поверхностью исследуемого образца, составляющая ~15–100% от пиковой силы, однако, данный уровень отсечения части отрезка можно регулировать. В свою очередь, нижний отрезок силовой кривой, соответствующий контакту зондового датчика с поверхностью исследуемого образца, отсекается с целью снижения степени влияния шума базовой линии на измерение величины деформации.

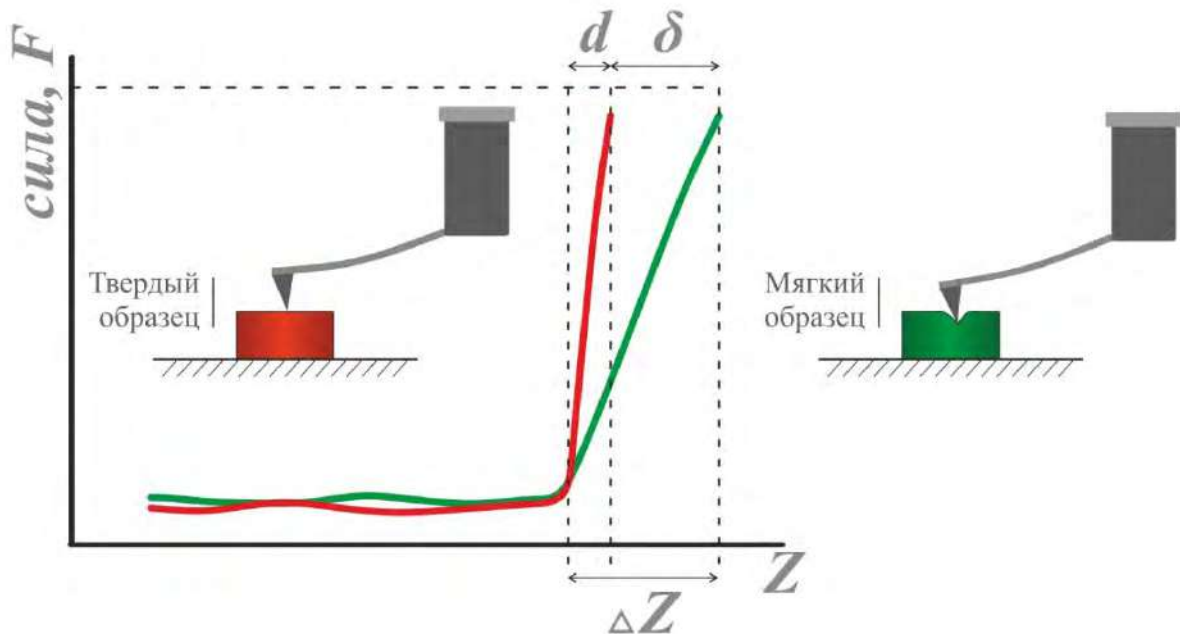


Рисунок 2.6 – Определение величины деформации по силовой кривой АСМ. Красная кривая соответствует получаемой на твердом калибровочном образце силовой кривой, а зеленая – на мягком.

На рисунке 2.6, представленном выше, схематично изображено отсутствие деформации твердого калибровочного образца при контакте с зондовым датчиком, равно как и наличие деформации у мягкого податливого образца при одинаковой величине силы индентации.

## 2.7 Выбор параметров сканирования и особенности экспериментов по изучению клеток в режиме PeakForce QNM

С точки зрения АСМ, нативная клетка является мягким объектом, поскольку контактная жесткость системы АСМ-зонд–образец в как правило гораздо меньше коэффициента жесткости консоли АСМ-кантилевера. Также, с точки зрения АСМ, мягкие объекты, и в том числе нативные клетки, можно условно разделить на "липкие" и "скользкие" на основании характера контакта системы АСМ-зонд–образец: если АСМ-зонд скользит по поверхности образца, а сила трения в контакте АСМ-зонд–образец равна нулю или не многим больше нуля, то образец является скользким по отношению к материалу АСМ-зонда; если же АСМ-зонд залипает на поверхности образца, а сила трения в контакте АСМ-зонд–образец много больше нуля, то образец является липким по отношению к материалу АСМ-зонда.

Важно понимать, что, поскольку мягкий объект классифицируется как "липкий" или "скользкий" исключительно по характеру взаимодействия АСМ-зонда с таким объектом, т.е. липкому контакту или скользкому контакту соответственно, то в рамках текста данной работы термин "липкий объект" означает, что характер контакта АСМ-зонда с таким объектом является липким (в таком контакте зонд как бы зажат образцом), а термин "скользкий объект" – что характер контакта АСМ-зонда с таким объектом является скользким, а сила трения в таком контакте ничтожно мала.

Как уже упоминалось ранее, перед началом работы атомно-силового микроскопа требуется провести калибровку зондового датчика и юстировку оптической системы детектирования изгиба консоли АСМ-кантилевера. Во всех экспериментах, проведенных в рамках данного диссертационного исследования, и описанных в данной работе, калибровка проводилась на воздухе при комнатной температуре близкой к 21°C или в жидкости при температуре 37°C, а юстировка

оптической системы детектирования в дистиллированной воде также при комнатной температуре, если не описано иное.

Образец, представляющий из себя пластиковую чашку Петри, заполненную последовательно снизу-вверх полилизиновой подложкой, нативными клетками и физиологическим раствором, помещался на термостойке атомно-силового микроскопа Bruker Bioscope Catalyst. Вследствие наличия слоя золота на тыльной стороне используемых АСМ-кантилеверов, изменение температуры окружающей среды в результате переноса кантилевера из воздушной среды в жидкость приводит к изгибу кантилевера, сопровождающемуся дрейфом сигнала отклонения [62]. Затем в течение ~15–20 минут устанавливался температурный баланс, сигнал отклонения переставал дрейфовать и устанавливался в нулевое значение с помощью регулирования положения фотодетектора.

Затем на поверхности образца выбирался участок, свободный от клеток и других тел, и чувствительность отклонения корректировалась на подложке. Затем, используя оптический микроскоп, производился поиск и выбор нативных клеток, наиболее подходящих для АСМ-сканирования. Обычно для исследования выбирались надежно зафиксированные клетки с формой, характерной для своего типа, без каких-либо загрязнений. Также перед началом АСМ-сканирования делалась оптическая фотография выбранной клетки.

При АСМ-сканировании нативных клеток частота строчной развертки выбиралась минимально возможной для режима PeakForce QNM и частота индентирования 0,1 Гц и 0,25 кГц соответственно.

Разрешение получаемых АСМ-изображений, размер АСМ-кадра, амплитуда вертикального движения кантилевера, пиковая сила индентации и другие настраиваемые параметры АСМ-сканирования подбирались каждый раз индивидуально для каждого типа объектов, исходя из их свойств и требований эксперимента, и описаны отдельно в каждой последующей главе. Время сканирования клеток в зависимости от разрешения и размера АСМ-кадра в среднем составляло около пятнадцати минут.



Типичные силы АСМ-зондирования различных типов клеток в режиме PeakForce QNM составляли от 1 до 3 нН в зависимости от объекта эксперимента и его целей и задач.

Во время АСМ-сканирования состояние исследуемой клетки контролировалось через оптический микроскоп. Если клетка откреплялась от подложки или повреждалась зондовым датчиком, то сканирование останавливалось и проверялось отсутствие посторонних тел на АСМ-кантилере. В случае их присутствия, зонд прополаскивался в дистиллированной воде и обрабатывался ультрафиолетовым излучением в течение 10 минут. Если обработка не помогала, то процедура повторялась с начала. Если повторная обработка не помогала, то АСМ-кантилер менялся на новый такой же марки и модели. Регистрируемые прибором силовые кривые также непрерывно отслеживались на случай возникновения сбоя, который мог бы повлечь за собой неправильное измерение механических параметров образца или даже его разрушение.

## **2.8 Общая информация об обработке данных атомно-силовой микроскопии**

Для последующих обработки и анализа результатов, полученных при АСМ-сканировании нативных клеток, использовалось специально предназначенное программное обеспечение NanoScope Analysis 1.50 и Gwyddion 2.44 [140]. С помощью этих программ производилась обработка и подготовка для публикации АСМ-изображений, математические операции с АСМ-картами распределения различных параметров исследуемого образца, экспортирование полученных данных в формате ASCII для дальнейшего статистического анализа в другом программном обеспечении. Обработка численных данных осуществлялась посредством Microsoft Office Excel 2007 и OriginPro 2015.

### ГЛАВА 3. ЭФФЕКТ ДЛИНЫ ЗОНДА В АСМ-ИЗМЕРЕНИЯХ МЕХАНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НАТИВНЫХ НЕЙРОНОВ

Данная глава подробно описывает предложенную автором работы методику обеспечения единства АСМ-измерений механических параметров мягких объектов через учет параметра  $\lambda$ , отражающего отношение длины АСМ-зонда  $l_T$  к длине консоли АСМ-кантилевера  $l_C$ , позволившая установить, что, во-первых, измеряемый в АСМ-режиме PeakForce QNM эффективный модуль Юнга  $E$  нативных клеток зависит от параметра  $\lambda$ ; во-вторых, у сенсорных нейронов  $E$  падает с ростом  $\lambda$ , что указывает на залипание зонда на нейроне при измерении силовых кривых; в-третьих, наличие или отсутствие зависимости  $E$  от  $\lambda$  позволяет сортировать клетки как липкие или скользкие по отношению к материалу зонда соответственно.

#### 3.1 Особенности экспериментов по зондированию клеток

В данной серии экспериментов объектом исследования выступали интактные нативные сенсорные нейроны десяти-двенадцатидневных эмбрионов куриц – клетки, обладающие способностью к выработке и проведению нервных импульсов [141].

Из областей позвоночника L5-S1 извлекались ганглии спинного мозга, которые затем были пипетированы в растворе Хенкса для получения суспензии клеток. Культивирование нейронов осуществлялось в питательной среде следующего состава: раствор Хенкса — 45%, среда Игла — 40%, фетальная бычья сыворотка — 15%, инсулин — 0,5 ед/мл, глюкоза — 0,6%, глутамин — 2 мМ, гентамицин — 100 ед/мл, фактор роста нервов 7S — 10 нг/мл (Sigma, США). Полученная клеточная суспензия смешивалась с питательной средой в

пластиковой чашке Петри для получения желаемой плотности клеток. Клетки, не являвшиеся нейрональными, удалялись с помощью осаждения их на пластиковой поверхности 90-миллиметровой чашки Петри в течение 25 минут при температуре равной 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония), в то время как оставшиеся клетки (в основном нейроны) были культивированы на поверхности 40-миллиметровых чашек Петри, покрытых поли-L-лизиновой подложкой, в течение трех суток при температуре равной 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>.

АСМ-эксперименты также проводились в физиологически-адекватных условиях: образец находился в чашке Петри, заполненной физиологическим раствором, при физиологически-адекватной температуре 37°C, которая поддерживалась с помощью термоконтроллера Model 335 (Lake Shore Cryotronics, США). Были использованы три различных типа кантилеверов: SNL-(D) и DNP-(C) (Bruker, США), NITRA-TALL-V-G-(A) (AppNano, США) со следующими паспортными параметрами: коэффициент жесткости консоли 0,03–0,012 Н/м (SNL-(D)), 0,12–0,48 Н/м (DNP-(C)), 0,08–0,32 Н/м (NITRA-TALL-V-G-(A)); длина консоли 200–210 мкм (SNL-(D)), 115–125 мкм (DNP-(C)), 95–115 мкм (NITRA-TALL-V-G-(A)); длина зонда 2,5–8,0 мкм (SNL-(D)), 2,5–8,0 мкм (DNP-(C)), 14–16 мкм (NITRA-TALL-V-G-(A)); радиус скругления острия зонда 2–12 нм (SNL-(D)), 200 нм (DNP-(C)), ~30 нм (NITRA-TALL-V-G-(A)). Основой зондов SNL-(D) является кремний, зондов DNP-(C) и NITRA-TALL-V-G-(A) – нитрид кремния.

Измерения проводились в АСМ-режиме PeakForce QNM, подробно описанном в Главе 2 и являющимся оптимальным для извлечения интересующего нас параметра – модуля Юнга, из биологических объектов. Сканирование велось со следующими подобранными оптимальными параметрами: частота строчной развертки равнялась 0,10–0,15 Гц, пиковая сила – 1 нН, частота и амплитуда вертикального зондирования равнялись 0,25 кГц и 1 мкм соответственно. Силовые кривые анализировались в рамках модели Снеддона [16]. Значение  $E$ , оптимизирующее в соответствии с моделью Снеддона подгонку кривой к эксперименту, соответствует кажущемуся модулю Юнга [142]. Для последующего

анализа выбирались участки АСМ-карт, соответствующие сомнам клеток – центральным областям, из которых растут нейриты. Из этих областей изображения затем извлекался массив данных, который конвертировался в частотное распределение параметра модуля Юнга с шагом 5 кПа. Результаты, полученные с помощью разных кантилеверов, сравнивались по средним распределениям кажущегося модуля Юнга по выборкам клеток.

### **3.2 Результаты исследования нативных нейронов кантилеверами с разной длиной зонда**

В Таблице 3.1 приводится сравнение различных характеристик использованных АСМ-зондов и средний измеренный модуль Юнга клеток, полученный соответствующими зондами. Среднее значение жесткости кантилевера, указанное в скобках, было получено при измерении методом тепловых шумов. Средняя высота зонда, указанная в скобках, измерялась в оптическом микроскопе через объектив с  $NA = 0,9$ . Остальные данные в таблице являются паспортными, заявленными фирмами-производителями кантилеверов, и в среднем соответствуют реальным [143–145].

Таблица 3.1 – Сравнение характеристик использованных АСМ-зондов и средний измеренный модуль Юнга нативных нейронов

Модель зонда	SNL-(D)	DNP-(C)	Nitra-Tall-V-G-(A)
Коэффициент жесткости консоли, Н/м	0,03–0,12 (0,07)	0,12–0,48 (0,25)	0,08–0,32 (0,21)
Длина консоли, $l_C$ , мкм	200–210	115–125	95–115
Длина зонда, $l_T$ , мкм	2,5–8,0 (4,0)	2,5–8,0 (5,0)	14–16 (15)
Отношение длины зонда к длине консоли, $\lambda = l_T/l_C$	0,026	0,044	0,142
Радиус скругления острия зонда, нм	2–12	20	< 30
Материал зонда	Si	Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>
Эффективный модуль Юнга, кПа	115	22	11

Данная таблица наглядно демонстрирует отсутствие корреляции результатов измерений модуля Юнга нативных нейронов от таких параметров, как коэффициент жесткости консоли, длина консоли, длина зонда или материал зонда. Повышение значения модуля Юнга у зондов с меньшим радиусом скругления является незначительным, так как индентирование проводилось на глубину во много раз больше самого радиуса.

Однако, если ввести параметр  $\lambda$ , являющий собой отношение длины зонда к длине консоли, то сразу появляется очевидная зависимость: чем больше становится  $\lambda$ , тем меньше становится эффективный модуль Юнга.

Данные исследования нативных сенсорных нейронов при применении АСМ-кантилеверов трех типов анализируются на рисунке 3.1. Видно, что значения измеренных модулей Юнга сильно разнятся. Положения пиков

распределения параметра измеренного модуля Юнга для кантилеверов Bruker SNL-(D), DNP-(C) и AppNano NITRA-TALL-V-G-(A) приходится на 32, 12 и 7 кПа соответственно; средние значения  $115 \pm 90$ ,  $22 \pm 10$  и  $11 \pm 7$  кПа соответственно (см. таблицу 3.1). Данные рисунка 3.1 достоверно демонстрируют несовпадение средних значений измеренного модуля Юнга, полученных с помощью кантилеверов трех типов. Результаты расчета  $U$ -критерия Манна–Уитни подтверждают статистическую значимость наблюдаемых различий, поскольку у любой из трех возможных пар статистическая разница  $p < 0.01$ .

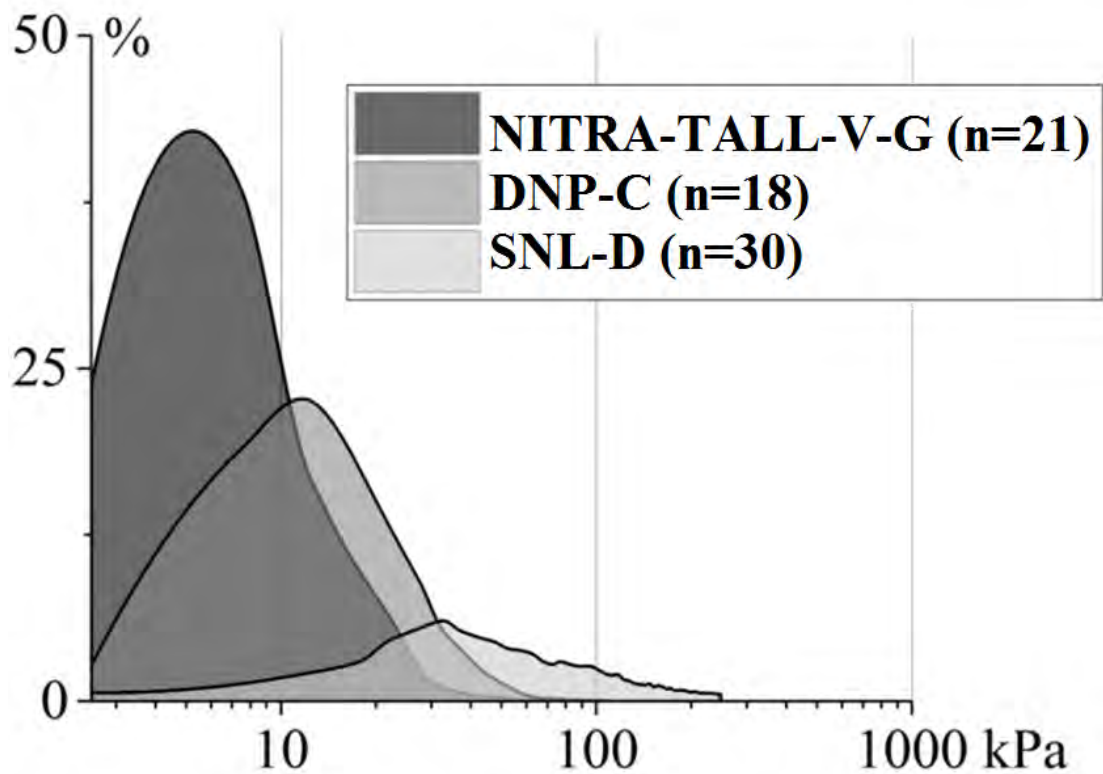


Рисунок 3.1 – Логарифмический график распределения средних значений измеренного модуля Юнга по сомат клетки нативных нейронов при использовании кантилеверов NITRA-TALL-V-G-(A), DNP-(C) и SNL-(D). В каждом случае исследовано  $n = 21$ , 18 и 30 интактных нативных нейронов соответственно.

Следует отметить, что график, изображенный на рисунке 3.1, уже был опубликован в [84], но тогда данный результат получил иную интерпретацию.

### 3.3 Обсуждение. Выводы

Природу наблюдаемого эффекта наглядно иллюстрируют рисунок 3.2 и формула 3.1.

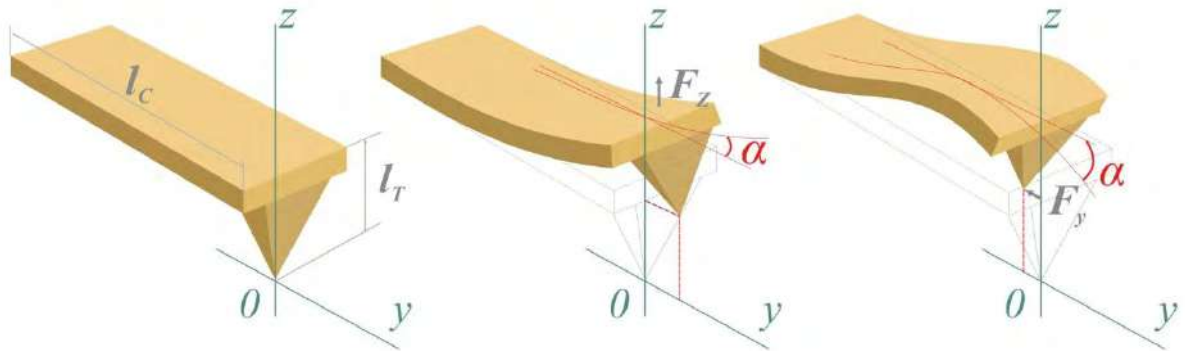


Рисунок 3.2 – Распределение нормальных и латеральных сил, воздействующих на АСМ-кантилевер при его изгибе.

$$\alpha = \frac{3}{2l_c k_c} (F_z + 2\lambda F_y) = \frac{3F_z}{2l_c k_c} (1 - 2\mu\lambda), \quad (3.1)$$

где  $\alpha$  – угол отклонения конца консоли кантилевера;  $l_c$  – длина консоли кантилевера;  $k_c$  – коэффициент жесткости консоли кантилевера;  $F_y$  и  $F_z$  – силы действующие в направлении соответствующих координатных осей, которые ранее в данной работе также определялись как вклад латеральной и нормальной силы соответственно;  $\lambda$  – отношение высоты зонда  $l_T$  к  $l_c$ ;  $\mu$  – коэффициент трения. Данная формула была выведена из формул (3.2) и (3.3), представленных в [61].

$$\alpha_z = \frac{l_c^2}{2EJ_z} F_z = \frac{3}{2l_c} c F_z \quad (3.2)$$

$$\alpha_y = \frac{l_T l_c}{EJ_z} F_y = \frac{3l_T}{l_c^2} c F_y, \quad (3.3)$$

где  $c$  – это коэффициент обратной жесткости, равный  $1/k_C$ ,  $l_T$  – длина зондового датчика,  $E$  – модуль Юнга консоли,  $J_Z$  – осевой момент инерции.

Для начала, чтобы вывести формулу, учитывающую угол отклонения консоли АСМ-кантилевера по двум координатам, нужно:

$$\alpha = \alpha_Y + \alpha_Z \quad (3.4)$$

Проще всего это сделать, используя только правые части выражений (3.2) и (3.3), т.е.:

$$\alpha_Z = \frac{3}{2l_C} c F_Z \quad (3.5)$$

$$\alpha_Y = \frac{3l_T}{l_C^2} c F_Y \quad (3.6)$$

В результате будет получена формула (3.7):

$$\alpha = \frac{3}{2l_C} c (F_Z + 2\lambda F_Y) \quad (3.7)$$

Далее используем формулы (3.8), (3.9) и (3.10) для упрощения формы записи.

$$k_C = \frac{1}{c} \quad (3.8)$$

$$\lambda = \frac{l_T}{l_C} \quad (3.9)$$

$$F_Y = -\mu F_Z \quad (3.10)$$

И получим формулу (3.11), которую, свою очередь, вполне легко можно преобразовать в искомую формулу (3.1).

$$\alpha = \frac{3}{2l_C k_C} (F_Z - 2\mu\lambda F_Z) \quad (3.11)$$



Другими словами, наблюдаемый эффект зависимости величины измеренного модуля Юнга от отношения длины зонда к длине консоли кантилевера ( $\lambda$ ) объясняется тем, что если зонд не скользит по поверхности образца ( $\mu > 0$ ), то  $\alpha$  падает с ростом  $\lambda$ , как видно из формулы 3.1. Как следствие, падает контактная жесткость и кажущийся модуль Юнга образца. Это и наблюдается в экспериментах в соответствии с Таблицей 3.1.

Также на основе данных формул можно сделать следующий вывод: вклад латеральной силы (трения) становится заметным, когда:

$$F_Z \sim \lambda F_Y \quad (3.12)$$

или, другими словами, преобладание вклада нормальных сил над латеральными в контакте АСМ-зонд–образец выражается как

$$\frac{F_Z}{F_Y} \gg \lambda \quad (3.13)$$

Таким образом, на основании результатов вышеописанных экспериментов можно сделать следующие выводы: во-первых, измеряемый в АСМ-режиме PeakForce QNM эффективный модуль Юнга  $E$  нативных клеток зависит от параметра  $\lambda$  – отношения высоты зонда к длине консоли кантилевера; во-вторых, у сенсорных нейронов  $E$  падает с ростом  $\lambda$ , что указывает на залипание зонда на нейроне при измерении силовых кривых; в-третьих, наличие или отсутствие зависимости  $E$  от  $\lambda$  служит критерием сортировки клеток на липкие или скользкие по отношению к материалу зонда соответственно.

В свете вышесказанного, детектируемое кажущееся упрочнение нативных нейронов как реакция на возмущающие факторы, такие как: время, температура, сила индентирования, различные лекарства, различные патологии и т. д. можно интерпретировать как существенное уменьшение трения в контакте системы АСМ-зонд–образец.

Отдельного внимания заслуживает следующий вывод: для измерения методом АСМ механических параметров объекта, характер взаимодействия зонда

с которым не известен, или известно, что он является заземленным (липким), следует использовать АСМ-кантилеверы с минимально-возможным  $\lambda$ , поскольку в этом случае минимизируется вклад латеральных сил, следовательно, повышается адекватность измерений.

Из этого также следует, что в серии экспериментов, описанных в данной главе, с результатами, представленными на рисунке 3.1, эффективный модуль Юнга, наиболее близкий к реальному, измеряется при использовании зондов SNL-D, поскольку они обладают наименьшим  $\lambda$ .

## **ГЛАВА 4. Методика количественных АСМ-измерений механических параметров мягких объектов на примере исследования нативных фибробластов**

В данной главе описывается предложенная автором работы методика количественных АСМ-измерений механических параметров мягких объектов на примере исследования нативных фибробластов. Подробно описывается процесс пробоподготовки нативных фибробластов для АСМ-исследования и рассматривается вклад различных факторов в результаты АСМ-измерений их механических параметров. В результате нескольких серий экспериментов последовательно устанавливается, что, во-первых, в среднем измеренный модуль Юнга нативных фибробластов не зависит или зависит не существенно от времени АСМ-сканирования, и не изменяется или изменяется несущественно при повторном сканировании; во-вторых, в среднем измеренный модуль Юнга нативных фибробластов зависит от величины пиковой силы АСМ-индентирования; в-третьих, контактная жесткость системы АСМ-зонд–образец не зависит от остроты индентора и формы зонда; в-четвертых, в среднем измеренная деформация нативных фибробластов не зависит от положения фокуса лазерного луча на консоли АСМ-кантилевера.

### **4.1 Пробоподготовка нативных фибробластов для АСМ-исследования**

В данной и последующих сериях экспериментов объектами изучения выступали нативные фибробласты – наиболее распространенные и функционально ведущие клетки рыхлой волокнистой соединительной ткани [141].

Фибробласты сердечной мышцы десяти-двенадцатидневных эмбрионов куриц изолировались путем ферментативной обработки в 0,125-процентном

растворе трипсина ("Sigma", США) с последующим механическим выделением клеток при температуре 4°C. Клеточная суспензия помещалась в питательную среду следующего состава: 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла и 10% фетальной сыворотки коровы с добавлением инсулина (0,5 ед/мл), 0,6% глюкозы, глутамина (2 мМ) и гентамицина (100 ед/мл). Изолированные фибробласты культивировали в течение пяти суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе ("Sanyo", Япония) в обработанных коллагеном пластиковых чашках Петри, при 36,5°C и 5% содержании CO<sub>2</sub>.

Исследования велись при температуре 37°C на атомно-силовом микроскопе Bruker BioScope Catalyst на базе инвертированного оптического микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z1. Для АСМ-индентирования и картирования механических параметров клеток использовался режим PeakForce QNM и кантилеверы NT-MDT SI CSG10, коэффициент жесткости которых калибровался методом тепловых шумов.

## **4.2 Проявление вкладов различных экспериментальных факторов в значение эффективного модуля Юнга нативных фибробластов**

### **4.2.1 Временной фактор**

Для выявления вклада временного фактора в значения эффективного модуля Юнга нативных фибробластов была проведена следующая серия экспериментов: один и тот же интактный нативный фибробласт подвергался АСМ-сканированию в режиме PeakForce QNM два раза подряд с сохранением одинаковых параметров сканирования: с частотой строчной развертки 0,10-0,15 Гц, пиковой силой 3 нН, частотой и амплитудой вертикального зондирования 0,25

кГц и 1 мкм соответственно; в том числе с использованием одного и того же АСМ-кантилевера Bruker NP-C.

На рисунке 4.1 представлен пример результата эксперимента: АСМ-карты распределения модуля Юнга двух последовательных сканирований одной и той же клетки.

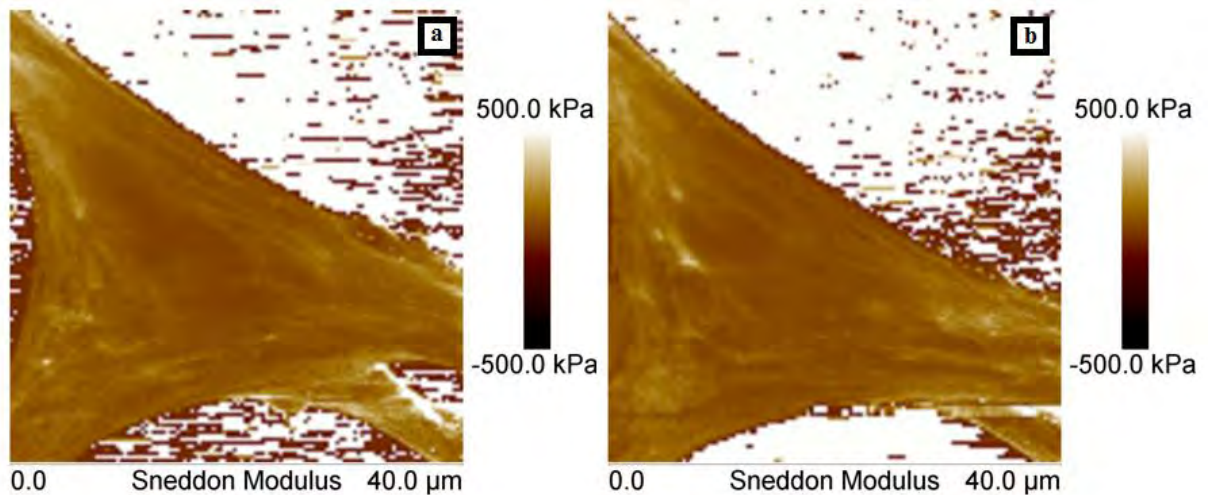


Рисунок 4.1 – АСМ-карты распределения модуля Юнга интактного нативного фибробласта, полученные в результате: а) первого, б) второго сканирования.

Как видно из рисунка 4.1, АСМ-карты распределения модуля Юнга двух последовательных сканирований не сильно отличаются друг от друга. В случае конкретного интактного нативного фибробласта, АСМ-карты распределения модуля Юнга которого представлены на рисунке 4.1, среднее значение эффективного модуля Юнга по результатам первого сканирования составило 93,1 кПа, второго – 92,8 кПа.

Всего было исследовано 12 интактных нативных фибробластов, по два раза каждый. В таблице 4.1 представлены результаты сравнения отношений эффективного модуля Юнга первого результата сканирования ко второму  $E_1/E_2$ .

Таблица 4.1 – Результаты сравнения отношений эффективного модуля Юнга первого результата сканирования ко второму

№ эксперимента	$E_1/E_2$
1	1,4
2	1,2
3	1,1
4	1,0
5	0,7
6	0,9
7	0,7
8	1,0
9	1,2
10	0,7
11	0,9
12	1,0
Среднее значение	1,0

Вычисление среднего арифметического значения отношений эффективного модуля Юнга первого результата сканирования ко второму по всем экспериментам демонстрирует, что в среднем эффективный модуль Юнга первого результата сканирования относится к эффективному модулю Юнга второго результата сканирования, как один к одному, или, другими словами, примерно равен.

Анализ результатов данной серии экспериментов позволяет сделать вывод о том, что в среднем эффективный модуль Юнга интактных нативных фибробластов не зависит или зависит не существенно от времени АСМ-сканирования, и не изменяется или изменяется не существенно при повторном сканировании.

#### 4.2.2 Сила взаимодействия

Для выявления вклада силы взаимодействия зондового датчика с образцом в значение эффективного модуля Юнга нативных фибробластов была проведена следующая серия экспериментов: один и тот же интактный нативный фибробласт подвергался АСМ-сканированию в режиме PeakForce QNM два раза подряд с сохранением одинаковых параметров сканирования, за исключением пиковой силы: с частотой строчной развертки 0,10-0,15 Гц, частотой и амплитудой вертикального зондирования 0,25 кГц и 1 мкм соответственно; в том числе с использованием одного и того же АСМ-кантилевера Bruker NP-C. Жесткость кантилеверов калибровалась методом тепловых шумов. Значения пиковой силы составили 1 нН для первого сканирования и 5 нН для второго сканирования соответственно.

Всего было исследовано 29 интактных нативных фибробластов, по два раза каждый. В таблице 4.2 представлены отношения эффективного модуля Юнга по модели Снеддона  $(E_2/E_1)_S$ , измеренные в двух рассматриваемых случаях.

Таблица 4.2 – Результаты сравнения отношений эффективного модуля Юнга второго результата сканирования к первому.

№ эксперимента	$(E_2/E_1)_S$	№ эксперимента	$(E_2/E_1)_S$
1	0,57	16	0,56
2	0,73	17	0,55
3	0,57	18	0,80
4	0,53	19	0,43
5	0,70	20	0,77
6	0,89	21	0,59
7	0,67	22	0,76
8	0,56	23	0,63
9	0,56	24	0,70
10	0,45	25	0,52
11	0,40	26	0,56
12	0,54	27	0,86
13	0,78	28	0,68
14	0,43	29	0,76
15	0,43	Среднее значение	0,62

Вычисление среднего арифметического значения отношений эффективного модуля Юнга второго результата сканирования к первому по всем экспериментам демонстрирует, что в среднем эффективный модуль Юнга второго результата сканирования относится к эффективному модулю Юнга первого результата сканирования, как 0,62. С первого взгляда, этот результат противоречит моделям Снеддон или Герца, которые представляют клетку (в данном случае фибробласт) как гомогенный объект. Как уже указывалось в главе 2 настоящей работы, одно из различий моделей Снеддона и Герца (формула 2.2) – это степень  $n$ , в которую возводится  $\delta$ : в модели Снеддона  $n=2$ , в модели Герца  $n=3/2$ . Поэтому исходя из



полученного среднего отношения модулей Юнга и отношения пиковых сил, можно определить среднее отношение деформаций как

$$\langle \delta_2 / \delta_1 \rangle = \sqrt[2]{5/0,62} \cong 2,84 \quad (4.1)$$

Используя полученный результат, можно пересчитать полученные данные в соответствии модели Герца. И, в таком случае, отношение  $(E_2/E_1)_H$  оказывается близким к единице. В частности,  $2,84^{3/2} \cong 4,79 \approx 5$ , что совпадает с отношением пиковых сил индентации.

В работе [146], посвященной исследованию нативных фибробластов коническими и сферическими зондами, было показано, что фибробласты в процессе индентации не соответствуют ни модели однородного объекта Герца, ни модели Снеддона. Поэтому для фибробласта предлагается модель неоднородного объекта с оболочкой более жесткой, чем внутренности клетки. Результаты, представленные в таблице 4.2 также могут быть качественно объяснены таким особым устройством фибробласта, см. также следующий раздел.

Анализ результатов данной серии экспериментов позволяет сделать вывод о том, что в среднем эффективный модуль Юнга интактных нативных фибробластов зависит от величины пиковой силы АСМ-индентирования. Такой вывод является важным для проведения дальнейших экспериментов, поскольку из него вытекает требование, что для повышения достоверности результатов экспериментов и обеспечения единства измерений все их следует проводить при одной и той же пиковой силе АСМ-индентирования.

### 4.2.3 Форма зонда

В [146] было показано, что средняя жесткость контакта интактного нативного фиброласта с АСМ-зондом не зависит от формы АСМ-зонда.

Для выявления воздействия данного фактора интактные нативные фибробласты исследовались двумя типами кантилеверов: Bruker SNL-10D, с острой формой зонда, и NT-MDT CSG10, функционально модифицированные добавлением на острие зонда SiO<sub>2</sub> сферической частицы радиусом 325 нм [147]. Индентирование кантилеверами с острой формой зонда проводилось с пиковой силой 3 нН, кантилеверами со сферической частицей – 2,5 нН. 112 клеток были исследованы с использованием кантилеверов с острой формой зонда, 24 клетки – кантилеверами со сферической частицей.

В первом случае средняя индентация образца составила  $200 \pm 70$  нм, а жесткость контакта АСМ-зонда с клеткой –  $17 \pm 6$  мН/м. Во втором случае средняя индентация образца составила  $160 \pm 50$  нм, а жесткость контакта АСМ-зонда с клеткой –  $16 \pm 4$  мН/м. Значения контактной жесткости в случаях применения кантилевера с острой формой зонда и кантилевера со сферической частицей практически совпадают, следовательно, при равной пиковой силе средняя деформация образца так же будет совпадать.

Таким образом, контактная жесткость системы АСМ-зонд–образец не зависит от остроты индентора и, соответственно, формы зонда. В свою очередь, из этого также следует, что в качестве параметра для количественного анализа механических параметров нативных фибробластов предпочтительнее использовать значения контактной жесткости в случае, если значения модуля Юнга недостаточно адекватно описывают такие параметры.

#### **4.2.4 Положение точки фокуса лазерного луча системы регистрации деформаций кантилевера**

Для выявления вклада фактора положения на консоли точки фокуса лазерного луча системы регистрации деформаций кантилевера была проведена

следующая серия экспериментов: один и тот же интактный нативный фибробласт сканировался два раза подряд одним и тем же кантилевером, первый раз положение фокуса лазерного луча находилось на конце консоли кантилевера, второй раз положение фокуса лазерного луча находилось примерно на одной трети длины консоли от места её закрепления, затем результаты двух сканирований сравнивались. На рисунке 4.2 показано два типичных различных положения фокуса лазерного луча на консоли кантилевера, которые использовались в данной серии экспериментов.

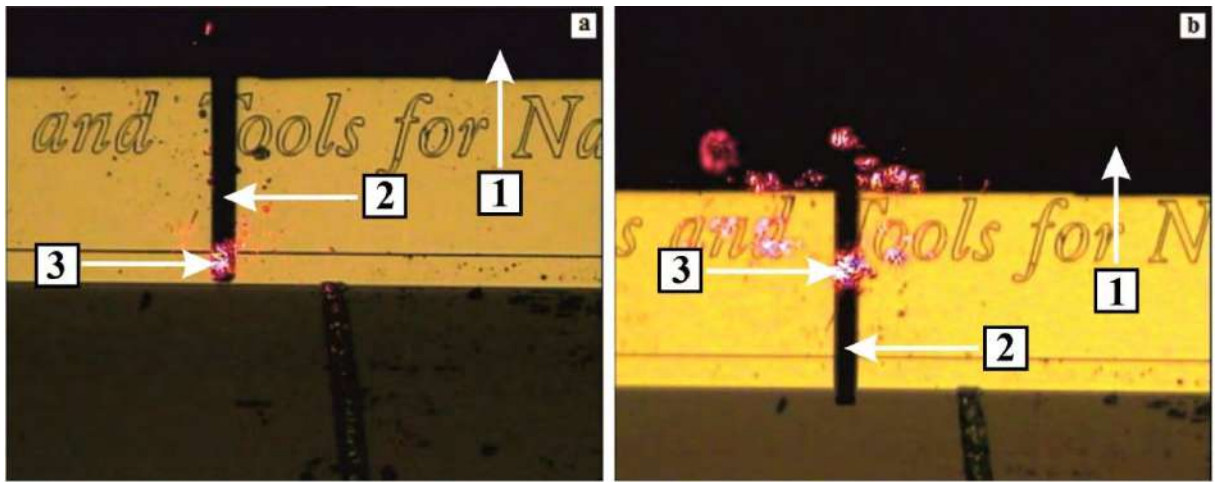


Рисунок 4.2 – Положение фокуса лазерного луча: а) на конце консоли кантилевера, б) на одной трети длины консоли от чипа кантилевера; 1 – чип АСМ-кантилевера, 2 – консоль АСМ-кантилевера, 3 – положение фокуса лазерного луча на консоли АСМ-кантилевера.

Для улучшения понимания практического смысла данной серии экспериментов приведем некоторые аналитические выкладки, представленные в [148].

Как уже упоминалось в главе 2 настоящей работы, в АСМ нормальная жесткость контакта системы зонд-образец ( $k_S$ ) рассчитывается по силовым кривым, получаемым в процессе работы АСМ, как

$$k_S = k_C S / (S_0 - S), \quad (4.2)$$

где  $k_C$  – изгибная жесткость консоли,  $S$  – наклон силовой кривой в выбранной точке образца,  $S_0$  – наклон силовой кривой на плоском и условно-бесконечно-жестком образце.

Однако, данная формула, или модель, не учитывает интересующие нас условия заземления или скольжения контакта системы АСМ-зонд–образец, поэтому правильнее будет считать, что формула 4.2 рассчитывает кажущуюся жесткость.

Для начала, подробнее рассмотрим модель АСМ-кантилевера, изображенную на рисунке 1.1 в главе 1 данной работы. В этой модели деформации подвергается только консоль АСМ-кантилевера, а зонд остается недеформируемым. Направим ось  $Y$  системы координат  $YZ$  вдоль консоли, разместив нулевую точка координат в месте её закрепления. Для консоли, лежащий в таких координатах, профиль смещений, вызванных силой  $F$  можно представить как [149]

$$Z(Y, F) = \left( \frac{2}{E_C w t^3} \right) \{ 3l_T Y^2 F_Y + (3l_C Y^2 - Y^3) F_Z \}, \quad (4.3)$$

где  $E_C$  – модуль Юнга консоли АСМ-кантилевера,  $w$  – ширина консоли,  $t$  – толщина консоли,  $l_C$  – длина консоли,  $l_T$  – высота зонда АСМ-кантилевера.

Далее, для простоты восприятия, введем параметры  $\lambda$ , обсуждающийся в главе 3 настоящей работы, жесткость консоли

$$k_C = \frac{E_C w t^3}{4l_C^3} \quad (4.4)$$

и нормированную координату точки фокуса лазерного луча оптической системы детектирования отклонения консоли

$$\psi = Y/l_C \quad (4.5)$$

и преобразуем формулу 4.3 в более компактный вид

$$Z(\psi, F) = \left(\frac{1}{2k_c}\right) \{3\lambda\psi^2 F_Y + (3\psi^2 - \psi^3)F_Z\} \quad (4.6)$$

Далее, с помощью формулы 4.6, запишем профиль угла изгиба консоли АСМ-кантилевера

$$\alpha(\psi, F) = l_c^{-1} * \frac{dZ(\psi)}{d\psi} = \left(\frac{3}{2k_c l_c}\right) \{2\lambda\psi F_Y + (2\psi - \psi^2)F_Z\} \quad (4.7)$$

Затем введем параметр вектора смещения кончика зонда АСМ-кантилевера  $r^C$ . Поскольку изгиб консоли АСМ-кантилевера достаточно мал, можно считать  $\alpha(\psi, F)$  много меньше единицы, поэтому компоненты  $r^C$  в линейном приближении достаточно точно задаются через значения смещения и угла в точке консоли  $\psi = 1$ , т.е. на ее конце, следующим образом

$$Z^C = Z(1, F), Y^C = l_c \alpha(1, F) \quad (4.8)$$

Далее, с помощью формул 4.6, 4.7 и 4.8, определим в плоской системе координат  $YZ$  элементы тензора податливости  $C^{-1}$  и тензора жесткости  $C$  АСМ-кантилевера в соответствии с [150] как

$$r^C = C^{-1}F, \quad (4.9)$$

для которой

$$C^{-1} = k_c^{-1} \begin{pmatrix} 3\lambda^2 & \frac{3\lambda}{2} \\ \frac{3\lambda}{2} & 1 \end{pmatrix} \quad (4.10)$$

и

$$F = Cr^C, \quad (4.11)$$

для которой

$$C = k_c \begin{pmatrix} \frac{4}{3\lambda^2} & -\frac{2}{\lambda} \\ -\frac{2}{\lambda} & 4 \end{pmatrix} \quad (4.12)$$

соответственно.

Затем, используя формулы 4.9, 4.10, 4.11 и 4.12, выразим угол изгиба и смещение консоли АСМ-кантилевера, измеряемые с помощью лазерного луча оптической системы детектирования, через смещения кончика зонда как

$$\alpha(\psi, r^C) = l_c^{-1} \left\{ \frac{\psi(3\psi - 2)Y^C}{\lambda} + 6\psi(1 - \psi)Z^C \right\} \quad (4.13)$$

и

$$Z(\psi, r^C) = \frac{\psi^2(\psi - 1)Y^C}{\lambda} + \psi^2(3 - 2\psi)Z^C \quad (4.14)$$

соответственно.

Представим, что моделируемый АСМ-кантилевер контактирует с идеально плоской, горизонтально и недеформируемой поверхностью. Если поднять эту поверхность на высоту  $Z$ , то в этой же точке окажется и кончик зонда АСМ-кантилевера  $Z^C$ , т.е.  $Z^C = Z$ . Если затем задать боковое смещение кончика  $Y^C$  для двух крайних случаев: а) зонд скользит по поверхности образца и  $F_Y = 0$ ; б) зонд зацепился на поверхности образца и  $Y^C = 0$ , – затем с помощью формул 4.9, 4.10, 4.11 и 4.12 представить  $F_Y = 0$  как  $Y^C = 3\lambda Z^C/2$  и  $Y^C = 0$  как  $F_Y = -F_Z/2\lambda$  соответственно, а затем с помощью формул 4.13 и 4.14 рассчитать профиль смещения консоли АСМ-кантилевера и профиль угла изгиба консоли АСМ-кантилевера соответственно, то получится результат, представленный в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Модельные профили смещения и угла изгиба консоли АСМ-кантилевера в результате поднятия контактирующего с ним идеально горизонтальной, плоской и недеформируемой поверхности, параллельной консоли АСМ-кантилевера, на высоту  $Z$ .

Характер контакта	$Z(\psi)/Z$	$2l_c\alpha(\psi)/3Z$
Защемленный	$\psi^2(3 - 2\psi)$	$4\psi(1 - \psi)$
Скользящий	$\psi^2(3 - \psi)/2$	$\psi(2 - \psi)$

На рисунке 4.3 а представлен аналитический график нормированных профилей угла изгиба консоли кантилевера для двух состояний взаимодействия системы зонд-образец, построенный в соответствии с результатами, представленными в таблице 4.3: красная кривая отражает состояние защемления, синяя – скольжения. По оси абсцисс отложена условная длина консоли АСМ-кантилевера, где 0 – это точка закрепления консоли, а 1 – крайняя точка консоли. По оси ординат отложен нормированный угол изгиба консоли АСМ-кантилевера  $\alpha/\alpha_{max}$ . Эти графики также описывают чувствительность как функцию положения фокуса на консоли.

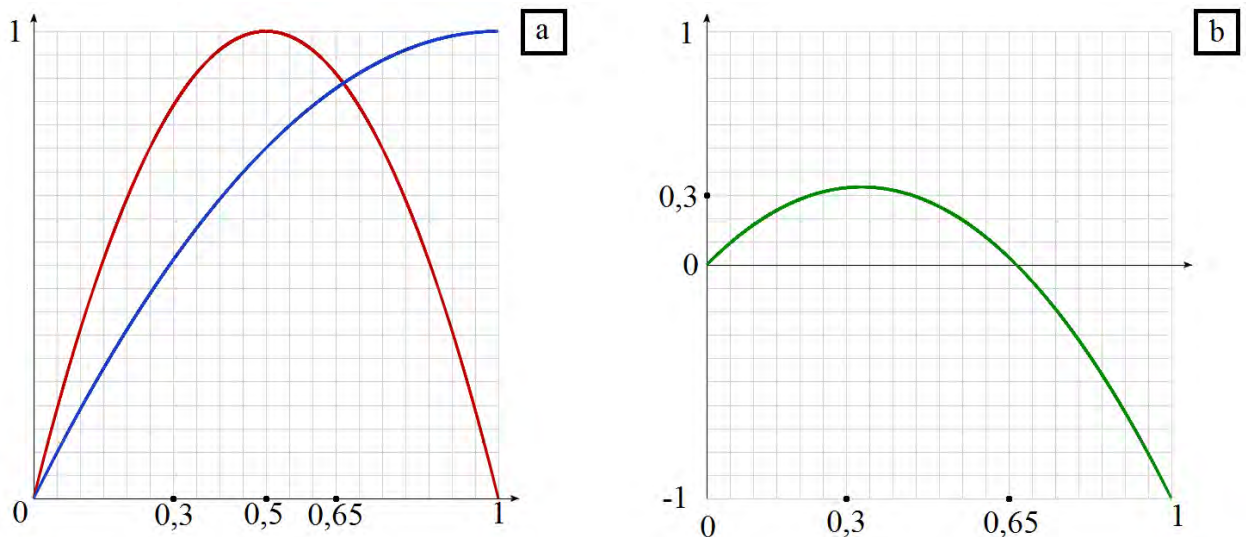


Рисунок 4.3 – а) Профили угла изгиба консоли кантилевера для двух состояний взаимодействия системы зонд-образец; б) график разности значений красного и синего профилей. На обоих графиках оси абсцисс ноль соответствует точки закрепления консоли на чипе, а единица ее свободному концу.

Обычно калибровка АСМ-кантилевера производится на твердой гладкой горизонтальной поверхности и считается, что в таком случае сила трения равна нулю. Соответствующий нормированный профиль изгиба консоли АСМ-кантилевера описывается синей кривой на рисунке 4.3 а. Если в контакте с исследуемым образцом трение также отсутствует, то взаимодействие образца с АСМ-зондом будет соответствовать также синей кривой, и результаты измерений, таким образом, не должны зависеть от точки фокуса лазерного луча оптической системы детектирования отклонения консоли АСМ-кантилевера, и для определения жесткости образца,  $k_S$ , можно использовать формулу 4.2. Если быть более точным, то в случае, когда  $k_S/k_C \ll 1$  взаимодействие описывается значениями синей кривой, умноженными на  $k_S/k_C$ . Поскольку в дальнейшем речь пойдет о мягких объектах, то это как раз и будет рассматриваемый случай.

Если же имеет место защемленный или липкий контакт с исследуемым образцом, то нормированный профиль изгиба кантилевера будет соответствовать красной кривой, и при фокусировке лазерного луча на конце консоли образец будет казаться мягче, чем при фокусировке на одной трети длины консоли от точки её закрепления, при этом для определения  $k_S$  формулу 4.2 использовать нельзя.

Если фокус выбран на расстоянии меньше двух третей длины консоли кантилевера от точки её закрепления, то при защемленном контакте АСМ-зонда с образцом значения угла и, следовательно, измеряемого модуля Юнга образца, получаемые в результате обработки данных АСМ-измерений, будут больше реальных. А если фокус выбран ближе к концу консоли (расстояние больше или равно двум третям), то в случае защемленного контакта значения модуля Юнга образца, получаемые в результате обработки данных АСМ-измерений, будут, наоборот, меньше реальных.

Таким образом, для того, чтобы иметь возможность учитывать оба варианта состояния контакта системы АСМ-зонд–образец (скользящий и защемленный), следует фокусировать лазер на точках 1 и 1/3 в соответствии с координатами



минимальной и максимальной точек на графике разности красного и синего профиля на рисунке 4.3 в. С другой стороны, для того, чтобы вклады обоих вариантов состояния контакта системы АСМ-зонд–образец были неразличимыми, достаточно использовать один луч и одну точку фокуса луча на точке  $2/3$  в соответствии с нулем графика на рисунке 4.3 в и совпадением красной и синей кривой на графике на рисунке 4.3 а. Дополнительно, в свете данной серии аналитических заключений, выбор второй точки фокуса на  $1/2$  длины консоли, как предлагается в [105, 107], представляется недостаточно обоснованным.

Проведение данной серии экспериментов влекло за собой дополнительные осложнения технического характера, поскольку в случае, когда сканирующая АСМ-головка находится на образце, то есть на предметном столике, отсутствует физическая возможность изменить точку фокуса лазерного луча с необходимой точностью, поскольку отсутствует визуализация точки фокуса. Для визуализации точки фокуса требуется перенести сканирующую АСМ-головку с предметного столика на юстировочный, где кантилевер так же будет находиться в жидкости с целью исключения погрешности за счет изменения коэффициента преломления. Затем, после изменения фокуса лазерного луча, требуется исправить, то есть снова привести к нулевому значению, величину вертикального и горизонтального отклонения положения лазерного луча на фотодетекторе. При этом жидкость, в которой будет происходить изменение положения фокуса лазерного луча на консоли кантилевера, должна быть такой же температуры как жидкость в изучаемом образце, то есть  $37^{\circ}\text{C}$ , потому что положение равновесия АСМ-кантилевера в держателе крайне чувствительно к окружающей температуре (по аналогии с биметаллической пластиной в утюге, регулирующей температуру поверхности утюга), следовательно, изменение его расположения относительно базового под воздействием теплового расширения в процентном отношении может быть существенно [62]. Это подтверждается на практике, поскольку в процессе проведения АСМ-экспериментов периодически возникает необходимость перенастройки системы.

Всего в данной серии экспериментов было исследовано 33 интактных нативных фибробласта по два раза каждый. Среднее значение отношения измеренной кажущейся деформации интактного нативного фибробласта при сканировании с фокусировкой лазерного луча на конце консоли кантилевера к измеренной кажущейся деформации интактного нативного фибробласта при сканировании с фокусировкой на одной трети расстояния от точки закрепления консоли кантилевера составило  $0,9 \pm 0,1$ , то есть достаточно близко к единице. На рисунке 4.4 представлена АСМ-карты распределения деформации одного и того же интактного нативного фибробласта, полученные при сканировании с фокусом лазерного луча на конце консоли кантилевера и при сканировании с фокусом лазерного луча на одной трети длины консоли кантилевера от точки закрепления соответственно. В случае, представленном на рисунке 4.4, среднее значение измеренной деформации интактного нативного фибробласта при сканировании с фокусом лазерного луча на конце консоли кантилевера составило 177,6 нм; среднее значение измеренной деформации интактного нативного фибробласта при сканировании с фокусом лазерного луча на одной трети длины консоли кантилевера от точки закрепления – 175,7 нм.

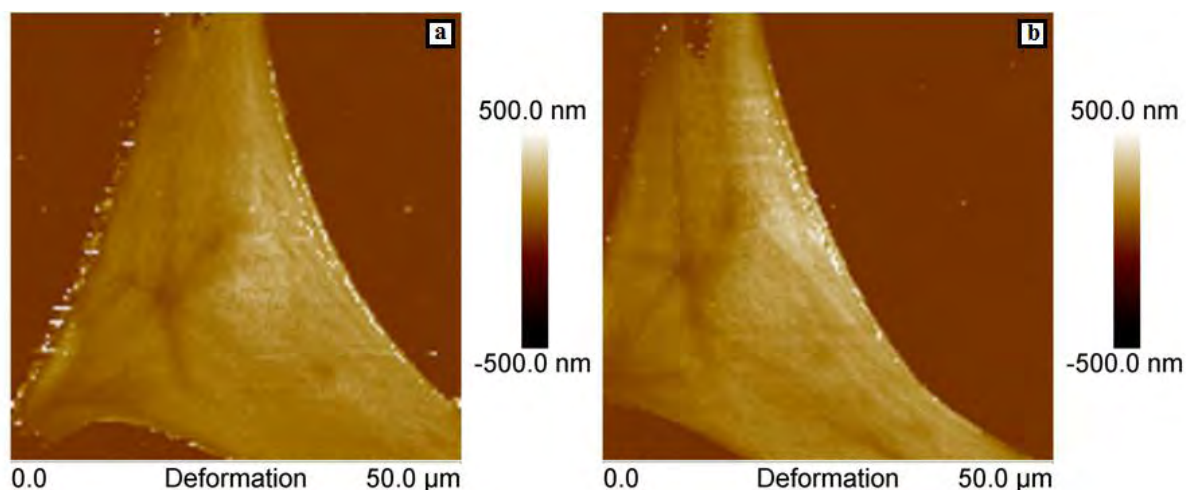


Рисунок 4.4 – АСМ-карты распределения деформации интактного нативного фибробласта, полученные в результате: а) сканирования с выбором точки фока лазерного луча на конце консоли кантилевера; б) сканирования с выбором точки фокуса лазерного луча на одной трети длины консоли кантилевера от точки закрепления.

Как видно из рисунка 4.4, АСМ-карты распределения деформации двух последовательных сканирований с изменением положения фокуса лазерного луча на консоли кантилевера не сильно отличаются друг от друга. Таким образом, результат измерения кажущейся деформации оказывается не зависящим от положения фокуса лазерного луча на консоли АСМ-кантилевера, а значит усредненный фибробласт можно считать скользким по отношению к кремниевому зонду.

#### **4.2.5 Артефакты в АСМ-сигналах на наклонных участках образца**

При проведении серий АСМ-экспериментов на различных объектах исследования, как данной диссертации, так и описанных в других работах автора, был обнаружен особый вид артефактов АСМ-изображений, имеющий системный характер. На рисунках 4.5 – 4.7 представлены результаты АСМ-сканирования трёх различных образцов: галлиевой капли, интактного нативного фибробласта и интактного нативного эритроцита.

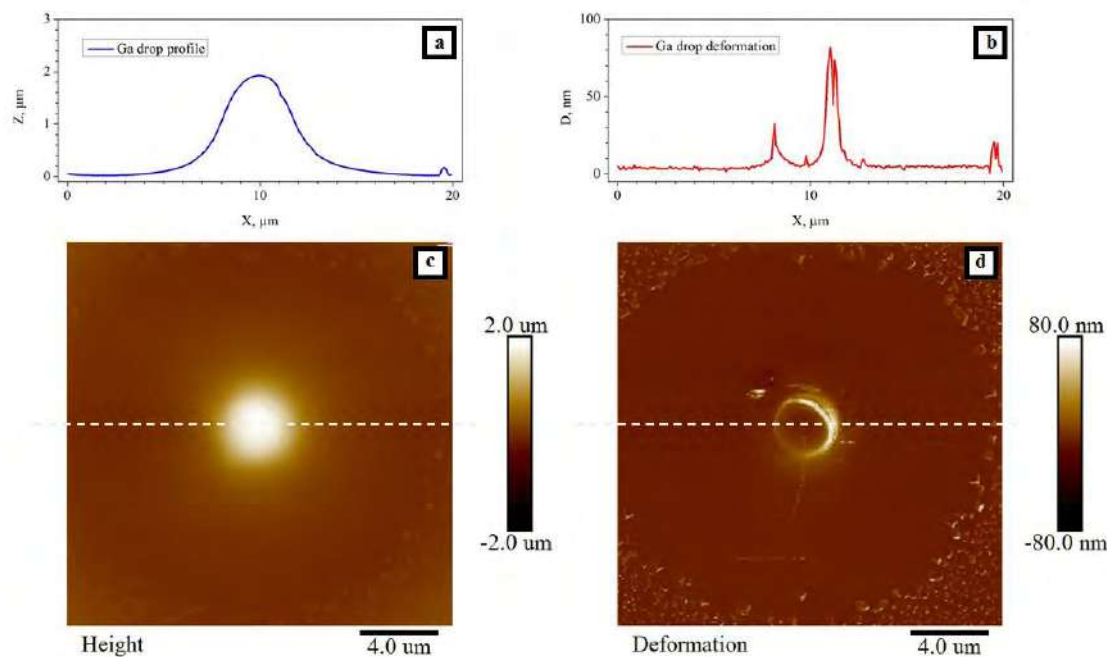


Рисунок 4.5 Исследование образца галлиевой капли на поверхности кремния на воздухе,  $T = 21^{\circ}\text{C}$ : а) поперечное сечение АСМ-карты распределения высоты, б) поперечное сечение АСМ-карты распределения деформации, в) АСМ-карта распределения высоты, г) АСМ-карта распределения деформации.

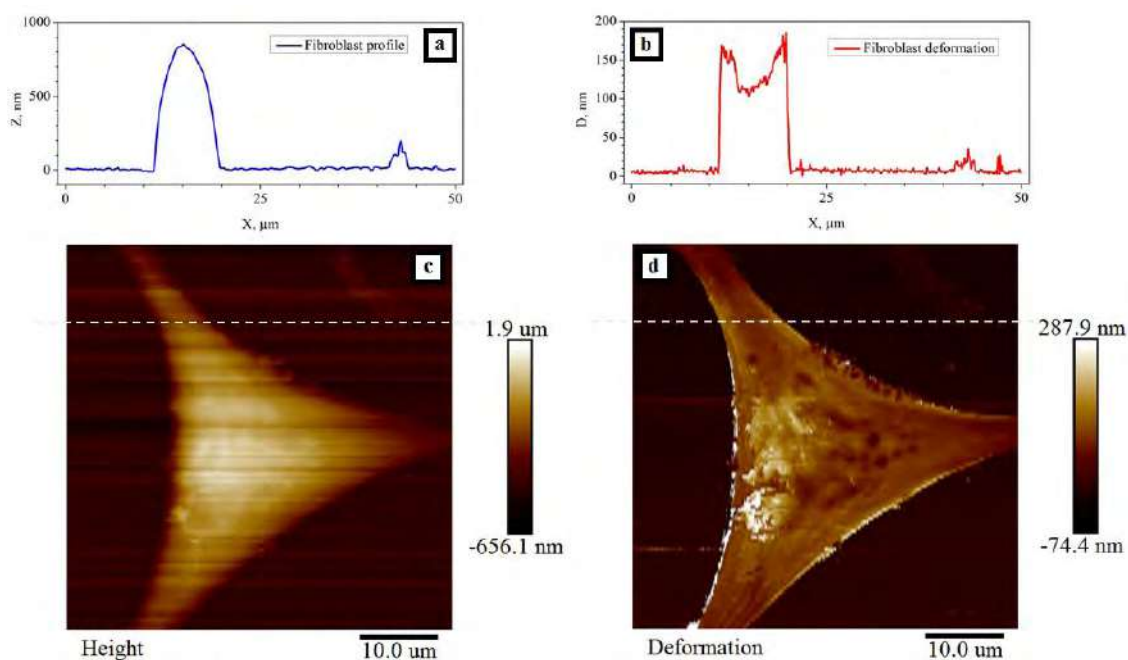


Рисунок 4.6 Исследование интактного нативного фибробласта в физиологическом растворе,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ : а) поперечное сечение АСМ-карты распределения высоты, б) поперечное сечение АСМ-карты распределения деформации, в) АСМ-карта распределения высоты, г) АСМ-карта распределения деформации.

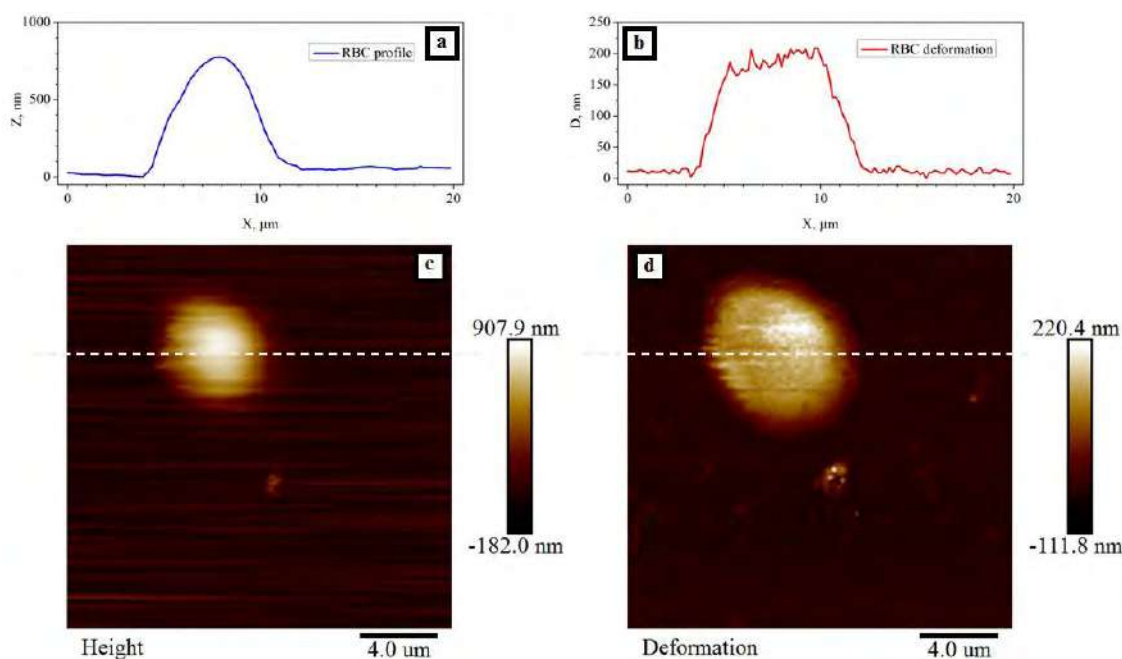


Рисунок 4.7 – Исследование интактного нативного эритроцита фибробласта в физиологическом растворе,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ : а) поперечное сечение АСМ-карты распределения высоты, б) поперечное сечение АСМ-карты распределения деформации, в) АСМ-карта распределения высоты, г) АСМ-карта распределения деформации.

Отдельного внимания заслуживает галлиевая капля как объект АСМ-исследования. Известно, что температура плавления/кристаллизации галлия составляет  $29,8^{\circ}\text{C}$ , в то время как АСМ-эксперименты с галлиевыми каплями проводились при комнатной температуре около  $21^{\circ}\text{C}$ , из чего следует логичный и закономерный вывод, что галлий находился в твёрдом кристаллическом состоянии. На наклонных участках твердых металлических поверхностей, также как, например, на кремниевой решетке, зонд скользит, т.е. наблюдается описываемый артефакт. Однако, науке также известен тот факт, что при переохлаждении галлий может оставаться в состоянии жидкой фазы при температурах, меньше температуры его плавления/кристаллизации [151]. В таком агрегатном состоянии могли находиться и исследуемые в рамках данной серии экспериментов капли галлия.

Считается, что в идеальной жидкости не может возникать сдвиговых напряжений, т.е. вклад латеральных сил практически отсутствует, и зонд также будет скользить и в идеальной жидкости. Вязкость галлия в жидком агрегатном

состоянии при температуре около  $21^{\circ}\text{C}$  равняется  $\sim 1,6 \cdot 10^{-2}$  П, и не сильно отличается от воды при той же температуре, у которой она равна  $\sim 10^{-2}$  П, и которая считается почти идеальной жидкостью. Для сравнения, вязкость глицерина при приблизительно той же температуре составляет  $\sim 1490 \cdot 10^{-2}$  П или  $\sim 15$  П, т.е. на три порядка больше, чем у галлия или воды. Поэтому различие в  $0,6 \cdot 10^{-2}$  П между жидким галлием и водой представляется несущественным.

Проведенный анализ позволяет сделать вывод о том, что в исследуемых каплях галлия практически отсутствуют сдвиговые напряжения на поверхности объекта вообще и на его наклонных участках в частности.

Описываемый артефакт характеризуется скачкообразным увеличением сигнала деформации на наклонных участках галлиевой капли и интактного нативного фибробласта. У интактного нативного эритроцита, приведенного для сравнения, описываемый артефакт отсутствует.

Природа данного артефакта в АСМ-сигнале деформации становится ясна, если представить себе систему АСМ-кантилевер–образец в виде модели, в которой АСМ-зонд будет представлен шариком, подвешенным на двух пружинах по осям  $X$  и  $Z$ , представляющих АСМ-консоль. Описанная модель и её работа на горизонтальных и наклонных участках образца представлена на рисунке 4.8.

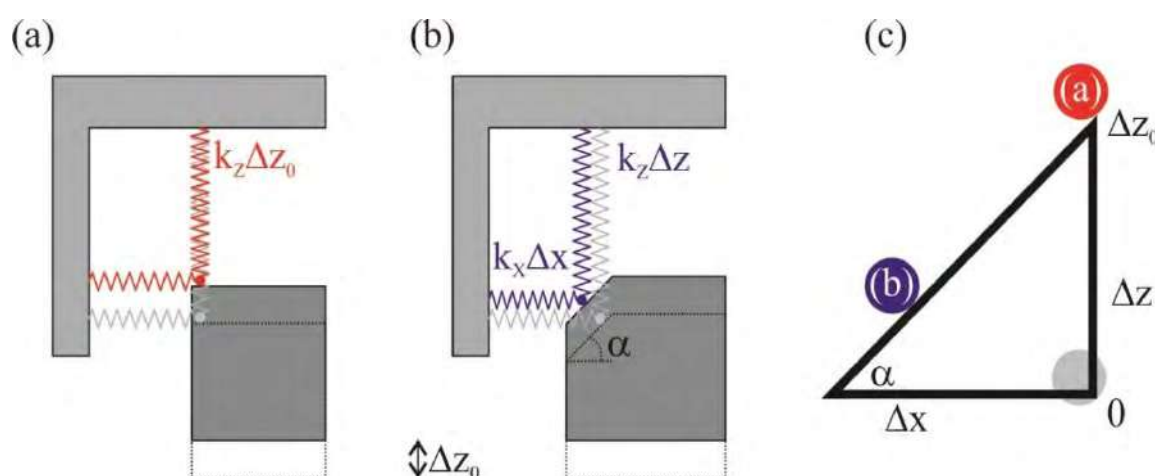


Рисунок 4.8 – Модель взаимодействия АСМ-кантилевера с образцом: а) на ровной горизонтальной поверхности, б) на наклонной, в) сравнение вертикального положения шарика, демонстрирующего деформацию консоли, относительно начального положения «0» в случаях «а» и «б» соответственно.

Вначале шарик находится в состоянии покоя в точке «0» на скользком наклонном образце. В случае если поднять образец на высоту  $z_0$ , то тогда шарик соскользнет на высоту  $z$ , и появится кажущаяся деформация образца  $z_A$ , равная:

$$z_A = z_0 - z \quad (4.2)$$

Поскольку в атомно-силовом микроскопе регулируется только сигнал вертикальной силы взаимодействия, равный:

$$F_z = k_z z, \quad (4.3)$$

а кажущуюся жесткость образца можно считать равной:

$$k_A = \frac{F_z}{z_A}, \quad (4.4)$$

то тогда можно показать, что конструкция, изображенная на рисунке 4.7 (b) работает так, что:

$$z = \frac{z_0 k_x}{(k_x + k_z t g^2 \alpha)} \quad (4.5)$$

$$z_A = \frac{z_0 k_z}{(k_z + k_x c t g^2 \alpha)} \quad (4.6)$$

$$k_A = k_x c t g^2 \alpha \quad (4.7)$$

Получается, что АСМ-зонд просто проскальзывает на наклонных участках объекта, если он скользкий по отношению к материалу зонда, как в случае с галлиевой каплей, про которую изначально известно, что она скользкая по отношению к материалу зонда, и фибробластом, про который факт скользкости по отношению к материалу зонда можно установить. На АСМ-карте распределения деформации интактного нативного эритроцита данный артефакт не наблюдается,

потому что эритроцит оказывается липким по отношению к материалу зонда и приводит контакт зонд-образец в состояние залипания или защемления.

Важно отметить, что аналогичные артефакты присутствуют на АСМ-изображениях, представленных в работах других авторов, например [7, 118, 152, 153, 154], однако, авторы данных работ не акцентируют внимания ни на самих артефактах, ни на их значении.

### 4.3 Алгоритм методики. Выводы

Одним из главных достоинств разработанной методики для охарактеризации индивидуальных объектов является возможность применения её, так сказать, *post factum*, причём не только к собственным результатам, но также и к результатам, полученным из других источников, в том числе литературных.

Например, на рисунках 4.9 и 4.10 приведены иллюстрации из статей [153, 154] из журналов *Biophysical Journal* и *Microscopy Today* соответственно, с импакт-факторами по состоянию на 2018 год 3,67 и 0,42 соответственно.

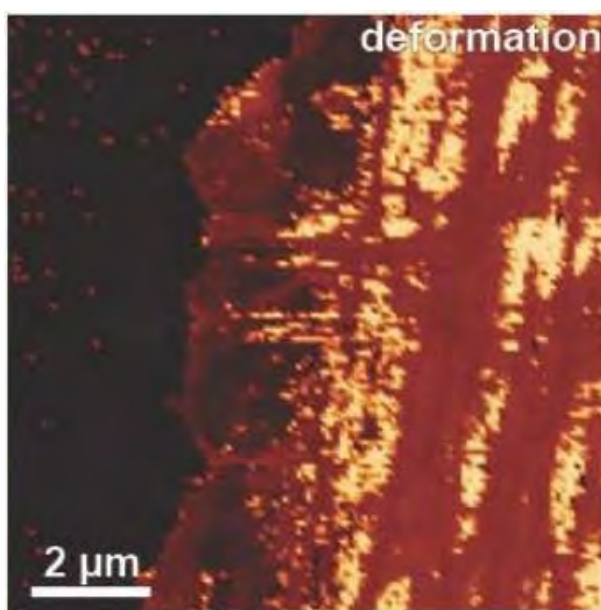


Рисунок 4.9 – АСМ-карта распределения деформации нативного фибробласта [153].



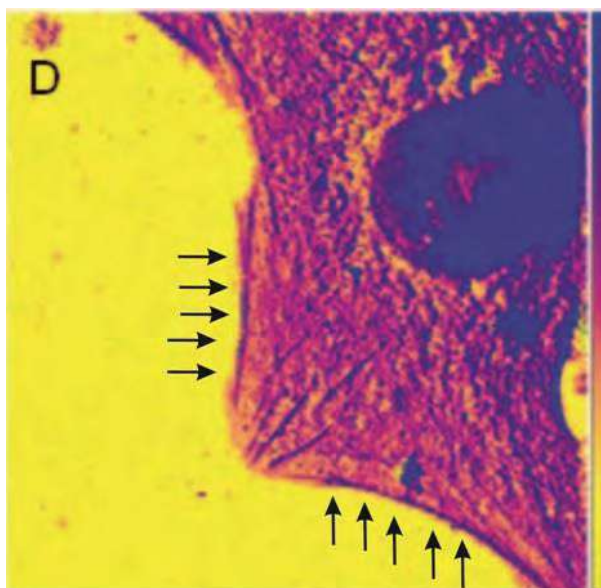


Рисунок 4.10 – АСМ-карта распределения деформации нативной клетки остеогенной саркомы [154].

Представленная на рисунке 4.9 АСМ-карта распределения деформации нативного фибробласта не удовлетворяет критериям детектирования "скользящего" контакта системы зонд-образец, поскольку на ней отсутствует характерный артефакт. Следовательно, представленные результаты АСМ-измерений не позволяют однозначно трактовать полученные данные.

Представленная же на рисунке 4.10 АСМ-карта распределения деформации нативной клетки остеогенной саркомы удовлетворяет критериям детектирования "скользящего" контакта системы зонд-образец, поскольку в данном случае характерный артефакт в наличии (отмечен на рисунке 4.9 стрелками). Следовательно, представленные результаты могут получать однозначную трактовку.

Разумеется, данное утверждение справедливо только для результатов, снабженных иллюстрациями с АСМ-картами. Тем не менее, как уже отмечалось ранее, несмотря на наличие характерного артефакта не только в результатах, представленных в данной статье, но и в ряде других – ни в одной из таких работ не акцентируется внимание ни на самих артефактах, ни на их значении.

Таким образом, на важный для АСМ-измерений вопрос: являются ли детектируемые деформация, жесткость, модуль Юнга образца реальными или кажущимися, мы получили следующие ответы. Если зонд скользит по образцу, то изменение сигнала эффективного модуля Юнга отражает реальное изменение этого параметра в объекте, как, например, в случае с нативными фибробластами и галиевой каплей. Если зонд заземлён образцом, то изменение сигнала можно также связать с ослаблением или усилением заземления (трения в контакте), как в случае с нативными нейронами и эритроцитами.

Серия проведенных на фибробластах экспериментов таким образом представляет собой методику определения наличия скользящего или заземленного состояния в контакте зонд-образец. Получены веские основания считать интактные нативные фибробласты скользкими, и, таким образом, при АСМ-индентировании нативных фибробластов можно пренебречь латеральными силами в контакте зонд-образец по сравнению с нормальными. Это разрешает в дальнейшем толковать измеряемые значения контактной жесткости (и значения других параметров, таких как: деформация или модуль Юнга) как количественные параметры, характеризующие фибробласты.

## **ГЛАВА 5. РЕАКЦИЯ НАТИВНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА КОЛХИЦИН**

В данной главе представляются результаты исследования действия колхицина – вещества, являющегося алкалоидом трополонового ряда и способствующего деполимеризации тубулиновых микрофиламентов – на нативные фибробласты. АСМ-исследование велось с помощью разработанных автором работы и описанных в третьей и четвертой главе методик интерпретации результатов АСМ-измерений. Также для дополнительной верификации полученных результатов был применен комплементарный АСМ метод конфокальной микроскопии.

### **5.1 Результаты исследования динамики поведения нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина**

Исследование динамики поведения нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина – вещества, являющегося алкалоидом трополонового ряда, и способствующего деполимеризации тубулиновых микрофиламентов [155], осуществлялось с помощью проведения следующей серии экспериментов: методом АСМ исследовались нативные фибробласты одной и той же клеточной линии, одна часть которых была культивирована в присутствии колхицина, другая была интактной контрольной. Использовались следующие параметры сканирования: частота строчной развертки 0,10-0,15 Гц, пиковая сила 3 нН, частота и амплитуда вертикального зондирования 0,25 кГц и 1 мкм соответственно; в том числе с использованием одной и той же марки и модели АСМ-кантилевера NT-MDT SI CSG10.

Использовались нативные фибробласты 10-12-дневных куриных эмбрионов, которые культивировались способом, описанным в пункте 4.2 настоящей работы.

Колхицин в культуральную среду добавляли в концентрации 0,1 мкг/мл за сутки до начала АСМ-экспериментов, которые проводились при температуре 37°C на атомно-силовом микроскопе Bruker BioScope Catalyst, встроенном в оптический микроскоп Carl Zeiss Axio Observer Z1. Для АСМ-индентирования и картирования механических параметров клеток использовался режим PeakForce QNM и кантилеверы NT-MDT SI CSG10, коэффициент жесткости которых калибровался методом тепловых шумов. Также, на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 710 контролировалась яркость флуоресценции актиновых волокон прижизненно окрашенных фибробластов, что будет более подробно описано в пункте 5.2 настоящей работы.

Всего методом АСМ было исследовано 118 нативных фибробластов, 55 из которых были интактными контрольными, а 63 были культивированы в присутствии колхицина. Результаты анализа данных об эффективном модуле Юнга и измеренной деформации исследованных нативных фибробластов представлены в таблице 5.1, где  $N$  – это порядковый номер эксперимента;  $E_0$  – это средний измеренный модуль Юнга контрольного интактного нативного фибробласта;  $E_C$  – это средний измеренный модуль Юнга нативного фибробласта, культивированного в присутствии колхицина;  $D_0$  – это средняя измеренная деформация контрольного интактного нативного фибробласта;  $D_C$  – это средняя измеренная деформация нативного фибробласта, культивированного в присутствии колхицина;  $n_0$  – это количество интактных контрольных нативных фибробластов, исследованных в рамках одного эксперимента;  $n_C$  – это количество нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, исследованных в рамках одного эксперимента.

Таблица 5.1 – Результаты анализа данных об эффективном модуле Юнга и измеренной деформации исследованных нативных фибробластов

$N$	$E_0$ , кПа	$E_C$ , кПа	$D_0$ , нм	$D_C$ , нм	$n_0$	$n_C$
1	26	57	336	277	5	6
2	53	106	339	202	3	6
3	76	95	236	224	5	7
4	63	110	247	219	6	6
5	25	23	310	287	8	9
6	28	32	267	262	7	7
7	49	57	340	240	7	7
8	43	49	229	218	7	7
9	42	59	230	219	7	8

При этом и измеренная деформация и эффективный модуль Юнга усреднялись по средним сигналам на поверхности фибробластов, участвующих в эксперименте, с исключением областей, соответствующих границам клеток.

Затем было проведено усреднение по всем клеткам в рамках одной группы, т.е. были усреднены все значения среднего измеренного модуля Юнга контрольных интактных нативных фибробластов, затем все значения среднего измеренного модуля Юнга нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина, затем все значения средней измеренной деформации контрольных интактных нативных фибробластов, и затем все значения средней измеренной деформации нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина. Затем было вычислено отношение усредненного значения измеренного модуля Юнга нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, к усредненному значению измеренного модуля Юнга интактных контрольных нативных фибробластов ( $E_{CM}/E_{0M}$ ), и отношение усредненного значения измеренной деформации нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, к усредненному значению измеренной деформации интактных контрольных нативных фибробластов ( $D_{CM}/D_{0M}$ )

соответственно. Результаты, полученные при этом сравнении представлены в таблице 5.2, где  $E_{CM}$  – это средний измеренный модуль Юнга всех нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина;  $E_{0M}$  – это средний измеренный модуль Юнга всех интактных контрольных нативных фибробластов;  $D_{CM}$  – это средняя измеренная деформация всех нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина;  $D_{0M}$  – это средняя измеренная деформация всех интактных контрольных нативных фибробластов;  $E_{CM}/E_{0M}$  и  $D_{CM}/D_{0M}$  – это отношения соответствующих величин.

Таблица 5.2 – Результаты усреднения и сравнения эффективного модуля Юнга и измеренной деформации нативных фибробластов

$E_{CM}$ , кПа	$E_{0M}$ , кПа	$D_{CM}$ , нм	$D_{0M}$ , нм	$E_{CM}/E_{0M}$	$D_{CM}/D_{0M}$
$65 \pm 31$	$45 \pm 16$	$239 \pm 26$	$282 \pm 45$	$1,44 \pm 0,90$	$0,85 \pm 0,18$

Затем, применяя методику, описанную в пункте 4.4 настоящей работы, клетки были рассортированы по принципу "скользкие-липкие" по отношению к материалу зондового датчика и средние значения измеренных деформации и модуля Юнга снова сравнивались между собой. Результаты такой сортировки и сравнения представлены в таблицах 5.3, 5.4, 5.5 и 5.6 соответственно.

Таблица 5.3 – Результаты анализа данных об эффективном модуле Юнга и измеренной деформации исследованных нативных фибробластов, являющихся скользкими по отношению к материалу зондового датчика

$N$	$E_0$ , кПа	$E_C$ , кПа	$D_0$ , нм	$D_C$ , нм	$n_0$	$n_C$
1	29	48	346	280	2	4
2	53	76	339	175	3	2
3	80	93	218	235	3	5
4	63	110	247	219	6	6
5	30	25	296	257	5	6
6	28	32	252	243	4	3
7	27	54	352	257	5	5
8	46	62	210	222	2	2
9	42	56	225	202	5	3

Таблица 5.4 – Результаты усреднения и сравнения эффективного модуля Юнга и измеренной деформации нативных фибробластов, являющихся скользкими по отношению к материалу зондового датчика

$E_{CM}$ , кПа	$E_{0M}$ , кПа	$D_{CM}$ , нм	$D_{0M}$ , нм	$E_{CM}/E_{0M}$	$D_{CM}/D_{0M}$
$62 \pm 27$	$45 \pm 18$	$232 \pm 32$	$276 \pm 58$	$1,38 \pm 0,82$	$0,84 \pm 0,21$

Таблица 5.5 – Результаты анализа данных об эффективном модуле Юнга и измеренной деформации исследованных нативных фибробластов, являющихся липкими по отношению к материалу зондового датчика

$N$	$E_0$ , кПа	$E_C$ , кПа	$D_0$ , нм	$D_C$ , нм	$n_0$	$n_C$
1	23	75	329	272	3	2
2	—	121	—	216	0	4
3	77	101	263	194	2	2
4	—	—	—	—	0	0
5	13	19	333	348	3	3
6	28	33	286	276	3	4
7	78	66	311	197	2	2
8	42	43	236	217	5	5
9	43	61	244	229	2	5

Таблица 5.6 – Результаты усреднения и сравнения эффективного модуля Юнга и измеренной деформации нативных фибробластов, являющихся липкими по отношению к материалу зондового датчика

$E_{CM}$ , кПа	$E_{0M}$ , кПа	$D_{CM}$ , нм	$D_{0M}$ , нм	$E_{CM}/E_{0M}$	$D_{CM}/D_{0M}$
$65 \pm 34$	$44 \pm 25$	$244 \pm 52$	$286 \pm 40$	$1,48 \pm 1,14$	$0,85 \pm 0,22$

В таблице 5.5 вместо некоторых значений присутствует символ "—", означающий отсутствие нативных фибробластов, являющихся липкими по отношению к материалу зондового датчика, в соответствующем эксперименте.

В результате сортировки нативных фибробластов по принципу "скользкий-липкий" по отношению к материалу зондового датчика получилось, что 35 интактных контрольных нативных фибробластов и 36 нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, оказались скользкими по отношению к материалу АСМ-зонда, а 20 интактных контрольных нативных фибробластов и 27 нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, в свою очередь оказались липкими по отношению к материалу АСМ-зонда.



Таким образом, среднее значение отношения эффективного модуля Юнга нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, к эффективному модулю Юнга интактных контрольных нативных фибробластов  $E_c/E_0$  у нативных фибробластов, являющихся липкими по отношению к материалу АСМ-зонда, приблизительно на семь процентов больше, чем у нативных фибробластов, являющихся скользкими по отношению к материалу АСМ-зонда. Проведенный тест Манна-Уитни показал вероятность совпадения распределений  $> 0,95$ , что говорит об отсутствии статистической значимости отличия, но важно другое: это отличие может с равной долей вероятности быть вызвано как бóльшим упрочнением нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, и являющихся липкими по отношению к материалу АСМ-зонда, так и уменьшением коэффициента трения между их поверхностью и зондовым датчиком.

Результаты сравнения среднего измеренного модуля Юнга контрольных интактных нативных фибробластов и среднего измеренного модуля Юнга нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина в концентрации 0,1 мкг/мл представлены в виде гистограммы на рисунке 5.1.

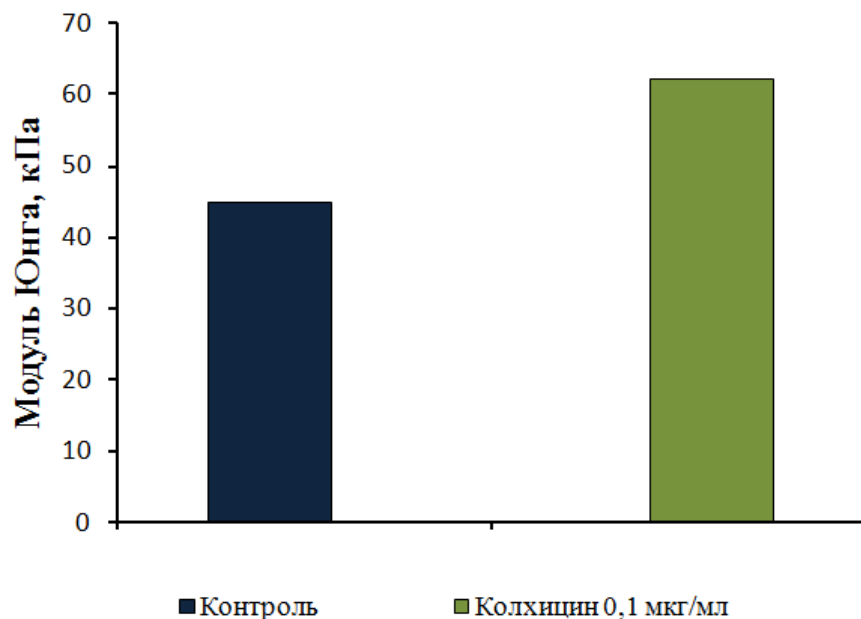


Рисунок 5.1 – Изменение среднего измеренного модуля Юнга нативных фибробластов после воздействия колхицина.

Однако, в работе [146], которая посвящена исследованию нативных фибробластов пирамидальными нанометрово острыми зондовыми датчиками и зондовыми датчиками, функционализированными субмикронными сферическими частицами, было продемонстрировано, что физиологическое состояние клеток предпочтительнее анализировать с помощью оценки величины измеренной деформации. Поскольку средние отношения измеренной деформации нативных фибробластов, выращенных в присутствии колхицина, к измеренной деформации интактных контрольных нативных фибробластов  $D_c/D_0$  у нативных фибробластов, являющихся скользкими по отношению к материалу АСМ-зонда, и нативных фибробластов, являющихся липкими по отношению к материалу АСМ-зонда, приблизительно равны, то предполагается, что действие колхицина на нативные фибробласты заключается только в росте их ригидности.

## 5.2 Комплементарные конфокальные оптические исследования

Для дополнительной верификации полученных результатов исследования был применен комплементарный метод конфокальной микроскопии. По причине технологических особенностей данного метода, использовалось прижизненное окрашивание нативных фибробластов фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Texas Red с концентрацией 3 мкл/мл [156]. Время экспозиции составляло 60 минут. Фаллоидин высокоспецифично связывается с F-актином и позволяет визуализировать и оценивать актиновый цитоскелет клеток. Texas Red возбуждался при  $\lambda=591$  нм, а флуоресцирует он в красной области спектра  $\lambda=608$  нм. Ядра клеток докрашивались 1%-ым раствором специфического флуоресцентного красителя DAPI в течение 10 минут [157]. Наличие явления флуоресценции в данном случае обусловлено встраиванием красителя в малую

бороздку двунитовой молекулы ДНК. Свечение возбуждалось диодным лазером с длиной волны 405 нм, флуоресценция регистрировалась при  $\lambda=450\text{--}490$  нм.

Для цитологического анализа использовался лазерный сканирующий микроскоп Carl Zeiss LSM 710, интегрированный с инвертированным микроскопом Carl Zeiss Axio Observer Z1 с объективом LD Plan-Neofluar 63x/0.75 Corr. Интенсивность флуоресценции определялась с помощью специально предназначенного программного обеспечения Carl Zeiss ZEN\_2012.

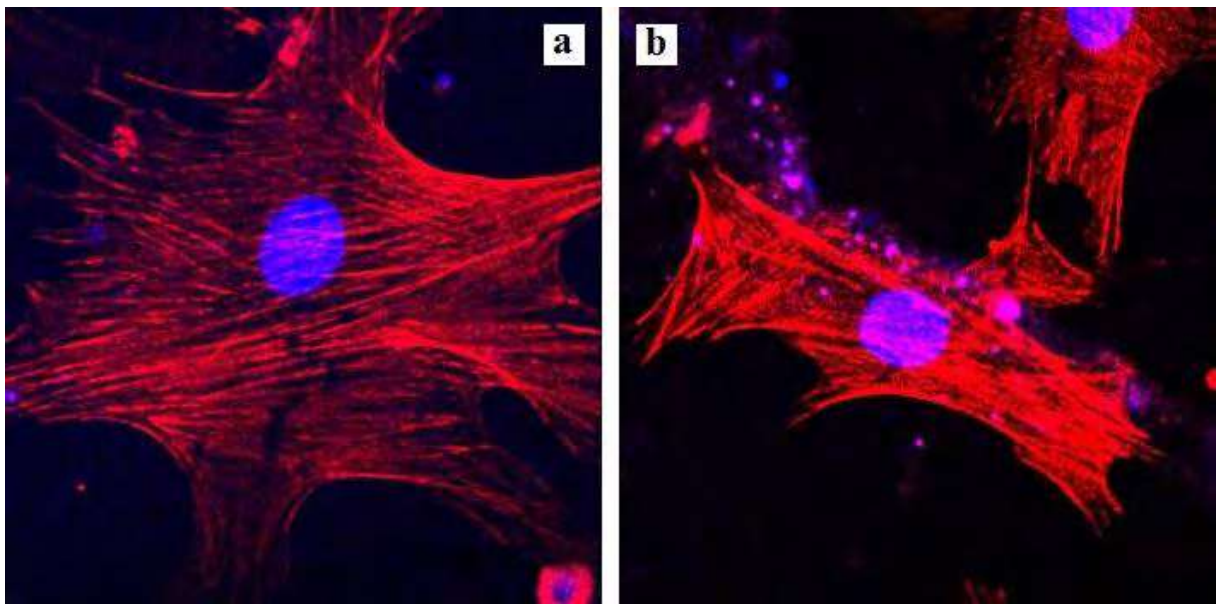


Рисунок 5.2 – результаты исследования нативных фибробластов методами конфокальной микроскопии: а) интактный контрольный нативный фибробласт; б) нативный фибробласт, культивированный в присутствии колхицина.

Всего интенсивность флуоресценции была измерена для 30 фибробластов, 15 из которых были интактными контрольными, а 15 – культивированными в присутствии исследуемого вещества, колхицина. Площадь выбранного участка клетки в обоих случаях была одинаковой. Функция распределения интенсивности по выбранной области клетки характеризовалась нормальным распределением. Для каждой клетки было сделано по три измерения распределения интенсивности. Среднее значение интенсивности в контроле было принято за

100%. Результаты сравнения интенсивности свечения контрольных интактных нативных фибробластов, нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина в концентрации 0,1 мкг/мл, и нативных фибробластов, культивированных в присутствии колхицина в концентрации 1 мкг/мл, представлены в виде гистограммы на рисунке 5.3.

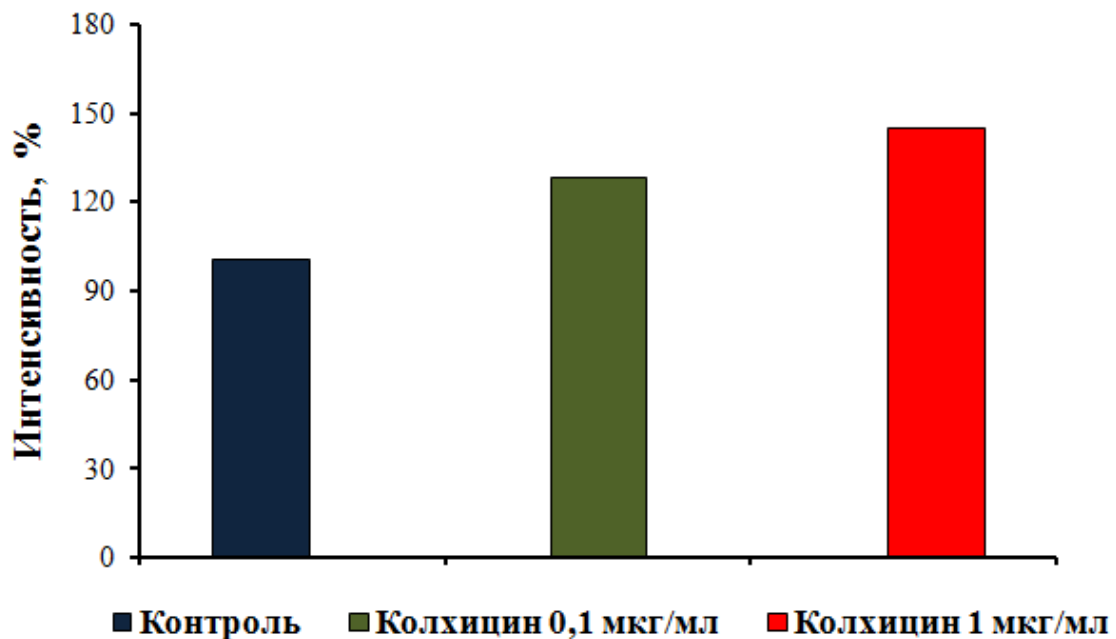


Рисунок 5.3 – Изменение интенсивности свечения актиновых волокон в фибробластах после воздействия колхицина. По оси ординат – средние значения интенсивности флуоресценции актина, %.

Используя методику прижизненной окраски актиновых структур клетки, было обнаружено образование многочисленных актиновых микрофиламентов в нативных фибробластах после воздействия колхицина. Аналогичный результат наблюдался в работе [158], а схожее воздействие колхицина на другие клетки обсуждалось в [155].

Полученный результат является свидетельством уплотнения актиновых волокон в нативных фибробластах в результате воздействия колхицина и объясняет наблюдаемый рост ригидности клеток и упрочнение их цитоскелета.

### 5.3 Выводы

Серия проведенных экспериментов позволила установить, что применение колхицина неожиданно увеличивает модуль Юнга и уменьшает деформацию нативных фибробластов. Поскольку, основываясь на ранее продемонстрированных данных, можно считать фибробласты скользкими объектами, следовательно, наблюдаемое упрочнение является реальным, а не кажущимся, а результат – достоверным.

В предыдущих работах было показано, что средняя жесткость нативных фибробластов определяется механическими параметрами их внешних слоев. Таким образом, согласно АСМ-исследованием, действие колхицина проявляется в упрочнении этих внешних слоев, т.е. снижении их податливости.

Исследование нативных фибробластов методами конфокальной микроскопии также демонстрируют уплотнение актиновой сети во внешних слоях фибробластов, что в свою очередь вызывает общее упрочнение клетки.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Сформулируем основные выводы работы. Разработаны и апробированы две методики атомно-силовой микроскопии, направленные на обеспечение адекватности измерений механических параметров мягких объектов. В рамках исследований, описанных в настоящей работе, использовался перспективный квазистатический режим работы атомно-силового микроскопа PeakForce QNM. АСМ-исследование мягких объектов в этом режиме позволило эффективно изучать их механические параметры. На нативных клетках с различными свойствами – нативных нейронах и фибробластах – методом АСМ изучалось воздействие различных внешних факторов (сканирование зондовыми датчиками разной длины; сканирование с разным временным интервалом; сканирование с разной пиковой силой индентирования; сканирование зондовыми датчиками с разной формой острия; сканирование с выбором разных положений точки фокуса лазерного луча на консоли АСМ-кантилевера; культивирование в присутствии алкалоида трополонового ряда – колхицина). В результате проделанной работы были разработаны методики АСМ, повышающие достоверность и адекватность измерений механических параметров мягких объектов.

### **Основные результаты работы**

1. Разработаны и апробированы две новые методики атомно-силовой микроскопии, обеспечивающие адекватность измерений механических параметров мягких объектов (деформации, контактной жесткости, модуля Юнга): одна требует среднестатистического анализа измеряемых параметров у группы однотипных объектов, вторая оперирует данными индивидуального объекта.

2. Показано, что АСМ-зонд залипает (защемляется) на среднестатистическом нативном нейроне и эритроците, а на большинстве фибробластов скользит. Как следствие, изменения сигнала эффективного модуля Юнга,  $E_A$ , могут отражать реальные вариации нормальной жесткости (твердости, ригидности) только в фибробластах. Для нейронов и эритроцитов такие изменения следует также связывать с увеличением (падением  $E_A$ ) или уменьшением (рост  $E_A$ ) трения в контакте. Результаты данного диссертационного исследования позволяют интерпретировать наблюдавшийся ранее рост  $E_A$  нейронов из-за воздействия убаина, ранее связывавшийся с упрочнением клеток, уменьшением трения в контакте зонд-нейрон, вероятно связанного со снижением натяжения в нейронной сети как реакцией на убаин.

3. Выявлено уменьшение измеряемого в АСМ модуля Юнга  $E_A$  с ростом отношения высоты зонда к длине консоли при АСМ-исследовании Si- или Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-зондами образцов нативных нейронов куриного эмбриона в жидкой питательной среде, что указывает на преобладание латеральных сил над нормальными в контакте зонд-образец. Таким образом, среднестатистический нативный нейрон оказывается липким объектом, что влечет за собой неоднозначность интерпретации результатов АСМ-измерений его механических параметров.

4. Установлено, что рост кажущейся деформации на наклонных участках однородного образца свидетельствует о проскальзывании на нем АСМ-зонда. Наблюдение данного эффекта при АСМ-исследовании нативных фибробластов позволяет не учитывать вклад латеральных сил в контакте зонд-образец по сравнению с нормальными и использовать значения контактной жесткости (либо деформации) для количественной охарактеризации образца. В частности, продемонстрировано уменьшение стандартного отклонения значений измеренного модуля Юнга у скользких нативных фибробластов по сравнению с липкими.

5. Опираясь на разработанные АСМ-методики для сортировки объектов исследования на липкие и скользкие (для среднестатистического и для индивидуального объекта) продемонстрировано побочное действие колхицина,

ингибитора полимеризации тубулина в живых клетках, заключающееся в снижении податливости нативных фибробластов. Данный результат также был дополнительно подтвержден методом лазерной конфокальной микроскопии.



## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор работы искренне и глубоко благодарит своего научного руководителя доктора физико-математических наук Анкудинова Александра Витальевича за помощь в постановке задач, обсуждении результатов работы, совершенствовании формулировок текста диссертационной работы, плодотворное и интересное научное общение, ценные советы, способствовавшие профессиональному и личностному росту и развитию автора.

Также автор выражает благодарность Б.В. Крылову, С.А. Подзоровой, В.А. Пеннийнен, М.М. Халисову и другим сотрудникам и сотрудницам лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, а также М.В. Самсонову и В.П. Ширинскому – сотрудникам Института экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения РФ.

Автор также благодарит А.О. Голубка, П.А. Белова, Я.Б. Музыченко и других сотрудников и сотрудниц кафедры нанофотоники и метаматериалов Университета ИТМО, а также Б.О. Щербина, И.А. Няпшаева, Г.И. Лобова, Т.Е. Тимошенко, К.А. Сысоева, А.А. Евстрапова, К.И. Белоусова, М.К. Ходзицкого, Д.А. Гомона, Н.С. Балбекина, А.А. Петрова, О.Н. Коршунову и А.А. Бобырь.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Описание растительной клетки и ткани Р. Гуком, М. Мальпиги и Н. Грю // РГАУ-МСХА [сайт] URL: <http://www.activestudy.info/opisanie-rastitelnoj-kletki-i-tkani-r-gukom-m-malpigi-i-n-gryu/> (дата обращения: 29.03.2019).
2. КРОВООБРАЩЕНИЕ // Большая Медицинская Энциклопедия [сайт] URL: <https://бмэ.орг/index.php/КРОВООБРАЩЕНИЕ> (дата обращения: 29.03.2019).
3. Холодовский, Н. А. М. Мальпиги. Берлин: ГИЗ, 1923. 34 с.
4. Антони ван Левенгук - изобретатель микроскопа // Levenhuk [сайт] URL: [https://www.levenhuk.ru/articles/antony\\_levenhuk/](https://www.levenhuk.ru/articles/antony_levenhuk/) (дата обращения: 29.03.2019).
5. Шванн Т. Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений. М.: АН СССР, 1939. 463 с.
6. Рудольф Вирхов и взаимовлияние наук // Троицкий вариант [сайт] URL: <http://trv-science.ru/2010/08/31/rudolf-virxov-i-vzaimovliyanie-nauk/> (дата обращения: 30.03.2019).
7. Ефремов Ю.М. Исследование механических свойств клеток и структуры цитоскелета методами атомно-силовой микроскопии: дис. ... канд. биологич. наук. М. гос. университет им. М.В. Ломоносова, Биологический фак., Москва, 2014.
8. Azeloglu E.U., Costa K.D. Atomic Force Microscopy in Mechanobiology: Measuring Microelastic Heterogeneity of Living Cells // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 736. P. 303–329.
9. Kollmannsberger P., Fabry B. Active soft glassy rheology of adherent cells // *Soft Matter*. 2009. V. 5(9). P. 1771–1774.
10. Kollmannsberger P., Fabry B. Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells // *Annu. Rev. Mater. Res.* 2011. V. 41(1). P. 75–97.

11. Sollich P. Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials // *Phys. Rev. E*. 1998. V. 58(1). P. 738–759.
12. Cytoskeletal mechanics. Models and measurements. Lim C.T., Zhou E.H., Quek S.T. Mechanical models for living cells-a review // *J. Biomech*. 2006. V. 39(2). P. 195–216.
13. Lim C.T., Zhou E.H., Quek S.T. Mechanical models for living cells--a review // *J. Biomech*. 2006. V. 39(2). P. 195–216.
14. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теория упругости. М.: Наука, 1987. 248 с.
15. Hertz H. Über die Berührung Fester Elastischer Körper // *J. für die reine u. angew. Math*. 1882. V. 92. P. 156–171.
16. Sneddon I.N. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile // *Int. J. Eng. Sci*. 1965. V. 3(1). P. 47–57.
17. Darling E.M., Zauscher S., Guilak F. Viscoelastic properties of zonal articular chondrocytes measured by atomic force microscopy // *Osteoarthritis Cartilage*. 2006. V. 14(6). P. 571–579.
18. Harris A. On Tensegrity in Cell Mechanics // 2011. V. 8(3). P. 195–214.
19. Ingber D. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction // *Annu. Rev. Physiol*. 1997. V. 59. P. 575–599.
20. Treppe X., Lenormand G., Fredberg J.J. Universality in cell mechanics // *Soft Matter*. 2008. V. 4(9). P. 1750–1759.
21. Wolff L., Fernández P., Kroy K. Resolving the stiffening-softening paradox in cell mechanics // *PLoS One*. 2012. V. 7(7). P. e40063.
22. Hansma, H.G. Surface biology of DNA by atomic force microscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem*. 2001. V. 52. P. 71–92.
23. Bischoff, G., Hein, H.-J. (Eds.), 2003. *Micro- and Nanostructures of Biological Systems*, vol. 1. Shaker Verlag, Aachen.
24. Bischoff, G., Hein, H.-J. (Eds.), 2003. *Micro- and Nanostructures of Biological Systems*, vol. 2. Shaker Verlag, Aachen.

25. Bischoff, G., Hein, H.-J. (Eds.), 2003. *Micro- and Nanostructures of Biological Systems*, vol. 3. Shaker Verlag, Aachen.
26. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // *Micron*. 2007. V. 38(8). P. 824–833.
27. Mozafari, M.R., Reed, C.J., Rostron, C., Hasirci, V. A review of scanning probe microscopy investigations of liposome–DNA complexes. *J. Liposome Res.* 2005. V. 15. P. 93–107.
28. Alessandrini, A., Facci, P. AFM: a versatile tool in biophysics. *Meas. Sci. Technol.* 2005. V. 16. P. 65–92.
29. Hertz, H. Ueber den kontakt elastischer koerper. *J. fuer die Reine Angewandte Mathematik*. 1881. V. 92. P. 156.
30. Johnson, K.L., 1985. *Contact Mechanics*. Cambridge University Press, Cambridge.
31. Mahaffy, R.E., Shih, C.K., MacKintosh, F.C., Ka's, J. Scanning probebased frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Phys. Rev. Lett.* 2000. V. 85. P. 880–883.
32. A-Hassan, E., Heinz, W.F., Antonik, M.D., D'Costa, N.P., Nageswaran, S., Schoenenberger, C.-A., Hoh, J.N. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 1998. V. 74. P. 1564–1578.
33. Scheffer, L., Bitler, A., Ben-Jacob, E., Korenstein, R. Atomic force pulling: probing the local elasticity of the cell membrane. *Eur. Biophys. J.* 2001. V. 30. P. 83–90.
34. Timoshenko, S.P., Woinowsky-Krieger, S., 1970. *Theory of Plates and Shells*. McGraw-Hill, New York.
35. Ohashi, T., Ishii, Y., Ishikawa, Y., Matsumoto, T., Sato, M. Experimental and numerical analyses of local mechanical properties measured by atomic force microscopy for sheared endothelial cells. *BioMed. Mater. Eng.* 2002. V. 12. P. 319–327.

36. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005. V. 310. P. 1139–1143.
37. Kung C. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*. 2005. V. 436. P. 647–654.
38. Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J*. 2006. V. 20 P. 811–827.
39. Stopak D, Wessells NK, Harris AK. Morphogenetic Rearrangement of Injected Collagen in Developing Chicken Limb Buds. *Proc Natl Acad Sci*. 1985. V. 82. P. 2804–2808.
40. Addae-Mensah K.A., Wikswo J.P. Measurement techniques for cellular biomechanics in vitro // *Exp. Biol. Med*. 2008. V. 233(7). P. 792–809.
41. Verdier C. et. al. Review: Rheological properties of biological materials // *Comptes Rendus Phys*. 2009. V. 10(8). P. 790–811.
42. Hoffman B.D., Crocker J.C. Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force // *Annu. Rev. Biomed. Eng*. 2009. V. 11. P. 259–288.
43. Kasza K.E. et. al. The cell as a material // *Curr. Opin. Cell Biol*. 2007. V. 19(1). P. 101–107.
44. Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells // *Acta Mater*. 2007. V. 55(12). P. 3989–4014.
45. Hoffman B.D. et. al. The consensus mechanics of cultured mammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006. V. 103(27). P. 10259–10264.
46. Finer JT, Simmons RM, Spudich JA. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. 1994. V. 368. P. 113–119.
47. Bustamante C, Bryant Z, Smith SB. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature*. 2003. V. 421. P. 423–427.
48. Wuite GJL, Smith SB, Young M, Keller D, Bustamante C. Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity. *Nature*. 2000. V. 404. P. 103–106.

49. Righini M., Volpe G., Girard C., Petrov D., Quidant R. Surface plasmon optical tweezers: tunable optical manipulation in the femtonewton range // *Phys. Rev. Lett.* 2008. V. 100(18). P. 186804–1–4.
50. Zhou M., Yang H., Di J., Zhao E. Manipulation on human red blood cells with femtosecond optical tweezers // *Chin. Opt. Lett.* 2008. V. 6. P. 919–921.
51. Ran L., Guo Z., Qu S. Rotation of optically trapped microscopic particles by vortex femtosecond laser // *Chin. Phys. B.* 2012. V. 21. P. 104206–1–4.
52. Li Y., Guo Zh., Qu Sh. Living cell manipulation in a microfluidic device by femtosecond optical tweezers // *Optics and Lasers in Engineering.* 2014. V. 55. P. 150–154.
53. Friedbacher G., Fuchs H. Classification Of Scanning Probe Microscopies (Technical Report) // *Pure Appl. Chem.* 1999. V. 71(7). P. 1337–1357.
54. Meyer E. Scanning probe microscopy and related methods // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2010. V. 1. P. 155–157.
55. Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., Weibel E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy // *Phys. Rev. Lett.* 1982. V. 49(1). P. 57–61.
56. G.Binnig, H.Rohrer - Scanning tunneling microscopy. // *Helv. Phys. Acta.* 1982. V. 55(6). P. 726–735.
57. G.Binnig, H.Rohrer, Ch.Gerber, E.Weibel - Tunneling through a controllable vacuum gap. // *Appl. Phys. Lett.* 1982. V. 40. P. 178.
58. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений. Нижний Новгород: Российская академия наук, Институт физики микроструктур, 2004.
59. Binnig G., Quate C.F., Gerber. Ch. Atomic force microscope // *Phys. Rev. Lett.* 1986. V. 56(9). P. 930–933.
60. Xie X.N., Chung H.J., Sow C.H., Wee A.T.S. Nanoscale materials patterning and engineering by atomic force microscopy nanolithography // *Materials Science and Engineering: R: Reports.* 2006. V. 54(1–2). P. 1–48.

61. ОСНОВЫ РАБОТЫ СКАНИРУЮЩЕГО ЗОНДОВОГО МИКРОСКОПА // НТ-МДТ СИ [сайт] URL: <https://www.ntmdt-si.ru/resources/spm-theory/theoretical-background-of-spm> (дата обращения: 28.04.2019).
62. Butt H.J., Cappella B., Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications // Surface Science Reports. 2005. V. 59(1–6). P. 1–152.
63. Dufrêne Y.F., Martínez-Martín D., Medalsy I., Alsteens D., Müller D. J. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM // Nature Methods. 2013. V. 10(9). P. 847–854.
64. Lee G.U., Kidwell D.A., Colton R.J. Sensing discrete streptavidin biotin interactions with atomic force microscopy // Langmuir. 1994. V. 10. P. 354–357.
65. Radmacher M., Cleveland J.P., Fritz M., Hansma H.G., Hansma P.K. Mapping interaction forces with the atomic force microscope // Biophys. J. 1994. V. 66. P. 2159-2165.
66. Toward Quantitative Nanomechanical Measurements on Live Cells with PeakForce QNM // Bruker Application Note #141. 2013. P. 1–10.
67. Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM // Bruker Application Note #128. 2012. P. 1–12.
68. PeakForce QNM // Bruker [сайт] URL: <https://www.bruker.com/products/surface-and-dimensional-analysis/atomic-force-microscopes/modes/modes/imaging-modes/peakforce-qnm.html> (дата обращения: 25.04.2019).
69. Trickey W. R., G. M. Lee, F. Guilak. Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage // J. Orthop. Res. 2000. V. 18. P. 891–898.
70. Lekka M., Fornal M, Pyka-Fościk G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Styczeń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope // Biorheology. 2005. V. 42(4). P. 307–317.

71. Dulinska I., Targosz M., Strojny W., Lekka M., Czuba P., Balwierz W., Szymonski M. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy // *J. Biochem. Biophys. Meth.* 2006. V. 66. P. 1–11.
72. Efremov Y.M., Lomakina M.E., Bagrov D.V., Makhnovskiy P.I., Alexandrova A.Y., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer transformation // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843(5). P. 1013–1019.
73. Lasalvia M., Castellani S., D'Antonio P., Perna G., Carbone A., Colia A.L., Maffione A.B., Capozzi V., Conese M. Human airway epithelial cells investigated by atomic force microscopy: A hint to cystic fibrosis epithelial pathology // *Exp Cell Res.* 2016. V. 348(1). P. 46–55.
74. Schillers H., Rianna C., Schäpe J., Luque T., Doschke H., Wälte M., Uriarte J.J., Campillo N., Michanetzis G.P.A., Bobrowska J., Dumitru A., Herruzo E.T., Bovio S., Parot P., Galluzzi M., Podestà A., Puricelli L., Scheuring S., Missirlis Y., Garcia R., Odorico M., Teulon J.M., Lafont F., Lekka M., Rico F., Rigato A., Pellequer J.L., Oberleithner H., Navajas D., Radmacher M. Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples // *Sci. Rep.* 2017. V. 7(1). P. 1–9.
75. Fujisawa S., Ohta M., Konishi T., Sugawara Y., Morita S. Difference between the forces measured by an optical lever deflection and by an optical interferometer in an atomic force microscope // *Review of Scientific Instruments.* 1994. V. 65(3). P. 644–647
76. Roa J.J., Oncins G., Diaz J., Sanz F., Segarra M. Calculation of Young's modulus value by means of AFM // *Recent Pat Nanotechnol.* 2011. V. 5(1). P. 27–36.
77. Derjaguin B.V., Muller V.M., Toropov Yu.P. Effect of contact deformations on the adhesion of particles // *J. Colloid. Interface Sci.* 1975. V. 53(2). P. 314–326.
78. Johnson K.L., Kendall K., Roberts A.D. Surface energy and the contact of elastic solids // *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* 1971. V. 324(1558). P. 301–313.



79. Efremov Y.M., Bagrov D.V., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Application of the Johnson-Kendall-Roberts model in AFM-based mechanical measurements on cells and gel // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2015. V. 134. P. 131–139.
80. Bhushan B. (Ed.) *Nanotribology and Nanomechanics. An Introduction*. Germany Berlin: Springer, 2005. 1148 P.
81. Bilodeau G.G. Regular pyramid punch problem // *Journal of Applied Mechanics*. 1992. V. 59(3). P. 519–523.
82. СРАВНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ DMT, JKR, МАУГИСА // НТ-МДТ СИ [сайт] URL: [https://www.ntmdt-si.ru/resources/spm-theory/theoretical-background-of-spm/2-scanning-force-microscopy-\(sfm\)/22-cantilever-sample-force-interaction/227-adhesion-forces/2275-comparison-of-dmt-jkr-and-maugis-models](https://www.ntmdt-si.ru/resources/spm-theory/theoretical-background-of-spm/2-scanning-force-microscopy-(sfm)/22-cantilever-sample-force-interaction/227-adhesion-forces/2275-comparison-of-dmt-jkr-and-maugis-models) (дата обращения: 26.04.2019).
83. Grierson D.S., Flater E.E., Carpick R.W. Accounting for the JKR–DMT transition in adhesion and friction measurements with atomic force microscopy // *J. Adhesion Sci. Technol.* 2005. V. 19(3–5). P. 291–311.
84. Халисов М.М. Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия: дис. ... канд. технич. наук. СПбНИУ ИТМО, С-Пб, 2018.
85. Mozhanova A. A., Nurgazizov N. I., Bukharaev A. A. Local elastic properties of biological materials studied by SFM: SPM-2003. In: *Proceedings*. Nizhni Novgorod, March 2–5. 2003. P. 266-267.
86. Plodinec M., Loparic M., Suetterlin R., Herrmann H., Aebi U., Schoenenberger C.A. The nanomechanical properties of rat fibroblasts are modulated by interfering with the vimentin intermediate filament system // *J. Struct. Biol.* 2011. V. 174(3). P. 476–484.
87. Maciaszek J.L., Andemariam B., Lykotrafitis G. Microelasticity of red blood cells in sickle cell disease // *J. Strain Analysis*. 2011. V. 46. P. 368–379.
88. Rebelo L. M., de Sousa J. S., Santiago T. M., Mendes Filho J. Correlating cell morphology and viscoelasticity to investigate diseases with atomic force

microscopy // *Microscopy: advances in scientific research and education*. 2014. P. 141–152.

89. Radmacher M., Fritz M., Kacher C.M., Cleveland J.P., Hansma P.K. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope // *Biophys. J.* 1996. V. 70(1). P. 556–567.

90. Mahaffy R.E., Park S., Gerde E., Käs J., Shih C.K. Quantitative Analysis of the Viscoelastic Properties of Thin Regions of Fibroblasts Using Atomic Force Microscopy // *Biophys. J.* 2004. V. 86(3). P. 1777–1793.

91. Sit P.S., Kohn J. Interrelationship of micromechanics and morphology of fibroblasts adhered on different polymeric surfaces // *Acta Biomater.* 2009. V. 5(8). P. 2823–2831.

92. Codan B., Del Favero G., Martinelli V., Long C.S., Mestroni L., Sbaizero O. Exploring the elasticity and adhesion behavior of cardiac fibroblasts by atomic force microscopy indentation // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol.* 2014. V. 40. P. 427–434.

93. Hofmann U.G., Rotsch C., Parak W.J., Radmacher M. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope // *J. Struct. Biol.* 1997. V. 119(2). P. 84–91.

94. Alcaraz J., Buscemi L., Grabulosa M., Trepas X., Fabry B., Farré R., Navajas D. Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy // *Biophys. J.* 2003. V. 84(3). P. 2071–2079.

95. Mathur A.B., Collinsworth A.M., Reichert W.M., Kraus W.E., Truskey G.A. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy // *J. Biomech.* 2001. V. 34. P. 1545–1553.

96. Sato H., Kataoka N., Kajiya F., Katano M., Takigawa T., Masuda T. Kinetic study on the elastic change of vascular endothelial cells on collagen matrices by atomic force microscopy // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2004. V. 34(2). P. 141–146.

97. Vargas-Pinto R., Gong H., Vahabikashi A., Johnson M. The effect of the endothelial cell cortex on atomic force microscopy measurements // *Biophys. J.* 2013. V. 105(2). P. 300–309.

98. Domke J., Dannöhl S., Parak W.J., Müller O., Aicher W.K., Radmacher M. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2000. V. 19(4). P. 367–379.
99. Hansen J.C., Lim J.Y., Xu L.C., Siedlecki C.A., Mauger D.T., Donahue H.J. Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblastic cells as determined by atomic force microscopy // *J. Biomech*. 2007. V. 40(13). P. 2865–2871.
100. Kelly G.M., Kilpatrick J.I., van Es M.H., Weafer P.P., Prendergast P.J., Jarvis S.P. Bone cell elasticity and morphology changes during the cell cycle // *J. Biomech*. 2011. V. 44(8). P. 1484–1490.
101. Muthukumar P., Lim C.T., Lee T. Estradiol influences the mechanical properties of human fetal osteoblasts through cytoskeletal changes // *Biochem Biophys Res Commun*. 2012. V. 423(3). P. 503–508.
102. Darling E.M., Zauscher S., Guilak F. Viscoelastic properties of zonal articular chondrocytes measured by atomic force microscopy // *Osteoarthritis Cartilage*. 2006. V. 14(6). P. 571–579.
103. Mustata M., Ritchie K., McNally H.A. Neuronal elasticity as measured by atomic force microscopy // *J. Neurosci. Methods*. 2010. V. 186(1). P. 35–41.
104. Au N.P., Fang Y., Xi N., Lai K.W., Ma C.H. Probing for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in live dorsal root ganglion neurons with atomic force microscopy // *Nanomedicine*. 2014. V. 10(6). P. 1323–1333.
105. Kawakatsu H., Bleuler H., Saito T., Hiroshi K. Dual Optical Levers for Atomic Force Microscopy // *Jpn. J. Appl. Phys*. 1995. V. 34. P. 3400–3402.
106. Kawakatsu H., Saito T. Scanning force microscopy with two optical levers for detection of deformations of the cantilever // *J. Vac. Sci. Technol. B*. 1996. V. 14(2). P. 872–876.
107. Sri Muthu Mrinalini R., Sriramshankar R., Jayanth G.R. Direct Measurement of Three-Dimensional Forces in Atomic Force Microscopy // *IEEE/ASME Transactions On Mechatronics*. 2015. V. 20(5). P. 2184–2193.

108. Interferometric Displacement Sensor Option for the Cypher AFM // Oxford Instruments Asylum Research [сайт] URL: <https://afm.oxinst.com/assets/uploads/products/asylum/documents/Cypher-IDS-Option-DS-March2018.pdf> (дата обращения: 27.04.2019).

109. Jumping probe microscope: patent US5266801 A USA US 08/009,076 ; subm. 26.01.1993; publ. 30.11.1993.

110. Магонов С. Расширение возможностей атомно-силовой микроскопии с помощью метода Hybrid – NT-MDT, Примеры применений 087

111. Rosa-Zeiser A., Weilandt E., Hild S., Marti O. The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: Pulsed-Force mode operation // Meas. Sci. Technol. 1997. V. 8. P. 1333–1338.

112. HYBRID MODE™ — ПРЫЖКОВАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ // НТ-МДТ СИ [сайт] URL: <https://www.ntmdt-si.ru/products/features/hybrid-mode/> (дата обращения: 28.04.2019).

113. JPK Instruments Technical Note “QI mode – Quantitative Imaging with the Nanowizard 3 AFM”, P. 1–7.

114. WITec's Atomic Force Microscope // Witec [сайт] URL: <http://www.witec.de/techniques/afm/> (дата обращения: 27.04.2019).

115. Introduction to Bruker's ScanAsyst and PeakForce Tapping AFM Technology // Bruker Application Note #133. 2011. P. 1–12.

116. Adamcik J., Berquand A., Mezzenga R. Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by Peak Force quantitative nanomechanical atomic force microscopy // Appl. Phys. Lett. 2011. V. 98. P. 193701–193703.

117. Young T.J., Monclus M.A., Burnett T.L., Broughton W.R., Ogin S.L., Smith P.A. The use of the PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping AFM-based method for high-resolution Young's modulus measurement of polymers // Meas. Sci. Technol. 2011. V. 22(12). P. 1–6.

118. Quantitative Imaging of Living Biological Samples by PeakForce QNM Atomic Force Microscopy // Bruker Application Note #135. 2011. P. 1–10.

119. Tittmann B.R., Xi X. Imaging and quantitative data acquisition of biological cell walls with Atomic Force Microscopy and Scanning Acoustic Microscopy // *Microscopy: advances in scientific research and education FORMATEX Microscopy Series*. 2014. V. 1. P. 161–172.

120. Ďurkovič J., Čaňová I., Lagaňa R., Kučerová V., Moravčík M., Priwitzer T., Urban J., Dvořák M., Krajňáková J. Leaf trait dissimilarities between Dutch elm hybrids with a contrasting tolerance to Dutch elm disease // *Ann. Bot.* 2013. V. 111(2). P. 215–227.

121. Slade A., Pittenger B., Milani P., Boudaoud A., Hamant O., Kioschis P., Ponce L.M., Hafner M. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy // *Microscopy and analysis – Scanning probe microscopy supplement*. 2014. P. 6–9.

122. Berquand A., Kuhn H.M., Holloschi A., Mollenhauer J., Kioschis P. Expression of tumor suppressors PTEN and TP53 in isogenic glioblastoma U-251MG cells affects cellular mechanical properties – An AFM-based quantitative investigation // *Proc. 20th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy*. 2013. V. 1. P. 011002–1–8.

123. Tomankova K., Kolar P., Malohlava J., Kolarova H. Mechanical Characterisation of HeLa Cells using Atomic Force Microscopy // *Current microscopy contributions to advances in science and technology FORMATEX Microscopy Series*. 2014. V. 1. P. 549–554.

124. Ando T., Uchihashi T., Kodera N., Yamamoto D., Miyagi A., Taniguchi M., Yamashita H. Highspeed AFM and nano-visualization of biomolecular processes // *Pflugers Arch.* 2008. V. 456(1). P. 211–225.

125. BioScope Catalyst // Bruker [сайт] URL: [https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/SurfaceAnalysis/AFM/Brochures/BioScope\\_Catalyst\\_brochure\\_B069-C0-2.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/SurfaceAnalysis/AFM/Brochures/BioScope_Catalyst_brochure_B069-C0-2.pdf) (дата обращения: 02.05.2019).

126. Ponce L., Berquand A., Petersen M., Hafner M. Combining atomic force microscopy and live cell imaging to study calcium responses in dorsal root ganglion

neurons to a locally applied mechanical stimulus // *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010. P. 530–536.

127. Model 335 Cryogenic Temperature Controller // LakeShore Cryotronics [сайт] URL: <http://www.lakeshore.com/products/cryogenic-temperature-controllers/model-335/Pages/Overview.aspx> (дата обращения: 02.05.2019).

128. Gavara N. A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics // *Microsc. Res. Tech.* 2017. V. 80(1). P. 75–84.

129. Ohler B. Practical Advice on the Determination of Cantilever Spring Constants [Электронный ресурс] // ResearchGate. 2007. URL: [https://www.researchgate.net/publication/242725625\\_Practical\\_Advice\\_on\\_the\\_Determination\\_of\\_Cantilever\\_Spring\\_Constants](https://www.researchgate.net/publication/242725625_Practical_Advice_on_the_Determination_of_Cantilever_Spring_Constants) (дата обращения: 28.02.2017).

130. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций для студентов специальности G 31 01 01 «БИОЛОГИЯ» (направление «БИОТЕХНОЛОГИЯ» G 31 01 01-03). Мн.: БГУ, 2004. 78 С.

131. Spedden E., White J.D., Naumova E.N., Kaplan D.L., Staii C. Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy // *Biophys. J.* 2012. V. 103(5). P. 868–877.

132. Cartagena A., Raman A. Local Viscoelastic Properties of Live Cells Investigated Using Dynamic and Quasi-Static Atomic Force Microscopy Methods // *Biophys. J.* 2014. V. 106(5). P. 1033–1043.

133. Martin M., Benzina O., Szabo V., Végh A.-G., Lucas O., Cloitre T., Scamps F., Gergely C. Morphology and Nanomechanics of Sensory Neurons Growth Cones following Peripheral Nerve Injury // *PLoS One*. 2013. V. 8(2). P. 1–11.

134. Haga H., Sasaki Sh., Kawabata K., Ito E., Ushiki T., Sambongi T. Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton // *Ultramicroscopy*. 2000. V. 82. P. 253–258.

135. Yokokawa M., Takeyasu K., Yoshimura S.H. Mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope measured by scanning probe microscope // *J. Microsc.* 2008. V. 232(1). P. 82–90.

136. Халисов М.М., Тимощук К.И., Анкудинов А.В., Тимошенко Т.Е. Атомно-силовая микроскопия набухания и упрочнения закрепленных на подложке интактных эритроцитов // Журнал технической физики - 2017.

137. Лебедев Д.В., Чукланов А.П., Бухараев А.А., Дружинина О.С. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа // Письма в ЖТФ, 2009, Т. 35. № 8. С. 54–51.

138. PK Instruments Application Note “Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy”, P. 1–9.

139. Measuring Thermal Noise // KTH Royal Institute of Technology [сайт] URL: <http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/icon/bruker-help/Content/Probe%20and%20Sample%20Guide/ThermalTune/MeasuringThermalNoise.htm> (дата обращения: 10.05.2019).

140. Nečas D., Klapetek P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis // Central European Journal of Physics. 2012. V. 10(1). P. 181–188.

141. В.Л. Быков. Цитология и общая гистология: Учебник – М.: Сотис, 2002. – 520 С.

142. Costa K.D., Yin F.C. // J. Biomech. Eng. 1999. V. 121. N 5. P. 462–471.

143. SNL-10 // Bruker AFM Probes [сайт] URL: <https://www.brukerafmprobes.com/Product.aspx?ProductID=3693> (дата обращения: 02.05.2019).

144. DNP-10 // Bruker AFM Probes [сайт] URL: <https://www.brukerafmprobes.com/Product.aspx?ProductID=3254> (дата обращения: 02.05.2019).

145. NITRA-TALL-V-G // AppNano [сайт] URL: <http://www.appnano.com/search-products/NITRA-TALL-V-G> (дата обращения: 02.05.2019).

146. Халисов М.М., Анкудинов А.В., Пеннийнен В.А., Няпшаев И.А., Кипенко А.В., Тимощук К.И., Подзорова С.А., Крылов Б.В. Атомно-силовая

микроскопия устройства поверхностных слоев интактных фибробластов // ПЖТФ. 2017. Т. 43. В. 4. С. 56-63.

147. Анкудинов А.В., Быков В.А., Няпшаев И.А., Шубин А.Б., Сафронова О.В. // Патент RU 2 481 590 С2. 2013. С. 1–9.

148. Ankudinov A.V. Accuracy of probe-sample contact stiffness measurements in an atomic force microscope // Scanning Probe Microscopy. Russia-China Workshop on Dielectric and Ferroelectric Materials. Abstract Book of Joint International Conference. - 2019. - P. 19

149. Sarid D. Exploring scanning probe microscopy with MATHEMATICA. 2nd ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2007. 310 P.

150. ТЕНЗОР ОБРАТНОЙ ЖЕСТКОСТИ КАНТИЛЕВЕРА // НТ-МДТ СИ [сайт] URL: [https://www.ntmdt-si.ru/resources/spm-theory/theoretical-background-of-spm/2-scanning-force-microscopy-\(sfm\)/21-cantilever/215-cantilever-inverse-stiffness-tensor](https://www.ntmdt-si.ru/resources/spm-theory/theoretical-background-of-spm/2-scanning-force-microscopy-(sfm)/21-cantilever/215-cantilever-inverse-stiffness-tensor) (дата обращения: 28.08.2019).

151. Skripov V.P. Metastable Liquids. New York: Wiley, 1974.– 272 P.

152. Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study // C. Rotsch, M. Radmacher - Biophysical Journal. 2000. V. 78. P. 520–535.

153. Eghiaian et al. Structural, Mechanical, and Dynamical Variability of the Actin Cortex in Living Cells // Biophys J. 2015. V. 108(6). P. 1330–1340.

154. Berquand et al. Atomic Force Microscopy Imaging of Living Cells // Microscopy Today. 2010. V. 6(18). P. 8–14.

155. Liu L., Zhang W., Li L., Zhu X., Liu J., Wang X., Song Z., Xu H., Wang Z. // J. Biomech. 2018. V. 67. P. 84-90.

156. Texas Red™-X Phalloidin // ThermoFisher SCIENTIFIC [сайт] URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T7471> (дата обращения: 11.05.2019).

157. DAPI Solution (1 mg/mL) // ThermoFisher SCIENTIFIC [сайт] URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/62248> (дата обращения: 11.05.2019).



158. Jung H.I., Shin I., Park Y.M., Kang K.W., Ha K.S. // Mol. Cells. 1997. V. 7(3). P. 431–437.