

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ахметова Ассель Иосифовна

**Обнаружение, визуализация и анализ вирусов, бактерий и клеток
методами бионаноскопии**

1.1.10 Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
профессор Яминский И.В.

Москва
2022

Оглавление

Сокращения	4
Определения	4
Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	13
1.1 Атомно-силовая микроскопия в исследовании вирусов, бактерий, белков и клеток.....	13
1.2 Сканирующая капиллярная микроскопия	25
1.3 Микролинзовая оптическая микроскопия.....	30
1.4 Пьезокерамические биосенсоры	34
Глава 2 Материалы и методы.....	47
2.1 Атомно-силовая микроскопия	47
2.2 Сканирующая капиллярная микроскопия	48
2.3 Микролинзовая микроскопия	51
2.4 Электромеханическая кантилеверная система	55
Глава 3 Исследование структурных и морфологических особенностей клеток, вирусных и бактериальных частиц	62
3.1 Измерение шероховатости эритроцитов	62
Материалы и методы	62
Результаты	63
Вывод	67
3.2 Измерение кинетики превращения эритроцитов в эхиноциты	68
Материалы и методы исследования.....	68
Результаты	69
Вывод	73

3.3 Влияние лекарственных препаратов на шероховатость клеток Hela ..	74
Материалы и методы исследования.....	74
Результаты	75
Вывод	80
3.4 Морфометрический анализ вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).....	80
Материалы и методы	80
Результаты	81
Вывод	83
3.5 Исследование адсорбции вируса гриппа А	84
Материалы и методы	84
Результаты	86
Вывод	89
3.6 Влияние биоцидных препаратов на морфологию бактериальных клеток.....	90
Материалы и методы	90
Результаты	91
Выводы.....	102
3.7 Биоспецифическое связывание антител на микроальбумин	104
Материалы и методы	104
Вывод	113
Основные результаты и выводы.....	115
Благодарность.....	117
Список литературы	118

Сокращения

FD – Force-Distance (кривая сила-расстояние)

NDV – Newcastle disease virus, вирус болезни Ньюкасла

PEPS – piezoelectric plate sensor

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АЧХ – амплитудно-частотная характеристика

ВОПГ – высокоориентированный пиролитический графит

ИФА – иммуноферментный анализ

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

ОГМГ – олигогексаметиленгуанидин

РАСМ – резонансная атомно-силовая микроскопия

СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия

СКМ – сканирующая капиллярная микроскопия

СТМ – сканирующая туннельная микроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

Определения

Биочип – подложка с нанесённым сенсорным слоем, который может состоять из белков, биомакромолекул или биоструктур, для регистрации биоспецифического связывания с образцом.

Зонд – элемент зондового микроскопа, позволяющий получить информацию об исследуемом объекте: в сканирующем капиллярном микроскопе – капилляр, в атомно-силовом микроскопе – кантилевер.

Морфометрический анализ – это метод вычисления количественных характеристик на основе имеющихся данных микроскопии. В результате анализа появляется не просто топография исследуемой поверхности образца, но и ее количественные показатели.

Введение

Актуальность работы

В данной диссертационной работе под термином бионаноскопия понимается наблюдение биологических объектов с нанометровым пространственным разрешением на воздухе и в жидкости. Исследование наноструктурных, биомеханических и физико-химических свойств биологических объектов с помощью методов зондовой микроскопии открывает большой пласт информации об этих объектах для биоинженерии, биофизики и биомедицины. Механические свойства внешней мембраны играют определяющую роль в жизнедеятельности клетки. Изучение воздействия факторов внешней среды на клетки, вирусы, бактерии и отражение реакции в характеристиках исследуемого объекта может иметь ключевое значение для фармакологии, и будет применимо в разработке эффективных лекарственных средств.

Изучение биологических объектов стало особенно актуальной задачей на сегодняшний день по причине широкого распространения инфекционных заболеваний. Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) позволяет получать уникальную информацию о морфологии и свойствах вирусов, бактерий, клеток, недоступную другими методами, т.к. позволяет проводить измерения в естественной среде без использования дополнительных меток и реагентов. Механические и геометрические свойства, адгезия, склонность к агрегации, способность кристаллизоваться – эти данные можно получать с помощью зондовой микроскопии. Преимущество атомно-силовой микроскопии (АСМ) заключается в возможности исследования живых клеток, бактерий на твердых подложках, исследовать вероятность и характер адсорбции вирусов на различных поверхностях. В этом случае в центре внимания становится фактор влияния подложки на характеристики исследуемых объектов.

Также зондовая микроскопия позволяет получать уникальную информацию о физико-химических и механических свойствах мембраны

клеток и бактерий в естественной среде и под воздействием лекарственных препаратов, оценить характер воздействия лекарственного препарата на цитоскелет, на характер адсорбции на подложке. Помимо этого, возможно получение трехмерного изображения с нанометровой детализацией, составление карт локальных механических свойств поверхности – жесткости, трения, адгезии, износостойкости, сопротивления к разрушению.

Многие биологические процессы, происходящие внутри живых бактерий, зависят от механических свойств самой мембраны. Исследование движения и осцилляции мембраны бактериальных клеток с помощью СЗМ является неинвазивным и не зависит от использования химических красителей, флуоресцентных маркеров или квантовых точек. Скорость и амплитуда движения мембраны отражают активные метаболические процессы, рост, подвижность.

Актуальность научной работы заключается в развитии методов исследования биологических объектов в рамках таких направлений, как биофизика, биомеханика, биоинженерия, биомедицина, диагностика, совершенствование отечественной приборной и методологической базы измерения клеток, вирусов и бактерий.

В данной диссертационной работе были обоснованы новые подходы к решению задач измерения морфологических параметров клеток крови, опухолевых клеток, бактериальных и вирусных частиц, а также разработан электромеханический датчик на базе техники зондовой микроскопии для детектирования биоспецифических взаимодействий биомакромолекул. Особенность данного метода состоит в высокой потенциальной чувствительности и скорости теста без использования дополнительных меток. Это позволяет максимально упростить процедуру пробоподготовки и вести непрерывный мониторинг в режиме реального времени в естественной среде.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на то, что зондовая микроскопия является широко известным методом исследования биологических объектов, ее использование в поиске биофизических и биомедицинских маркеров заболеваний остается актуальной задачей. Наблюдение в режиме реального времени кинетики клеток с нанометровым разрешением в естественной среде без использования меток и реагентов по-прежнему остается нерешенным вопросом. Создание чувствительных и простых биосенсоров, которые могли бы детектировать мишени неинвазивно – активно развивающаяся тема, но все еще не получившая подтвержденного и широко используемого результата [A15, A19].

Объект и предмет исследований

Объекты исследований – эритроциты, опухолевые клетки, вирус гриппа А, вирус клещевого энцефалита, бактерии *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria flavescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, антитела на микроальбумин. Предмет исследования – разработка методики измерения биологических объектов с помощью зондовой микроскопии и инструментария пьезокерамических биосенсоров для целей биофизики и биомедицины.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология проведенного исследования опирается на использование биофизических методов и подходов к характеристике биологических объектов, а также на современные способы их визуализации. Методы исследований – сканирующая зондовая микроскопия, сканирующая капиллярная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, микролинзовая оптическая микроскопия, иммуноферментный анализ, инструментарий пьезокерамических биосенсоров.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка количественного морфологического описания биологических объектов: клеток, вирусов и бактерий, определение

структурных изменений, в том числе при воздействии лекарственных препаратов. Определение характера биоспецифического связывания биологических объектов с помощью пьезокерамического сенсора.

Для достижения указанной цели необходимо решение следующих задач:

- сравнительная характеристика морфологических характеристик эритроцитов, полученных с помощью зондовой, капиллярной, микролинзовой оптической микроскопии,
- исследование морфологических и структурных особенностей опухолевых клеток при воздействии лекарственных препаратов с помощью сканирующей капиллярной микроскопии,
- исследование морфологических и структурных особенностей вируса гриппа, вируса клещевого энцефалита методами зондовой и просвечивающей электронной микроскопии,
- визуализация бактериальных и грибковых клеток, определение характерных морфологических и структурных изменений образцов при воздействии биоцидных препаратов,
- разработка методики проверки активности и специфичности антител в жидкости по изменению характера колебаний пьезокерамического биочипа. Определение оптимальных условий для обнаружения белковых мишеней по изменению резонансной частоты колебаний биочипа.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны подходы, позволившие оценить кинетические особенности трансформации эритроцитов в эхиноциты, которые являются важным параметром в исследованиях крови и поиске новых маркеров заболеваний.
2. Предложена методика оценки эффективности противоопухолевых и биоцидных препаратов.

3. Разработана методика анализа поведения вирусных частиц при адсорбции на различных поверхностях для оценки биоспецифического связывания при разработке сенсоров.
4. Предложены подходы для исследования биоспецифического связывания белков, антител и других биологических объектов на основе измерения сдвига резонансной частоты пьезокерамического биосенсора.

Научная новизна работы

Впервые измерена кинетика трансформации эритроцита в эхиноцит с нанометровым пространственным разрешением с помощью микролинзовой микроскопии, оценены механические свойства клеток крови по данным АСМ и СКМ.

Впервые с помощью капиллярной микроскопии определено изменение шероховатости опухолевых клеток при воздействии противораковых препаратов цисплатин и нокодазол.

Впервые получены экспериментальные данные о влиянии биоцидного препарата ОГМГ на морфологию, агрегацию и структурные изменения бактериальных и грибковых клеток.

Подтверждена селективная адсорбция вируса гриппа А на подложках из кремния, модифицированного аптамером.

Разработана и апробирована методика определения активности антител с помощью пьезокерамического биочипа по регистрации изменения резонансной частоты в жидкости с целью создания функциональных сенсорных слоев.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в разработке методов исследования биологических объектов, основанных на технике сканирующей зондовой микроскопии и пьезокерамических биочипов.

Результаты диссертации позволяют продвинуться в решении следующих задач:

- Определение влияния лекарственных препаратов на опухолевые, бактериальные и грибковые клетки.
- Апробация действия антибактериальных лекарственных препаратов с использованием методов СЗМ *in situ*.
- Характеризация вирусных частиц для разработки сенсоров и создания морфометрического атласа.
- Детекция биоспецифического связывания биологических объектов в жидкости с помощью пьезокерамического биосенсора.

Практическая значимость работы

В настоящей диссертации представлены новые экспериментальные данные по измерениям морфологических характеристик клеток, вирусных и бактериальных частиц с использованием сканирующей зондовой и микролинзовой микроскопии. Для определения биоспецифического связывания антител предлагается использовать электромеханическую систему на основе пьезокерамических дисков. Преимущество метода заключается в высокой чувствительности, небольших размерах сенсора. Для этого впервые предложено использовать продольную моду колебаний пьезокерамического кантилевера симметричной конфигурации, не используя подачу электрического сигнала на внешние электроды. В результате этого достигается как высокая механическая добротность колебаний кантилевера, так и исключается наличие посторонних электрокинетических процессов в растворах вблизи поверхности биочипа, что, в конечном итоге, повышает чувствительность и избирательность метода.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов следует из корректности постановки научных задач. Полученные теоретические расчеты согласуются с экспериментальными данными. Высокая степень достоверности определяется

использованием проверенных методов исследования, в числе которых просвечивающая электронная, оптическая, сканирующая зондовая и атомно-силовая микроскопии, иммуноферментный анализ.

Личный вклад автора

Все экспериментальные измерения, подготовка образцов и исследования с помощью зондовой микроскопии проводились автором лично. Автор принимал активное участие в постановке научных задач, разработке методики исследований, анализе полученных данных и описании результатов [A1, A9]. Автор лично провел все эксперименты с применением атомно-силовой и оптической микроскопии и кантилеверной системы [A2-A8]. Автором была проведена значительная работа над текстом статей, а также подготовлено представление их в редакции журналов, осуществлена переписка с редакторами и рецензентами [A2, A10, A15, A19]. Автором лично проанализированы и интерпретированы экспериментальные данные АСМ, СКМ, ПЭМ, обобщены результаты и выявлены факторы, влияющие на массу, структуру и изменение поверхностных напряжений в пьезокерамическом биочипе [A11-A15]. Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим [A16-A18, M1].

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 8 международных и российских научных конференциях (тезисы – 8, доклады – 8).

Внедрение результатов работы

По результатам работы получены 3 российских патента на изобретение. Результаты работы были использованы при выполнении проекта Российского фонда фундаментальных исследований №21-58-10005 «Новое решение для бионаноскопии, основанное на интеграции матричной технологии оптических суперлинз и методов сканирующей зондовой микроскопии».

Публикации

Всего опубликовано 99 статей. По теме диссертации опубликовано всего 20 статей, из них 19 статей в научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ, 1 статья в сборнике, индексируемом в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 глав, содержащих обзор литературных данных, методы и объекты исследования, изложение и обсуждение полученных автором результатов, основных результатов и выводов, списка цитируемой литературы и списка публикаций автора. Работа изложена на 140 страницах, включает 10 таблиц и 65 рисунков. Список литературы включает 185 наименований.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Атомно-силовая микроскопия в исследовании вирусов, бактерий, белков и клеток

Зондовая микроскопия (СЗМ) — это семейство методов, которое включает атомно-силовую, капиллярную (ион-проводящую) резистивную, электрохимическую и другие методики. Атомно-силовая микроскопия — это уникальный метод, который позволяет визуализировать биологические молекулы в их естественной среде на молекулярном уровне, а в некоторых случаях даже позволяет исследователям проводить эксперименты *in situ* для наблюдения динамической биологической активности с высоким разрешением. Этот метод не требует нанесения меток на образец, а полученные изображения имеют дополнительное преимущество по сравнению с другими методами исследований, так как они трехмерны. Еще одним преимуществом атомно-силовой микроскопии является возможность исследования живых клеток, бактерий на различных подложках, исследовать возможность адсорбции вирусов на различных подложках. В биомедицинской микроскопии измерения проводятся на живых бактериях и клетках в естественной среде, где атомно-силовая микроскопия имеет преимущество.

АСМ в отличие от других методов исследований позволяет увидеть, как выглядит в трех измерениях конкретная вирусная или бактериальная частица, вывить ее общую архитектуру, определить, насколько частицы похожи друг на друга. Одинаковы ли они по внешнему виду или представлены в разных формах, как они укладываются в агрегаты: отдельными частицами или большими популяциями. Атомно-силовая микроскопия имеет большой потенциал в исследованиях вирусов и бактерий, понимании природы существования патогенов и их хозяев.

Накопленные в последнее время с помощью АСМ экспериментальные данные позволили выявить взаимосвязи между отклонениями в размерах,

форме, упругости эритроцитов, наличии структурных особенности на их поверхности и рядом сопутствующих заболеваний.

Микроскопическое исследование мазка периферической крови остается важнейшим инструментом диагностики, несмотря на быстрое развитие автоматических анализаторов клеток крови. Отклонения в размерах, форме, цвете эритроцитов и наличия в них включений тщательно каталогизированы для оптической микроскопии [1]. Анализ мазка крови используют для дифференциальной диагностики анемий, тромбоцитопений, обнаружения лейкоцитов и лимфоцитов, а также для быстрого выявления ряда инфекций [2].

В тоже время предельный размер морфологических особенностей, который можно наблюдать с помощью обычных оптических микроскопов, ограничен дифракционным пределом. Применение микролинз в оптической микроскопии позволяет повысить разрешение до ~50 нм [3, 4]. Нанометровое разрешение может быть достигнуто в атомно-силовой микроскопии.

В настоящее время данные, полученные методами АСМ при исследовании клеток крови, начинают использовать в практической медицине. Ведутся исследования по поиску физических биомаркеров – топографических особенностей эритроцитов, которые могут быть использованы в диагностических целях. В качестве примеров рассматривается взаимосвязь между структурными особенностями эритроцитов и наличием и стадией нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) у доноров. НДЗ порождают проблемы с движением, вызывают когнитивные нарушения, деменцию. Часто патологические процессы в организме запускаются задолго до появления первых симптомов, и важно это время использовать для замедления прогресса заболевания.

В работе [5] изучались эритроциты здоровых доноров и больных НДЗ (боковым амиотрофическим склерозом, болезнью Альцгеймера и Паркинсона). Авторы пришли к выводу, что у больных доноров количество эритроцитов нормальной формы уменьшается, а в случае болезни Паркинсона

доминирующей становится зубчатая форма. Диаметр, объём и жесткость мембран эритроцитов повышается, а шероховатость поверхности уменьшается для клеток доноров с НДЗ по сравнению с клетками здоровых доноров.

В исследовании [6] изучалась поверхность эритроцитов для 50 пациентов с болезнью Альцгеймера и 16 здоровых доноров. С помощью АСМ визуализировались белковые агрегаты на поверхности клеток: классифицировались их размеры, форма, морфология и особенности агрегации. Было обнаружено, что только для эритроцитов больных и пожилых доноров в возрасте более 80 лет характерны кристаллы, состоящие из фибрилл. Преобладание фибриллярных белковых агрегатов наблюдалось для поверхности эритроцитов доноров с выраженным дефицитом неврологических функций.

В работе [7] исследовались эритроциты женщин, пострадавших от выкидышей на ранней стадии беременности, их клетки отличаются как по величине шероховатости, так и по модулю Юнга по сравнению со значениями для небеременных и здоровых беременных. Более того, была обнаружена тенденция к снижению морфометрических параметров клеток (размера клеток и шероховатости поверхности) и эластичности мембраны — гораздо быстрее для опытной группы, чем для двух контрольных групп. Ускоренное старение эритроцитов выражается в более быстром преобразовании морфологической формы и более раннем появлении клеток спиккулярной и шаровидной формы, уменьшении шероховатости и эластичности мембраны с возрастной эволюцией. Окислительный стресс *in vitro* способствовал морфологическим изменениям клеток, наблюдаемым для стареющих эритроцитов женщин с выкидышами на ранней стадии.

Также атомно-силовая микроскопия может обнаружить особенность и характер агрегации частиц на различных поверхностях и в разных условиях. Большинство исследований показали, что агрегация вирусных частиц и

бактериальных клеток увеличивает их выживаемость в окружающей среде и устойчивость к дезинфицирующим средствам [8, 9, 10]. Агрегация – это важный параметр, который позволяет как вирусным, так и бактериальным частицам преодолевать плохие условия среды. Без наличия реальных экспериментальных данных трудно предсказать поведение любого отдельного вируса или бактерии в заданном наборе условий окружающей среды. Агрегацией, например, объясняется неспособность антител нейтрализовать вирусы в суспензии и устойчивость популяций бактерий к дезинфицирующим средствам. Агрегирование отдельных вирионов в суспензии может быть вызвано изменениями pH, концентрации соли, типа и уровня содержания катионов, природного органического вещества и полиэлектролитов [11]. Известно, что вирионы агломерируют из-за изменений в условиях окружающей среды, например, при высвобождении вирусных частиц из клеток. Агрегация-деагрегация вирусов – сложный процесс, и некоторые исследования показали, что вирионы имеют тенденцию к агломерации, чтобы увеличить свою эффективную биологическую жизнь в различных условиях окружающей среды [12]. Вполне возможно, что образование агрегатных структур вирионов может привести к значительному увеличению передачи вирулентности, а также к продлению их жизни, действуя как защитный барьер от антивирусных элементов окружающей среды. Также возможно, что большая агрегация вирионов может быть связана с более высокой вирусной нагрузкой на клетку-хозяина.

Атомно-силовая микроскопия использовалась для характеристики ультраструктуры коронавируса [13], а в параллельном исследовании Kiss *et al.* [14] авторы охарактеризовали вирус SARS-CoV-2 в различных средах с использованием атомно-силовой микроскопии. Они получили топографическую структурную информацию с высоким разрешением и данные о термочувствительности и наномеханической динамике SARS-CoV-2. Путем визуализации и механического манипулирования отдельными

природными вирионами SARS-CoV-2 с помощью атомно-силовой микроскопии Kiss с коллегами показали, что поверхность вирионов похожа на динамичную щетку из-за гибкости и подвижности шипов, вирионы обладают высокой податливостью и способны восстанавливаться после резких механических воздействий, а их общая структура удивительно устойчива к температуре, но поверхность вириона постепенно очищается от шипов при тепловом воздействии.

В работе [15] исследовали плотность упаковки и агрегацию вирусных частиц на различных подложках – покровном стекле и полистироле для культур тканей. Было обнаружено, что распределение вирионов на поверхности полистирола становится более плотным и однородным по сравнению со случаем подложки из стекла. К тому же плотность вирионов на полистироле была примерно в 4 раза выше по сравнению с поверхностью стекла. Осаждение вирионов на обеих поверхностях показало эффект кофейного кольца, было отмечено увеличение градиента распределения вирионов от центра капли к краям и плотноупакованное распределение вирионов вблизи «кофейного» кольца. Высота вирионов SARS-CoV-2 на стекле и полистироле составила от 42 до 47 нм и от 62 до 67 нм соответственно. Также в работе визуально продемонстрировали, что воздействие на вирионы 80% этилового спирта инактивирует вирусные частицы, разрывая их защитную сферическую липидную бислойную оболочку.

Процесс начального этапа инфицирования клетки представляет особый интерес. В работе [16] был визуализирован рецепторный слой на поверхности клеток в процессе связывания вируса в пределах первой миллисекунды контакта с высоким разрешением (<50 нм). В режиме силовой спектроскопии АСМ показывает взаимодействия отдельных пептидов, белков и живых клеток [17].

Анализ силовых кривых позволяет получить данные о механических свойствах биологического образца, касающихся адгезии, жесткости, деформации, модуля упругости и рассеяния энергии. Модификация поверхности кантилевера позволяет обнаруживать специфические биохимические взаимодействия [18].

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и АСМ позволяют успешно визуализировать единичные вирусные частицы. При этом различные приемы по контрастированию дают возможность видеть в ПЭМ структурные элементы оболочки вируса. Оба эти метода взаимно дополняют друг друга при исследовании вирусных частиц.

При исследовании бактерий зондовая микроскопия дает важную информацию о внешней структуре оболочки. АСМ использовалась для изучения процесса заражения бактериальных клеток бактериофагами [19], в зависимости от фазы литического цикла на изображениях инфицированных клеток наблюдаются различные изменения клеточной поверхности: от адсорбции фага на клетках и жгутиках до полного лизиса клеток, сопровождающегося высвобождением большого количества новообразованных фагов.

В работе [20] изучалось влияние бактериофага AP 22 на *A. baumannii*. Было установлено, что увеличение шероховатости инфицированных бактериальных клеток напрямую связано с адсорбцией фагов на поверхности клеток и повреждением клеточной стенки.

АСМ дает возможность не только визуализировать клетки в естественной среде, но и оценивать в режиме реального времени отклик клетки на воздействие лекарственного препарата. В частности, используя антибиотики, можно не только подтвердить резистентность бактерии к лекарству, но и оценить влияние лекарственного препарата на популяцию клеток, на структурные изменения, последовавшие за воздействием препаратом [21]. В работе [22] исследовались флуктуации (нанодвижения)

трех различных линий раковых клеток человека и их аналогов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) путем прикрепления клеток на кантилевер. Чувствительные к воздействию препарата клетки погибли в течение двух часов, в то время как клетки с МЛУ продемонстрировали усиление сигнала. Метод планируется использовать для скрининга воздействия лекарственных препаратов на конкретные раковые клетки, полученные из опухоли пациента, и разрабатывать индивидуальную стратегию лечения.

Получение новых данных о морфологии клеточных стенок, об особенностях осаждения и формирования биопленок на поверхности подложки, изучение реакции со стороны микроорганизмов на разнообразные факторы внешней среды позволяет судить о процессах внутри клеток и об их состоянии.

Биопленка – это множество клеток бактерий (грибов и/или простейших), окруженных матриксом из внеклеточных полимерных веществ, производимых самими клетками, и прикрепленных к поверхности. 99% бактерий на земле живут в биопленках. Процесс формирования биопленки на поверхности подложки является немаловажной составляющей выживаемости бактерий и грибов в среде [23]. Образование биопленок включает несколько стадий. Первичное (обратимое) прикрепление бактерий к поверхности. Обычно поверхности оказываются заряженными, что способствует адсорбции различных неорганических ионов и заряженных органических молекул, белков. Как правило, у поверхности скорость течения жидкости минимальна. Эти факторы создают благоприятные условия для адгезии бактерий к поверхности. В этом процессе важную роль играют силы электростатического, гидрофобного взаимодействия и Ван-дер-Ваальсова притяжения. Затем бактериальные клетки начинают делиться, образуя микроколонии и производя внеклеточный матрикс, состоящий из белков и полисахаридов. Благодаря “чувству кворума” (общение

и координация поведения микроорганизмов за счет секреции молекулярных сигналов) дальнейшее развитие микроколоний приводит к образованию макроколоний, разделенных жидкостными каналами и окруженных внеклеточным матриксом. Микроорганизмы необратимо связываются с поверхностью и начинается созревание биопленки. Развитие каналов внутри пленки позволяет воде и питательным веществам достигать клеток, расположенных внутри биопленки. Архитектура биопленки зависит от многих факторов, таких как доступность питательных веществ, свойств поверхности, состава микроорганизмов, наличия сдвиговых сил. Наиболее представительная структура биопленки предполагает образование грибовидных агрегатов, разделенных каналами с жидкостью. Зрелая биопленка может периодически выбрасывать отдельные клетки в окружающую среду, тем самым обеспечивая возможность формирования новых биопленок на других поверхностях. В настоящее время считается, что биопленка состоит на 10-50% по объему из бактериальных клеток. Биопленка может включать в свой состав полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, жиры и гуминовые вещества.

На процесс образование биопленки оказывают влияние многие факторы [24]:

1. Текстура, гидрофобность, заряд, химическое строение поверхности, наличие адсорбатов;
2. Температура, pH, ионная сила, скорость потока, содержание питательных веществ в окружающей среде;
3. Химический состав поверхности клеток бактерий, их гидрофобность, наличие фимбрий и жгутиков, состав выделяемого внеклеточного матрикса и выраженность “чувства кворума”.

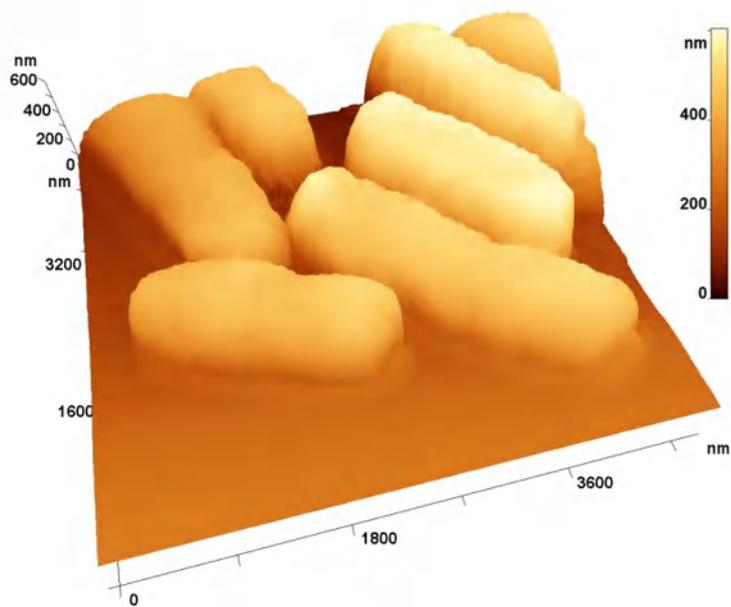
Большинство природных и искусственно созданных биопленок являются полимикробными. Бактерии в биопленках оказываются более устойчивыми к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, чем свободно

плавающие бактерии. Различные методы сканирующей зондовой микроскопии активно используются для исследования биопленок. АСМ – важный инструмент для изучения адгезии бактериальных клеток к поверхности [25]. АСМ с проводящим зондом позволила выявить электропроводящие пилы у *Geobacter sulfurreducens* [26]. *Pseudomonas aeruginosa* благодаря сигнальным молекулам, формирующим чувство кворума, могут принимать общие решения для приспособления к особенностям среды и собственной защиты [27].

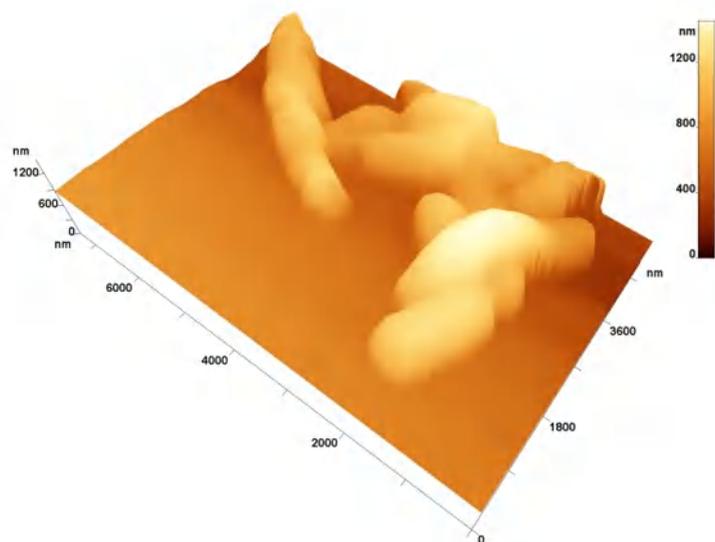
Методы сканирующей зондовой микроскопии позволяют в реальном времени без использования флуоресцентных меток в нативных условиях исследовать формирование биопленок с высоким пространственным разрешением. К тому же АСМ позволяет не только визуализировать объекты, но и собирать важную информацию о морфологическом и геометрическом состоянии объектов, в частности:

- измерять периметр, объем, площадь, строить контурную линию или измерять протяженность выростов и пилей,
- измерять шероховатость поверхности бактерии: среднее отклонение шероховатости профиля от базовой линии или среднюю квадратичную шероховатость поверхности клетки.

При исследовании с помощью атомно-силовой микроскопии влияния дезинфектанта ОГМГ на кишечную палочку было показано биоцидное воздействие на бактерию (Рисунок 1) [28].



а)



б)

Рисунок 1. 3d-изображение кишечной палочки, полученное в контактном режиме атомно-силовой микроскопии: а – контрольное изображение, б – после воздействия ОГМГ [29].

Особенно интересно использование атомно-силовой микроскопии для раковой диагностики. Изучение морфологических и биофизических изменений в раковых клетках, обработанных противоопухолевыми препаратами, может помочь в оценке противоопухолевой активности

препарата [30]. Это было предложено отчасти потому, что антимикротрубочковые препараты влияют на форму и физические свойства клетки, такие как шероховатость и жесткость, которые связаны с клеточными функциями адгезии, подвижности, трансформации и инвазии.

В работе [31] рассматривается апоптоз раковых клеток, который связывают с изменениями важных клеточных свойств, включая морфологию, шероховатость и жесткость поверхности. В этом исследовании изучалось влияние лекарственного препарата паклитаксела на свойства клеток Исикавы и HeLa с помощью атомно-силовой микроскопии, и обсуждалась взаимосвязь между изменениями морфологии, биофизических свойств и апоптозом. Наблюдения с помощью АСМ ясно показали апоптотические морфологические и биофизические изменения в клетках Исикавы и HeLa: после обработки лекарственным препаратом клеточная мембрана рвалась, образовывались дыры, шероховатость поверхности увеличивалась, а жесткость уменьшалась. Таким образом, изменения морфологии и биофизических свойств могут быть хорошим способом оценки противоопухолевой активности лекарственного средства.

С помощью АСМ было показано, что раковые клетки яичников, как правило, мягче и демонстрируют более низкую внутреннюю вариабельность жесткости клеток, чем незлокачественные эпителиальные клетки яичников [32]. Жесткость клеток может быть полезным биомаркером для оценки относительного метастатического потенциала раковых клеток яичников и, возможно, других типов раковых клеток.

АСМ показала, что раковые клетки MCF-7 менее жесткие и легче деформируются, чем незлокачественные клетки MCF-10A, что происходит из-за изменений субклеточных структур [33]. Клетка MCF-10A имеет хорошо выровненные филаментозные структуры под мембраной, предположительно, являющиеся актиновыми стрессовыми волокнами, поскольку актиновая

структура является основным компонентом цитоскелета, который локализуется под клеточной мембраной.

С помощью микроскопии в белом свете не удалось обнаружить существенных различий в морфологии поверхности лейкоцитов в клетках больных хроническим лейкозом и здоровых людей. Однако наблюдения обеих линий клеток с помощью АСМ показали, что на поверхности лейкоцитов у больных лейкемией появляется большое количество игольчатых структур, а шероховатость поверхности клеток также значительно выше, чем у нормальных лейкоцитов [34].

Ханекар и др. исследовали взаимосвязь между экспрессией SMAR1 и шероховатостью клеточной поверхности с помощью АСМ в тканях молочной железы человека с различной степенью поражения раком [35]. Таким образом, можно наблюдать ультраструктуру поверхности мембран различных типов опухолей и анализировать их общие характеристики, выявить значительные различия в морфологии клеточной мембраны между нормальными клетками и опухолевыми клетками и определить, являются ли клетки злокачественными по сравнению с опухолевыми клетками из того же источника.

АСМ показала, что жесткость клеток рака толстой кишки увеличивалась с более высокой экспрессией CDX2, а клеточная изменчивость снижалась, что уменьшало способность клеток к переносу во внеклеточный матрикс и капилляры [36]. Метастазирование в регионарные лимфатические узлы является одним из важных показателей злокачественной меланомы кожи. Считается, что новообразованные лимфатические сосуды обеспечивают путь, по которому опухолевые клетки могут мигрировать в лимфатические узлы. Считается, что фактор роста эндотелия сосудов D (VEGF-D) и фактор роста эндотелия сосудов C (VEGF-C) участвуют в формировании лимфатических и кровеносных сосудов [37, 38]. После трансфекции рекомбинантной плазмиды, содержащей VEGF-D, в клетки рака легкого АСМ-исследование показало,

что на поверхности клеток появляются нерегулярные микрошипы и нанокластеры, и клетки становятся более жесткими.

Механическая прочность клеток играет важную роль в гомеостазе тканей, клеточном росте, делении, миграции и эпителиально-мезенхимальном переходе [39]. Многочисленные исследования показали, что существуют различия в жесткости нормальных и раковых клеток, а также между первичными и метастатическими раковыми клетками. Кросс и др. изучили клетки пациентов с подозрением на метастатическую аденокарциному (рак легкого, молочной железы и поджелудочной железы) с помощью АСМ. Исследования показали, что, даже если доброкачественные и злокачественные клетки похожи по форме и поэтому их трудно различить при визуальном осмотре, их все же можно идентифицировать с помощью анализа механических свойств [40, 41]. Кроме того, научная группа Кросса также сообщила о биомеханических различиях между мезотелиальными опухолевыми клетками человека и нормальными клетками [42].

1.2 Сканирующая капиллярная микроскопия

Сканирующая капиллярная микроскопия (СКМ, или сканирующая ион-проводящая микроскопия) относится к семейству зондовой микроскопии. Первая публикация о данном методе вышла в 1989 году [43]. Статья П.Хансма, Б.Дрейка и О.Марти в журнале Science "Сканирующий ион-проводящий микроскоп" заложила основу для развития нового направления в микроскопии. Сканирующий ион-проводящий микроскоп был разработан для отображения топографии поверхностей в электролите. Зондом микроскопа является заполненный электролитом капилляр. Поток ионов через отверстие капилляра уменьшается на небольшом расстоянии от поверхности. Механизм обратной связи может использоваться для поддержания заданной проводимости с одновременным определением расстояния до поверхности. В статье также была высказана мысль, что ион проводящий микроскоп может

отображать не только топографию, но и локальные ионные токи через поры на поверхности.

Хансма с коллегами предложили совмещенный атомно-силовой и ион-проводящий микроскоп. Конструкция основана на использовании изогнутой стеклянной пипетки, которая действует как датчики силы и проводимости. Измерение отклонения пипетки позволило получить более стабильную обратную связь, чем в предыдущих версиях ион-проводящего микроскопа. С помощью комбинированного микроскопа были исследованы синтетические мембраны в режимах контакта и тэппинга в жидкости. Пипетки были изготовлены из боросиликатного стекла или кварцевых капиллярных трубок. Хотя боросиликатное стекло оказалось удобным и простым в обращении, Хансма и его коллеги получили наивысшее разрешение и высокую воспроизводимость, используя вытянутые кварцевые трубки (Nanonics, Израиль) [44].

Проф. Корчев с коллегами также работали со сканирующей ион-проводящей микроскопией живых клеток, которая позволяет изучать топографию, не повреждая образец. Изображения напоминают снимки, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии, с существенной разницей в том, что клетки остаются жизнеспособными и активными [45].

В работе [46] были проведены опыты с меланоцитами мышей, которые показали, что СКМ наиболее подходит для визуализации образцов, погруженных в водные растворы. Поскольку зонд измеряет ионный ток без физического контакта с образцом во время сканирования, то не требуется предварительная подготовка клеток (фиксация на подложке).

СКМ состоит из четырех основных компонентов: ионно-чувствительного стеклянного зонда (капилляр), заполненного электролитом; сканирующей пьезоэлектрической системы; специализированного электронно-измерительного оборудования, включающего систему обратной

связи; цифровой электроники и компьютера, который обеспечивает пользовательский интерфейс для микроскопа, управление системой, а также позволяет выполнять обработку полученных данных. Уже тогда предсказывалось, что СКМ потенциально может быть применима для исследований в реальном времени в электрофизиологии, при проведении микроманипуляций и доставки лекарств.

В [47] показано, что ион-проводящий микроскоп может измерять изменения в объеме клеток в диапазоне от 10^{-19} до 10^{-9} литра.

В [48] представлен гибрид СКМ и сканирующей ближнепольной оптической микроскопии. Этот метод позволяет выполнять количественный анализ поверхности ячейки с высоким разрешением и проводить одновременную запись топографических и оптических изображений.

В работе [49] проведено сравнение сканирующей капиллярной и атомно-силовой микроскопии. В качестве модельных образцов для сравнения возможностей АСМ- и СКМ-визуализации использовались микроворсинки живых клеток А6. Качество АСМ-изображений значительно улучшилось после фиксации клеток, в то время как на СКМ-снимках качество не зависело от фиксации клеток. В АСМ измеренная высота и ширина целых клеток зависели от значения силы, в то время как в СКМ они были постоянными в пределах большого диапазона заданных значений. Таким образом, было показано, что получение точной топографии живых клеток в АСМ возможно только с использованием режима силового картирования, который, помимо определения механических свойств образца, обеспечивает изображение "нулевой силы" или "высоты контакта". Однако скорость формирования изображения в жидкости обычно ограничена несколькими пикселями в секунду, что требует достаточно много времени для его получения с необходимым разрешением.

В статье [50] подробно описаны три распространенных метода обратной связи в СКМ: постоянного тока (dc), переменного тока (ac) и прыжковый

режим. Разрешение в СКМ определяется геометрией кончика капилляра и расстоянием между зондом и образцом. Типичное значение достигаемого разрешения составляет около 10 нм по вертикали и около 50 нм в поперечном направлении [51]. Наилучшее разрешение (3–6 нм) было получено при визуализации белков S-слоя из *Bacillus sphaericus* на поверхности слюды с капилляром диаметром 13 нм [52].

В [53] использовали прыжковый режим капиллярной микроскопии, позволяющий регулировать угол, под которым капилляр приближается к клетке. Угол может быть отрегулирован в диапазоне 0–90° к поверхности.

В дополнение к наблюдению топографии с высоким разрешением СКМ может выполнять многофункциональный анализ живых клеток, включая морфологические трансформации, вызванные физиологическими воздействиями, идентификацию внутриклеточных сигнальных путей и определение характеристик механических ответов, что демонстрирует универсальность метода [54].

С помощью СКМ были исследованы желудочковые миоциты, полученные из ткани сердец [55], подвергшихся длительной механической разгрузке [56] или рассечению, вызванному осмотическим шоком [57]. Во всех этих случаях СКМ выявила очевидные изменения в структуре поверхности по сравнению с изображениями миоцитов здоровой ткани.

В работе [58] продемонстрирована возможность использования капилляра как датчика pH. Таким образом, капилляр может выступать в качестве средства доставки лекарств, электрохимического сенсора, биосенсора pH, тест-системы для обнаружения ионов металлов и много другого [59]. Капилляры с двумя или несколькими каналами дают также возможность реализовать направленный массоперенос веществ, биомакромолекул (пептидов, белков, нуклеиновых кислот и пр.) на поверхность биообъектов или внутрь их объема [60]. В работе [61] с помощью СКМ наблюдались эритроциты, и анализ полученных результатов

показал, что среднеквадратичная шероховатость их поверхности составила 20 нм [62].

В работе [63] с помощью капиллярной микроскопии исследовались хромосомы мунтжака и клетки Hela в качестве контрольных образцов. Интересно, что, прикладывая отрицательный потенциал к капилляру, не удавалось визуализировать структуру хромосомы, при этом клетки Hela были отчетливо видны и при отрицательном, и при положительном потенциале на электроде капилляра.

Для длительных исследований живых клеток капиллярную микроскопию интегрировали с инкубатором для поддержания необходимых условий [64]. Благодаря этому удалось получить серию снимков изменения морфологии живых клеток в динамике с нанометровым разрешением и продолжительностью от нескольких секунд до дней. Были визуализированы различные процессы: эндоцитоз, микропиноцитоз, митоз, бактериальное инфицирование клетки и дифференцировка в раковых клетках. СКМ позволяет исследовать изменения, происходящие на поверхности мембраны, и межклеточные взаимодействия в случаях возникновения инфекций и раковых заболеваний.

СКМ успешно используется для исследования механических реакций живых клеток, например, для оценки объема живых эндотелиальных клеток под влиянием гемодинамического сдвигового напряжения в кровеносных сосудах [65] и для оценки жёсткости плазматической мембраны при приложенном гидростатическом давлении [66].

Использование капилляра в качестве резервуара имеет потенциальное применение для доставки определённых молекул и терапевтических средств в конкретную клетку или субклеточную область. В этом отношении двухканальные капилляры уже использовались для доставки микрочастиц [67] и полимеров [68] в живые клетки корней растений.

В работе [69] представлена методика изготовления углеродных нанозлектродов для внутриклеточных электрохимических исследований, в частности, модификация нанозлектрода с помощью платины позволила зарегистрировать концентрацию активных форм кислорода вблизи и внутри клеток гиппокампа.

С высокой точностью осуществлялось нанесение биотинилированной ДНК на стеклянную подложку, покрытую стрептавидином, и протеина G на положительно заряжённую стеклянную подложку [70]. Также возможно прецизионное нанесение на подложку фемто- и аттолитровых капель воды, при котором достигается высокая равномерность величины подачи, и, как следствие, возможно добавление одинаковых порций воды; более того, возможно добавление реагента из капилляра при сохранении объёма капли [71].

Помимо возможности доставки материала на поверхность, капилляр также позволяет выполнять одноклеточную нанобиопсию путём извлечения небольшого количества материала изнутри клетки, которая затем подвергается дальнейшему анализу [72, 73]. Такое извлечение является ценным, поскольку последующий анализ может быть привязан к местоположению клетки или использоваться для сравнения свойств ряда клеток в группе.

1.3 Микролинзовая оптическая микроскопия

В 2014 году достижения в области оптической микроскопии были отмечены Нобелевской премией по химии за изобретение флуоресцентной микроскопии со сверхвысоким разрешением и микроскопии локализации одиночных молекул [74]. Появление 4Pi-микроскопии [75] и сканирующей микроскопии на основе фотонных струй [76] улучшили характеристики конфокальной микроскопии. Однако эти методы часто сложны в реализации,

фототоксичны, требуют маркеров или длительного времени для обработки данных.

По-прежнему остаётся актуальной задача визуализации в оптический микроскоп с преодолением дифракционного предела, которая активно решается с помощью микролинз. В этом методе микролинза помещается между образцом и объективом оптического микроскопа, она работает как оптический увеличитель (*Рисунок 2*). Существуют два вида микролинз, используемых для преодоления дифракционного предела. Первый вид – микролинзы из однородного материала (например, титаната бария, полистирола) [77]) с показателем преломления менее 2. Второй вид – высокоструктурированные микросферы, которые изготавливаются из метаматериалов (материалов с отрицательным показателем преломления), например, из наночастиц оксида титана по определенной технологии. В работе [78] экспериментально демонстрируется использование объемных структур из наночастиц оксида титана в качестве твердотельной иммерсионной линзы (mSIL, metamaterial Solid Immersion Lens), созданной по технологии сборки из нанотвердой жидкости. Эта диэлектрическая суперлинза может создавать резкое контрастное мнимое изображение с широким полем обзора и сверхразрешением на уровне 45 нм в белом свете (*Рисунок 3*). Чтобы приготовить полусферическую твердотельную иммерсионную линзу, водный раствор наночастиц оксида титана диаметром 15 нм сначала центрифугировали в пробирке, далее помещали в органический растворитель (состоящий из гексана и тетрахлорэтилена) для образования нанотвердой жидкости, которую затем распыляли на поверхность образца, покрытую тонким слоем органического растворителя. После испарения растворителей наночастицы формируют более плотно упакованную структуру.

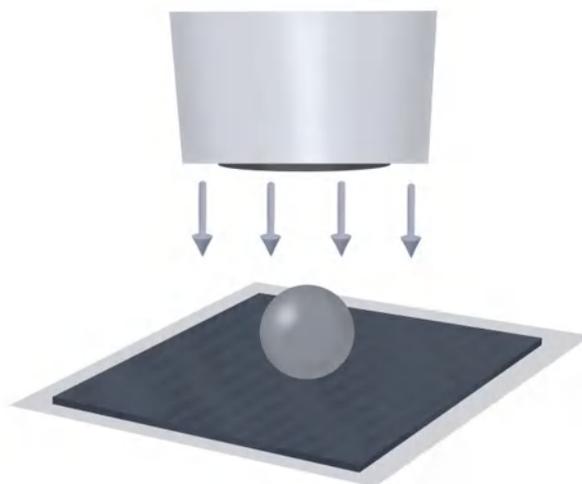


Рисунок 2. Микролинза на поверхности образца работает как увеличитель и создает увеличенное мнимое изображение, которое собирает линза оптического микроскопа.

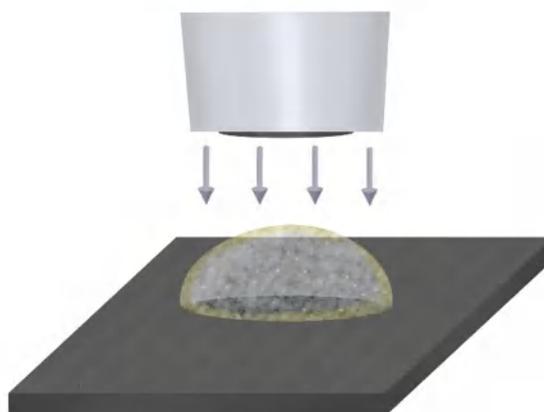


Рисунок 3. Суперлинза – полусферическая твердотельная иммерсионная линза – по сравнению с микролинзой позволяет получить более высокое пространственное разрешение, также находящееся за границей дифракционного предела.

Получение изображений сверхвысокого разрешения может быть достигнуто с использованием затухающих поверхностных волн ближнего поля. Известно, что идеальная суперлинза из метаматериала преодолевает дифракционный предел Аббе, используя среду с отрицательным показателем преломления и восстанавливая затухающую волну [79]. Метаматериалы фокусируют свет в два фокуса – внутри слоя и снаружи, и позволяют не только

усиливать затухающие волны, но и преобразовывать их в распространяющиеся волны. Идеальный диэлектрик для создания суперлинз из метаматериалов еще не определен, вероятно, из-за ограниченного выбора прозрачных для видимого диапазона диэлектрических материалов с высоким показателем преломления и из-за того, что технология создания желаемых наноструктур из этих материалов остается нерешенной проблемой.

В последние годы благодаря развитию метаматериалов, нанофотоники и плазмоники мы стали свидетелями ряда достижений в области визуализации объектов со сверхвысоким разрешением с помощью микролинз нового типа: например, суперлинз из метаматериалов с отрицательным показателем преломления [80], суперколебательных линз [81], «рыбьего глаза» Максвелла из кремния [82] и каскадной плазмонной суперлинзы [83]. Однако при освещении белым светом они не работают или их характеристики существенно ухудшаются. Диэлектрические сферические и цилиндрические линзы с диаметром в микрометры могут преодолевать дифракционный барьер благодаря явлению, известному как фотонная наноструя [84, 85]. Фотонная наноструя позволяет достигать разрешения от $\approx \lambda/6$ до $\approx \lambda/8$ в белом свете [86].

Микросфера фокусирует падающий свет в субволновое световое пятно и передает изображение ближнего поля контактирующего с линзой объекта в мнимое изображение, которое визуализируется в объективе оптического микроскопа [87]. Сообщается о достижении разрешения в 25 нм с помощью объединения микросфер с конфокальным микроскопом [88]. Кроме того, были продемонстрированы измерения с биологическими микролинзами, как, например, клетками и волокнами паутины паука [89, 90]. Были продемонстрированы результаты работы по объединению кантилевера в атомно-силовом микроскопе с микролинзой: контактный режим позволяет получать изображения жестких образцов, а режим постоянной высоты облегчает неинвазивную визуализацию чувствительных образцов [91].

Чтобы улучшить качество изображения микросфер, исследователи изучили влияние различных параметров на качество изображения: диаметра линзы [92], использования иммерсионной жидкости [93, 94], погружения в эластомеры [95] и полидиметилсилоксановые пленки [96]. Свойства фотонной наноструи можно оптимизировать, подбирая индекс преломления окружающей среды [12]. Погружение микросфер с высоким показателем преломления в жидкость может существенно улучшить качество изображения.

В отличие от других методов сверхвысокого разрешения, микролинзы обеспечивают визуализацию в реальном времени при освещении белым светом, не используя меток. Эти уникальные особенности привлекли ряд групп по всему миру для исследований в этом направлении.

1.4 Пьезокерамические биосенсоры

Изначально в области сенсорных технологий для целей детекции использовались кантилеверные сенсоры, пришедшие из атомно-силовой микроскопии. Одна из первых публикаций, в которой рассказывалось о применении кантилеверных сенсоров для биологических систем на примере неспецифической адсорбции белка бычьего сывороточного альбумина, была представлена в 1996 году [97]. В работе была подтверждена прямая зависимость отклонения кантилевера от поверхностного напряжения на кантилевере.

Кантилеверные датчики активно исследуются на предмет чувствительного обнаружения биологических и химических частиц. Принцип их работы основан на том, что процессы, происходящие на кантилевере, преобразуются в механические сигналы, например, изгиб [98, 99], сдвиг резонансной частоты [100], изменение пьезорезистентности [101], которые можно контролировать с помощью оптических и других методов [102, 103, 104]. Поверхность кантилеверов покрыта тонкой пленкой рецепторных молекул, которые могут реагировать с мишенью с определенной чувствительностью и специфичностью.

Thundat и его коллеги [105] впервые сообщили об отклонении кантилевера атомно-силового микроскопа (АСМ) из-за изменений относительной влажности, что выявило новые возможности кантилеверов АСМ в качестве химических и биологических сенсоров. Они также подтвердили адсорбцию ртути на кантилевере с разрешением в пикограммы. С тех пор были проведены исследования и эксперименты для обнаружения различных мишеней, включая биомаркеры различных заболеваний: вируса папилломы человека [106], и опухолевого маркера нуклеолина [107] и др.

Пьезокерамические биосенсоры появились не так давно, но они уже продемонстрировали высокую чувствительность при обнаружении рецептора фактора эпидермального роста (Her2) [108], вируса (WSSV) растений [109], бактериальных спор (*Bacillus anthracis*) [110].

Электромеханические сенсоры на основе кантилеверов можно условно поделить на два режима работы: статический (на основе отклонения) и динамический (на основе резонанса), а также по типам обнаружения на оптический или электрический [111, 112]. Как в статическом, так и в динамическом режиме для проведения измерений требуется контрольный кантилевер, который не детектирует мишень и с которого снимается контрольный сигнал. Статические системы, как правило, представляют собой консоль кантилевера, зажатую на одном конце в держателе. Биологические объекты связываются с сенсорным слоем на поверхности кантилевера, вследствие чего поверхностное напряжение изменяется. Изменение изгиба кантилевера приводит к отклонению лазерного луча вверх или вниз на фотодиоде пропорционально количеству осевших мишеней. Устройства на основе динамического режима имеют более высокую чувствительность обнаружения по сравнению со статическим, однако статические системы могут работать более стабильно в различных средах.

С помощью статического режима в работе [113] было продемонстрировано прямое обнаружение вирусов гриппа А в концентрациях

ниже 10^5 вирионов/мл с помощью пьезокерамического диска, модифицированного синтетическими сиалилгликополимерами, которые биоспецифически связывают белки гемагглютинина. Также было показано, что сдвиг частоты пропорционален изменению поверхностного напряжения, вызванного адсорбцией вируса, а чувствительность обратно пропорциональна толщине резонатора. Следовательно, используя более тонкую пьезокерамическую пластинку, можно легко повысить чувствительность в несколько раз.

Динамический режим

При динамическом режиме колебания кантилевера возбуждаются на резонансной частоте, и присоединенная масса севшей на кантилевер частицы вызывает сдвиг резонансной частоты. Чем меньше консоль кантилевера, тем легче определить присоединившуюся массу детектируемого объекта. Динамический режим позволяет детектировать более низкие концентрации веществ по сравнению со статическим режимом, в работе [114] показано устройство с чувствительностью по массе, приближающуюся к 10 зептограммам.

Одной из сложностей при работе в динамическом режиме является их использование в жидкости из-за существенного демпфирования колебаний кантилевера, при этом все биологические объекты преимущественно необходимо детектировать именно в растворах или буфере. В связи с этим разрабатываются различные устройства и новые методики для применения динамического режима в водной среде. В частности, в работе [115] представлен наноканальный подвесной резонатор, который может достигать чувствительности аттограммов в водных растворах. Также в литературе представлены работы по системам для обнаружения белков, использующим пьезоэлектрический эффект для преобразования отклонения кантилевера в прямой электрический сигнал [116, 117]. Одним из преимуществ электрического обнаружения является его мультиплексность. Например, было

продемонстрировано, что более 1000 консолей могут проводить измерения одновременно [118]. Это является неотъемлемым фактором для систем диагностики с высокой пропускной способностью, например, для скрининга бактериальных клеток на устойчивость к антибиотикам.

Одним из недостатков кантилеверов (особенно в статическом режиме) можно назвать зависимость от внешнего воздействия, в частности, от изменения температуры, внешних шумов, колебаний потока жидкости. Эти факторы вносят влияние на результаты измерений. Сенсоры, работающие в динамическом режиме, менее подвержены таким воздействиям. Однако в жидкости добротность резонансных изгибных колебаний сильно падает, что ведет к уменьшению чувствительности. Решение в этом случае – измерять продольные колебания кантилевера [119].

Обнаружение патогенов (включая измерение их роста или метаболической активности) происходит на поверхности чувствительного элемента сенсора, вызывая его отклонение (статический режим) или изменение резонансной частоты колебаний датчика (динамический режим).

В динамическом режиме резонансная частота пьезоэлектрического элемента (кантилевера) изменяется в зависимости от прикрепившейся массы и изменившейся вследствие этого жесткости поверхностного слоя. В этом режиме кантилевер ведет себя как гармонический осциллятор, и его эффективность зависит от резонансной частоты f , определяемой жесткостью самого кантилевера, адсорбированного слоя k и эффективной массой m , а также добротностью Q . Электромеханические биосенсоры, работающие в динамическом режиме, способны взвесить массу прикрепившейся мишени с высокой чувствительностью: в пикограммах и даже в фемтограммах [120]. Кроме того, изменение массы частиц на биосенсоре можно использовать как индикатор скорости роста бактерий в среде [121].

Режимы считывания сигнала с датчика

Наиболее популярные схемы считывания сигнала с датчика – оптическая, пьезорезистивная и пьезоэлектрическая. Оптическая схема регистрирует отклонения лазерного луча от кончика кантилевера. Пьезорезистивная схема основана на изменении сопротивления проводника при изгибе кантилевера и, как правило, использует электрическую систему регистрации на основе моста Уитстона для уменьшения перекрестных помех и улучшения отношения сигнал/шум.

Пьезоэлектрическая схема регистрирует механические колебания под действием переменного напряжения. Когда масса m увеличивается из-за присоединения молекул, резонансная частота f уменьшается. Сенсорный слой (как правило, антитела) закрепляется на поверхности одного из электродов пьезоэлектрического датчика. Электроды возбуждают резонанс в пьезоэлектрике, а также считывают сигнал с датчика. Когда мишень связывается с сенсорным слоем, происходит изменение массы Δm на поверхности электрода, что приводит к зависящему от времени сдвигу частоты Δf [122] (Рисунок 4).

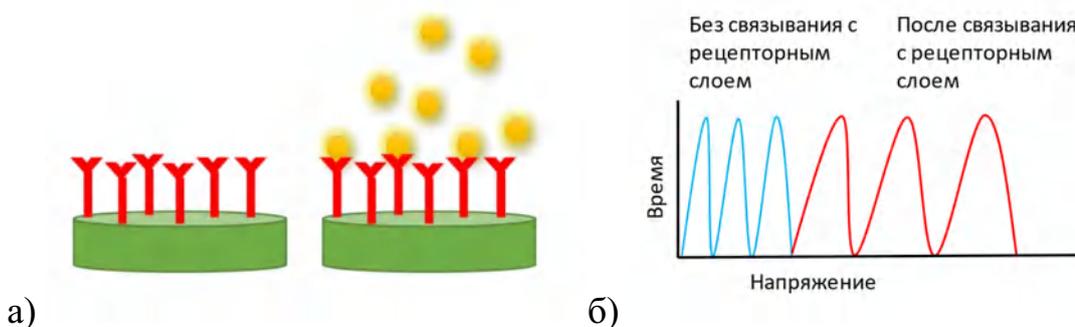


Рисунок 4. а) Пьезоэлектрический диск с антителами (слева) и после присоединения антигенов (справа); б) график зависимости амплитуды колебаний во время обнаружения: синяя до связывания мишени с рецепторным слоем на поверхности диска, красная – после присоединения мишени.

В недавней работе было продемонстрировано обнаружение бактериального гена *Clostridium difficile* с помощью пьезоэлектрического

сенсора в сочетании с проточной системой и двумя температурными зонами, чувствительность и специфичность составляют 95%, что сравнимо с коммерчески доступным методом на основе ПЦР, при этом измерения проводились в течение 40 минут без выделения генов, амплификации и флуоресцентных меток [123]. В работе [124] использовались PEPS (piezoelectric plate sensor), покрытые ДНК зондом, для обнаружения двойной мутации вируса гепатита В. С помощью зонда ДНК, иммобилизованного на поверхности PEPS, реализовали обнаружение ДНК в реальном времени и *in situ* с аттомолярной чувствительностью [125].

Также с помощью пьезокерамических датчиков было продемонстрировано обнаружение ДНК [126]. С помощью пьезоэлектрической пластинки, покрытой ДНК зондом, было показано обнаружение двойной мутации вируса гепатита в моче *in situ* [127]. Пьезоэлектрический датчик был покрыт золотыми электродами с двух сторон и тонким слоем изоляции. Связывание ДНК мишени из образца биологической жидкости с ДНК зондом на поверхности прямоугольной пьезоэлектрической пластины вызывало сдвиг резонансной частоты, что увеличивало длину и ширину датчика. Было показано, что чувствительность метода составляет 60 копий/мл в течение 30 минут.

В работе [128] объединили пьезоэлектрические датчики с ПЦР для одновременного обнаружения и генотипирования 16 штаммов вируса папилломы человека в образцах соскобов шейки матки. Пьезоэлектрические датчики покрыли синтетическими олигонуклеотидами и выполнили тесты после амплификации ПЦР без использования меток, результаты показали высокую селективность и воспроизводимость метода, сопоставимого со стандартным анализом. Чен и др. [129] разработали пьезоэлектрический датчик с металлическими зажимами для обнаружения гибридизации продуктов ПЦР вируса папилломы человека и рассмотрели влияние изменения температуры на стабильность резонансной частоты.

Микрокантилеверы, покрытые питательными слоями, например, агарозой, были способны обнаруживать активный рост *E. coli* в течение 1 часа в условиях контролируемой температуры и влажности [130]. Расчетная чувствительность по росту бактерий составляла ~ 140 пг/Гц, что соответствует примерно 200 клеткам *E. coli*. Рост иммобилизованного мицелиального гриба *Aspergillus niger* и одноклеточных дрожжей *S. cerevisiae* приводил к сдвигу резонансной частоты в течение нескольких часов, что намного быстрее, чем при использовании традиционных методов культивирования [131].

Метаболизм бактерий можно отследить по колебаниям кантилевера в статическом режиме в водной среде, а также параллельно провести тест на резистентность к антибиотикам. В работе [132] измерялось не статическое отклонение или изменение резонансной частоты, а анализировались флуктуации (фоновый шум) в зависимости от времени. Живые бактерии были ковалентно пришиты к обеим сторонам кремниевых V-образных кантилеверов с использованием аминопропилатриэтоксисилана (APTES) в качестве линкерной молекулы с хорошей биосовместимостью. Метаболическая активность прикрепленных *E. coli* и *S. aureus* вызывала низкочастотные отклонения сенсора. В присутствии антибиотиков ампициллина и канамицина колебания резко уменьшились из-за уничтожения бактерий лекарствами, что позволило быстро подтвердить антибактериальный эффект.

Кроме того, в работе [133] было показано, что 50 клеток способны генерировать измеримые колебания. Таким образом, кантилеверные сенсоры вполне пригодны для проведения менее чем за час теста на антибиотикорезистентность небольшого числа бактерий.

Микрокантилеверные пьезокерамические биосенсоры позволяют определять белки, являющиеся маркерами различных заболеваний. Например, была показана возможность детектирования простат-специфического антигена, являющегося маркером заболеваний предстательной железы на клинически значимом уровне концентраций [134]. В другой работе [135]

определялась концентрация миоглобина, являющегося маркером сердечно-сосудистых заболеваний. Многие тесты требуют значительного времени, специально обученного персонала и похода в лабораторию. Компактные и автономные сенсорные устройства на основе микрокантилеверов, интегрированных в микрофлюидные чипы, имеют перспективы для использования в качестве устройств персонализированной диагностики [136]. Время отклика подобных устройств составляет десятки минут. Стационарные приборы могут использоваться в клинических лабораториях в качестве альтернативы или дополнения к стандартным методам диагностики.

В таблице 1 представлены данные об использовании пьезоэлектрических биосенсоров для обнаружения различных биологических объектов с указанием чувствительности в разных образцах.

Таблица 1. Использование пьезоэлектрических биосенсоров для обнаружения различных биологических объектов

Мишень	Исследуемый объект	Образец	Количество	Ссылка
<i>Staphylococcus aureus, Shigella dysenteriae</i>	Бактериальная клетка	Питательная смесь	10 ⁶ клеток/мл	Wenjie et al. (2008) [137]
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 Whole cell Milk	Бактериальная клетка	молоко	53 CFU/мл	Shen et al. (2011) [138]
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	Бактериальная клетка	говядина	50-100 клеток/мл	Campbell et al. (2007) [139]
Human KRAS G12V mutation	Нуклеиновая кислота	урина	60 копий/мл	Kirimli et al. (2018) [140]
Hepatitis B viral double mutation	Нуклеиновая кислота	урина	60 копий/мл	Kirimli et al. (2015) [141]
<i>Clostridium difficile</i>	Нуклеиновая кислота	кал	150 CFU/мл	Han et al. (2019b) [142]
HBV	Нуклеиновая кислота	Синтетическая последовательность	1.6*10 ¹⁸ М	Wu et al. (2013) [123]

В работе [143] продемонстрировали положительное обнаружение вируса гриппа А с помощью оптической регистрации сигнала при концентрациях ниже 10^6 вирусов на мл.

В отличие от датчиков для обнаружения химических веществ и молекул газа, датчики, разработанные для обнаружения биологических видов, таких как белки и антигены, порой страдают низкой чувствительностью и низкими порогами обнаружения [144]. В случае кантилеверных сенсоров величины отклонения и изменения поверхностного напряжения часто являются небольшими при малых концентрациях искомого вещества, что приводит к меньшему отношению сигнал/шум. Предпринимаются разные попытки улучшения пороговой чувствительности в биосенсорах на основе режима отклонения, но не все они бывают эффективными. К тому же из-за эффекта демпфирования в жидкости довольно проблематично делать измерения в режиме отклонения. По этой причине исследуется возможность детектирования биологических агентов на основе измерения продольных колебаний пьезокерамического биочипа. Добротность продольных колебаний тонкой мембраны в жидкости практически не падает, что существенно для детекции биологических объектов.

При необходимости выявления причины заболевания варианты обнаруживаемых мишеней могут быть различными: как сами вирусные частицы (аналогично первому случаю), так антитела к вирусу, вырабатываемые иммунной системой зараженного человека.

Среди электромеханических биосенсоров широко используется технология кварцевого микровзвешивания [145]. В этих сенсорах проводится измерение резонансной частоты кварцевой пластинки при изменении связанной массы. Кварцевая пластинка одной стороной обращена в жидкость и совершает сдвиговые колебания. В результате этого чувствительность к изменению упругих свойств поверхностной пленки незначительна, поскольку при измерении пленка не претерпевает циклов растяжения-сжатия

достаточного уровня. Однако часто оказывается, что именно изменение упругих свойств пленки зонд-мишень играет главенствующую роль. При всех своих плюсах в методе кварцевого микровзвешивания не удается достичь миниатюризации прибора.

Увеличение чувствительности на шесть порядков по сравнению с лучшими экземплярами коммерческих кварцевых весов достигается в кантилеверном биосенсоре с внутренним каналом и общей массой около 100 нг [146]. Кантилеверные биосенсоры [147, 148] являются высокочувствительной платформой для обнаружения вирусов. В лабораторных экспериментах достигнута чувствительность по обнаружению единичного вируса [149] и даже одного атома [150].

С помощью электромеханического биосенсора возможно регистрировать не только акт связывания, но и момент отрыва вирусной частицы при увеличении амплитуды механических колебаний биочипа до пороговых значений, когда механическая энергия колеблющейся вирусной частицы становится больше энергии связи. В момент отрыва возникает сигнал отрыва, зарегистрировать который позволяет электронная измерительная система. Таким образом, биосенсор сможет регистрировать как связывание вируса, так и его отрыв [151]

Электрохимические биосенсоры основаны на вступлении в электрохимическую реакцию биологического материала с аналитом [152]. Основные категории электрохимических биосенсоров – потенциометрические, амперометрические и импедиметрические преобразователи. Электрохимические биосенсоры имеют ряд преимуществ в части чувствительности и селективности, могут быть мобильными и недорогими.

Наиболее близкой работой по тематике к данной являются исследования Wei Wu, Wei-Heng Shih, and Wan Y. Shih из Drexel University. В работе [153] изучался механизм сдвига резонансной частоты $\Delta f/f$ для пьезоэлектрической

пластины (PEPS) длиной 1370 мкм и шириной 537 мкм, изготовленного из пьезокерамики (свинец, ниобат магния-титанат свинца) толщиной 8 мкм. $\Delta f/f$ PEPS отслеживали в модели связывания из трех этапов: сначала детектировали связывание активированного малеимидом биотина с сульфгидрилом на поверхности пьезоэлектрического сенсора, далее связывание стрептавидина с биотином, и на третьем этапе происходило связывание биотинилированного зонда дезоксирибонуклеиновой кислоты со связанным стрептавидином. Параллельно исследовалась ориентация кристаллов в пьезокерамике с помощью рентгеновской дифракции (XRD) вокруг пиков (002) / (200) после каждой стадии связывания. Результат XRD-исследований показал, что каждая стадия связывания заставляла кристаллическую ориентацию тонкого слоя пьезокерамики переключаться с вертикальной ориентации на горизонтальную, и большая часть обнаружения PEPS $\Delta f/f$ была обусловлена изменением латерального модуля Юнга тонкого слоя в результате изменения ориентации кристаллов.

В соответствии с работой [154] изменение жесткости может быть существеннее более чем в 300 раз более выражено по сравнению с изменением массы. На основании данной работы получен патент «Способ повышения чувствительности обнаружения пьезоэлектрического микрокантилеверного датчика» [155]. Используя постоянный ток, прикладываемый к пьезоэлектрическому микрокантилеверу, можно детектировать изменение резонансной частоты во время обнаружения быстрее и с более высокой чувствительностью. Изменение модуля Юнга может быть вызвано или усилено приложением электрического поля постоянного тока к пьезоэлектрическому слою, которое усиливает переключение области поляризации, отличной от 180° , пьезоэлектрического слоя. Изменение модуля Юнга также может быть результатом связывания представляющих интерес частиц с пьезоэлектрическим микрокантилеверным датчиком или сочетания связывания и приложения электрического поля смещения постоянного тока.

Значительно повышенная чувствительность обнаружения является следствием изменения модуля Юнга пьезоэлектрического слоя.

Вывод

Атомно-силовая и капиллярная микроскопии являются полезными и по-прежнему актуальными инструментами для исследования свойств биологических объектов за счет возможности изучения образцов в естественной среде без использования меток, красителей и специальных реагентов. Более того, появляется все больше исследований, в которых измерение локальных свойств поверхности, структурных особенностей под воздействием лекарственных препаратов или вследствие изменений среды приобретает важное значение для диагностических и биомедицинских целей. Тем не менее, остаются нерешенные вопросы, в частности, по-прежнему актуальной задачей является визуализация биологических процессов в естественных средах с нанометровым разрешением в видеорежиме. Для этой задачи перспективным методом становится микролинзовая микроскопия, которая позволяет преодолевать дифракционный предел, при этом не требует дополнительных меток, а пробоподготовка остается относительно простой, как и в случае с АСМ и СКМ.

Электромеханические биосенсоры становятся востребованными благодаря их высокой чувствительности и возможности проведения количественных измерений при низкой стоимости, портативности, проведении детекции в реальном времени и без использования дополнительных меток и химических реагентов. Недостатком кантилеверных систем является технологические сложности в реализации массового производства. Предлагаемое решение при сохранении высокой чувствительности предполагает использование планарной технологии изготовления биочипа. Это дает существенные преимущества при массовом тиражировании. При этом синтез рецепторной поверхности может

происходить сразу на большой плоскости заготовки с последующим её разделением на отдельные микрочипы.

Глава 2 Материалы и методы

2.1 Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия – самый популярный метод сканирующей зондовой микроскопии, особенно для изучения биологических объектов. Кантилевер, балка с острой иглой на конце, сканирует поверхность образца в контактном или полуконтактном режиме. Для детектирования силы взаимодействия между иглой и поверхностью образца, измеряется изгиб балки или изменение резонансной частоты ее колебаний. Как правило, сканирование проводится в режиме постоянной силы, которая контролируется обратной связью.

Подложка

Слюда является отличным материалом для осаждения образцов бактерий при наблюдении с помощью сканирующей зондовой микроскопии. Самым популярным видом слюды является мусковит, который представляет собой гидратированный алюмосиликатный минерал с типичной формулой $(\text{KF})_2(\text{Al}_2\text{O}_3)_3(\text{SiO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})$. Перед осаждением бактерий слюда расщепляется вдоль базальной плоскости. В этом случае для осаждения бактерий получается достаточно большая чистая поверхность. $10 \times 10 \text{ мм}^2$ листа слюды являются подходящими для осаждения 4 мкл капли бактерий с концентрацией около 10^9 мл.

Для измерений АСМ в жидкостях слюда предварительно обрабатывается полилизинном. 10^{-2} М раствор полилизина наносят на свежую сколотую поверхность слюды и высушивают. Другие подложки, такие как стекло, кварц, кремний, могут использоваться для осаждения бактерий. Тем не менее они не такие гидрофильные, как свежесколотая слюда. Также обычно достаточно сложно получить чистую поверхность таких подложек.

Для исследования вирусных частиц лучше всего подойдет поверхность высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ). Клетки (клетки

крови, опухолевые клетки), как правило, лучше всего визуализировать на подложках из стекла.

Кантилевер

Для разных режимов сканирующей зондовой микроскопии следует использовать различные типы кантилеверов [156].

Для контактного режима в воздухе и в жидкостях используются кремниевые или кремниевые нитридкремниевые кантилеверы с механической жесткостью в диапазоне 0,01-1 Н/м. Радиус кривизны кантилевера должен быть меньше 10 нм для достижения лучшего разрешения во время визуализации. Наиболее подходящие кантилеверы – прямоугольной или треугольной формы. Кантилеверы с металлическим покрытием дают лучший отраженный оптический сигнал, но могут также приводить к более высокому температурному дрейфу.

Для исследования на атомно-силовом микроскопе использовался СЗМ ФемтоСкан (Центр перспективных технологий, Россия, www.nanoscopy.ru) и программное обеспечение ФемтоСкан Онлайн для обработки полученных результатов.

2.2 Сканирующая капиллярная микроскопия

Установка СКМ собрана на базе инвертированного оптического микроскопа, что даёт возможность визуального наблюдения исследуемого образца и позволяет удобно позиционировать зонд при выборе области сканирования (*Рисунок 5*).

В схеме самого микроскопа задействованы: высоковольтный усилитель, подающий сигнал на пьезокерамические подвижки; высокочувствительный усилитель ионного тока, создающий разницу потенциалов между электродами и измеряющий напряжение текущего ионного тока (усилитель имеет регулятор, позволяющий подстраивать степень усиления: от 0.5 до 1000 мВ на 1 пА) и цифровой контроллер (блок управления) микроскопа, принимающий

сигнал с усилителя тока и подающий управляющие сигналы на усилитель пьезокерамики.

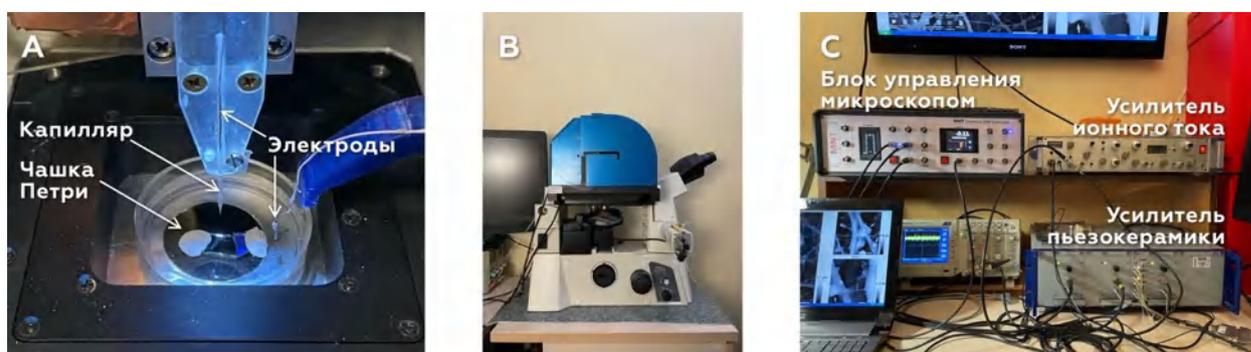


Рисунок 5. Вид рабочей области СКМ (А), установка СКМ (под синей крышкой) на базе инвертированного оптического микроскопа Nikon TI-U (В) и управляющая электроника СКМ (С)

Перед началом сканирования задаётся разбиение области на сетку заданного шага, а снятие кадра происходит последовательно внутри образовавшихся квадратных областей. Если перепад высот в области больше некоторого заданного значения, то эта область разбивается на меньшие квадраты и проверяется уже перепад высот в них, цикл повторяется, пока перепад высот в каждом из квадратов не станет меньше заданного на одном из этапов цикла значения. Тогда сканирование в этой области прекращается, и происходит переход к следующей области.

Если перепад высот в области меньше заданного, то область считается «ровной», и квадрат «окрашивается» в один тон (в зависимости от измеренной высоты). Так получается цифровое изображение топографии исследуемого объекта. Последовательное приближение областей сканирования реализовано с целью экономии времени на получение снимка.

Управление микроскопом осуществляется в ПО HPICM Control (Империял колледж, Лондон). Программа связывается с блоком управления микроскопом и передаёт параметры работы:

- параметры электроники, подающей сигналы на вход блока управления, указываются при первичной настройке программы (Рисунок 6);
- размер сканируемой области, смещение начальной точки, а также угол поворота области относительно осей пьезоподвижки;
- параметры сканирования.

Сканирование осуществляется в прыжковом режиме: задаются амплитуда и частота перемещения капилляра по оси Z, а также контрольное значение падения величины ионного тока, которое определяет сближение с образцом. Амплитуда задаётся на уровне нескольких микрон (в зависимости от ожидаемого перепада высот объекта), скорость сближения на уровне 15-30 нм/мс, контрольная величина падения ионного тока в пределах 0.5 – 1.5 %.

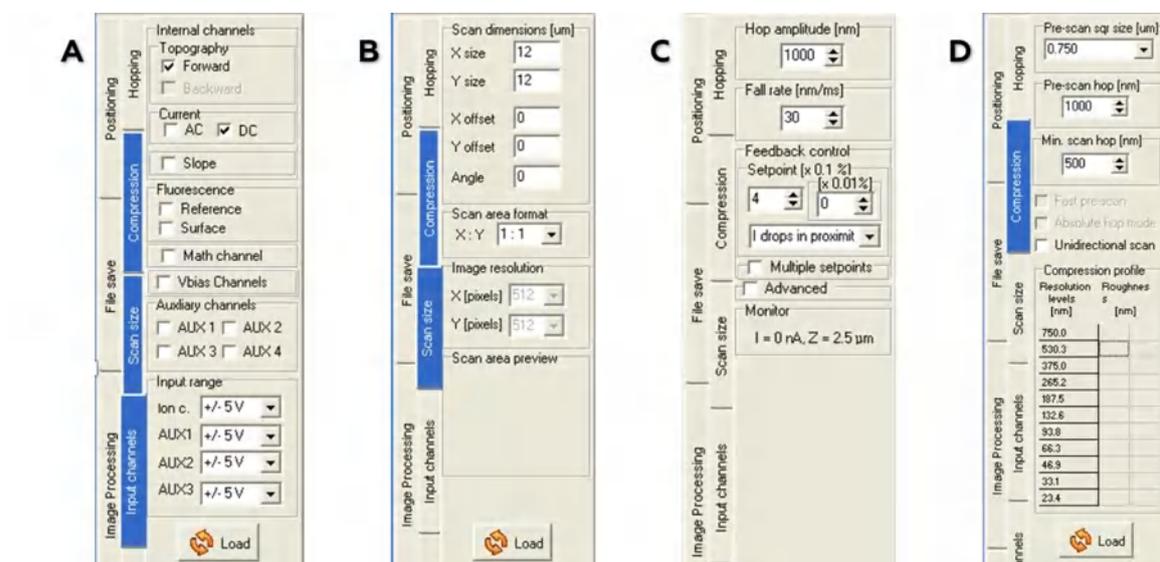


Рисунок 6. Диалоговые окна управляющей программы СКМ. (А) Управление входными сигналами. (В) Задание геометрии сканируемой области. (С) Окно параметров прыжкового режима. (D) Задание цикла последовательного приближения.

После задаётся цикл последовательного приближения сканируемой области, описанный выше. В верхнем всплывающем окне задаётся изначальное разбиение («нулевой» шаг цикла), далее для каждого шага определяются размер квадратной области сканирования в левом столбце таблицы, а в правом указывается диапазон перепада высот, при котором

область считается ровной – при выходе за этот предел происходит переход на следующий шаг цикла. В данном окне также можно задать иную амплитуду перемещения капилляра при сканировании (отдельно для нулевого и всех последующих шагов цикла).

Для калибровки капиллярного микроскопа было проведено сканирование эталонной кварцевой меры и CD-диска. На образце CD-диска проверялось качество отображения рельефа при использовании капилляров с различным диаметром отверстия. При использовании капилляра меньшего диаметра выходного отверстия показано характерное улучшение качества снимков. Глубина пит в 90 нм, ширина в 450 нм и расстояние между питами в 1750 нм соотносятся по данным АСМ и СКМ (Рисунок 7).

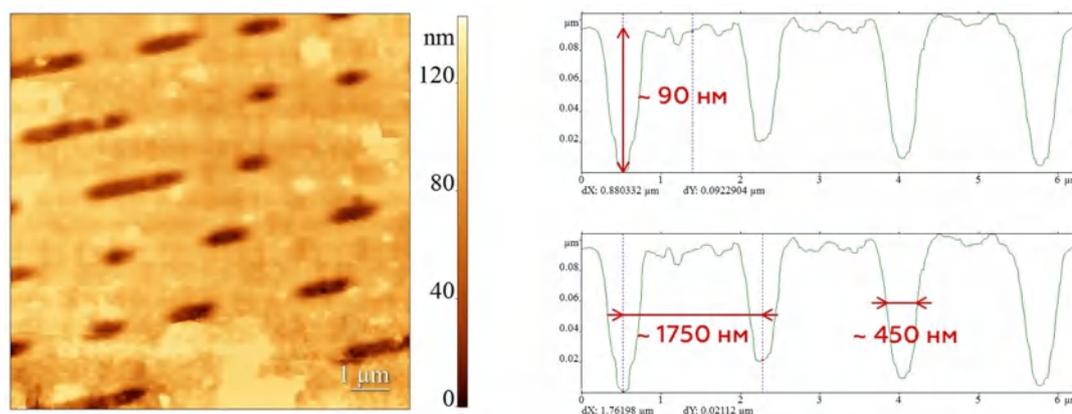


Рисунок 7. СКМ снимок CD-диска и измерение характерных параметров питов.

Постобработка снимков проводилась в ПО ФемтоСкан Онлайн [157] посредством медианной фильтрации и выравнивания уровня подложки по выбранным участкам подложки на полученном изображении.

2.3 Микролинзовая микроскопия

Измерения с помощью микролинзовой микроскопии осуществлялись при совместной работе с научной группой Z.Wang (Bangor University, UK) [158, 159]. В настоящей работе используются оптический микроскоп Zeiss

Model AxioSkop-40 с апертурой 0,9 и 100 кратным увеличением, предельное разрешение составляет около 300 нм, и инвертированный оптический микроскоп Nikon Ti-U Eclipse, объективы Nikon Plan Fluor 10x/NA 0.30 и Nikon S Plan Fluor 40x/NA 0.60, разрешение составляет около 900 нм и 450 нм соответственно. Для измерений используются микролинзы из титаната бария BTGMS-4,25, диаметр 30-100 мкм, плотность 4,22 г/см³, показатель преломления 1.9.

При использовании микросферы диаметром 15 мкм и с показателем преломления 1,9, фокусное расстояние составляет в соответствии с формулой [160]:

$$f = \frac{R}{2} * \frac{n}{n-1} = 7,9 \text{ мкм (ф1)}$$

Фокусное расстояние f измеряется от центра сферы, n – показатель преломления. В соответствии с формулой фокус располагается на расстоянии в 0,4 мкм от поверхности микролинзы.

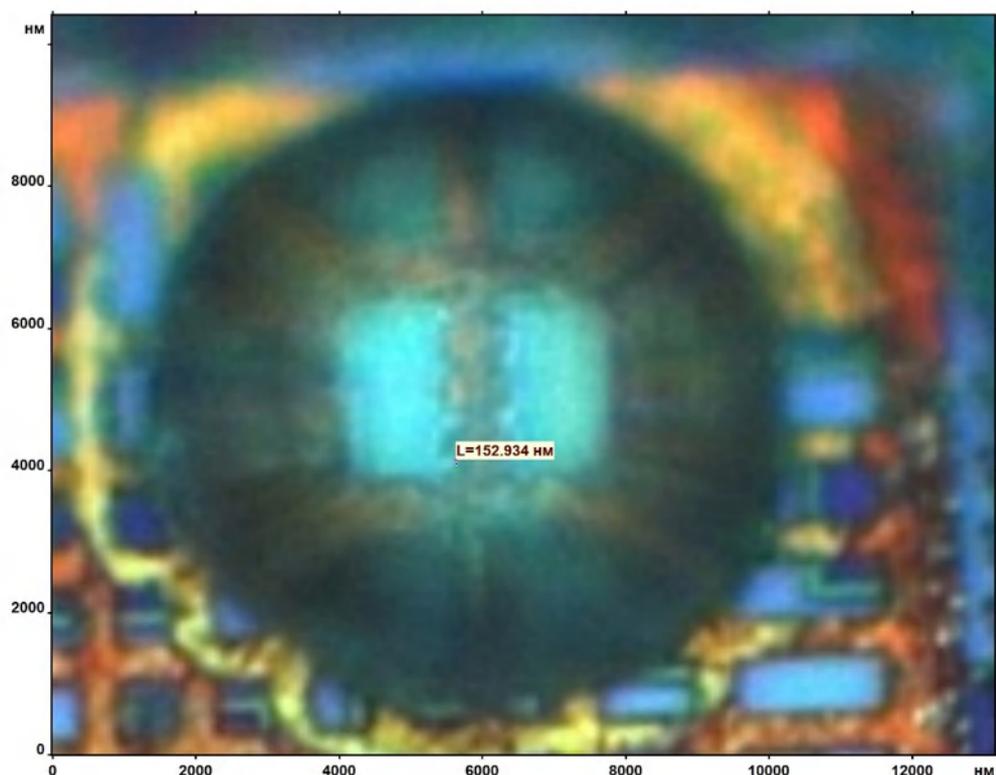


Рисунок 8. Детальное изображение топографического рельефа, полученного с использованием микролинзы. Ширина одиночного выступа составляет величину около 150 нм.

Диаметр микросферы влияет не только на латеральное разрешение, но и на поперечный угол обзора: чем меньше микросфера, тем выше разрешение и тем меньше площадь измерения. Фокусное расстояние определяется по формуле:

$$\frac{1}{f} = \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) * \left(\frac{n_2}{n_1} - 1 \right) \quad (\Phi 2)$$

n_1 – показатель преломления окружающей среды,

n_2 – показатель преломления линзы,

R_1 и R_2 – радиус кривизны линзы.

Для сфер с показателем преломления $1 < n_2 < 2$ фокус расположен на некотором расстоянии в области со стороны тени. При $n_2 = 2$ фокусировка происходит именно на теневой стороне. Наконец, для всех $n_2 > 2$ свет фокусируется внутри частицы.

Чтобы уменьшить показатель преломления n , можно поместить жидкость на сферу, т.к. важен не абсолютный показатель преломления сферы, а относительный $n_{\text{сферы}}/n_{\text{окружения}}$. Таким образом, с использованием капли воды относительный показатель преломления составит $n = 1,9/1,33 = 1,4286$.

Для калибровки метода были проведены измерения золотых структур в силиконовом масле (Рисунок 9).

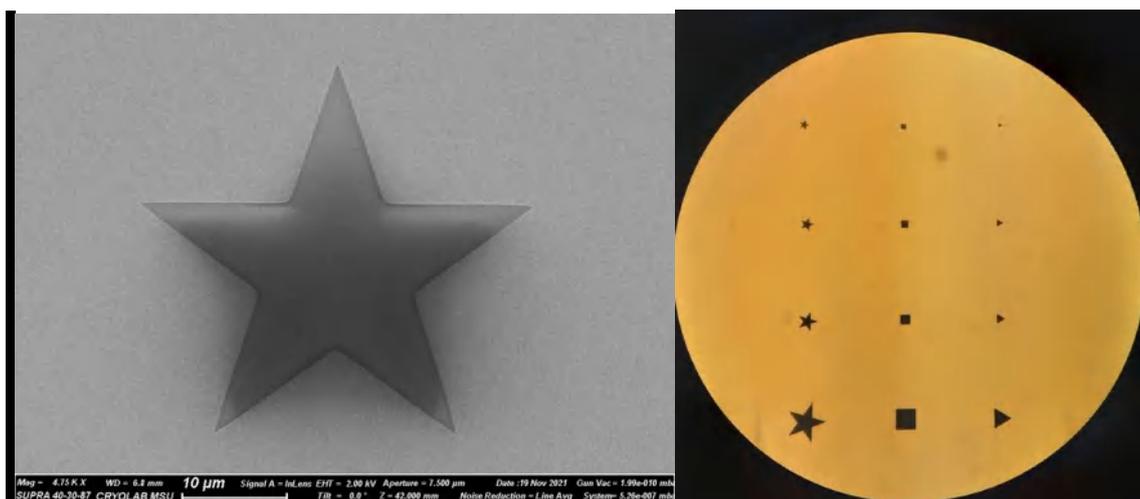


Рисунок 9. Слева СЭМ и справа оптическая микроскопия структур на золотой подложке.

Для расчета увеличения микролинзы диаметром 66 мкм сначала необходимо рассчитать средний показатель преломления, исходя из данных преломления силиконового масла 1,4 и показателя преломления BaTiO_3 1,9. Итого средний показатель преломления составляет 1,36.

Фокусное расстояние (от центра сферы) в соответствии с формулой (1) составляет $16,5 * 3,7 = 61,05$ мкм

$$M = f / (f - a) \quad (\text{ф3})$$

Увеличение рассчитывается через фокусное расстояние и a - расстояние между объектом и центром линзы.

Если считать, что расстояние мало, т.к. микролинза лежит на поверхности образца, то a равно радиусу линзы и составляет 33 мкм. Тогда увеличение составит $61,05 / (61,05 - 33) = 61,05 / 28,05 = 2,17$

$$M = n / (2 - n) \quad (\text{ф4})$$

Если рассчитать увеличение через показатель преломления по формуле 4, то получается 2,125.

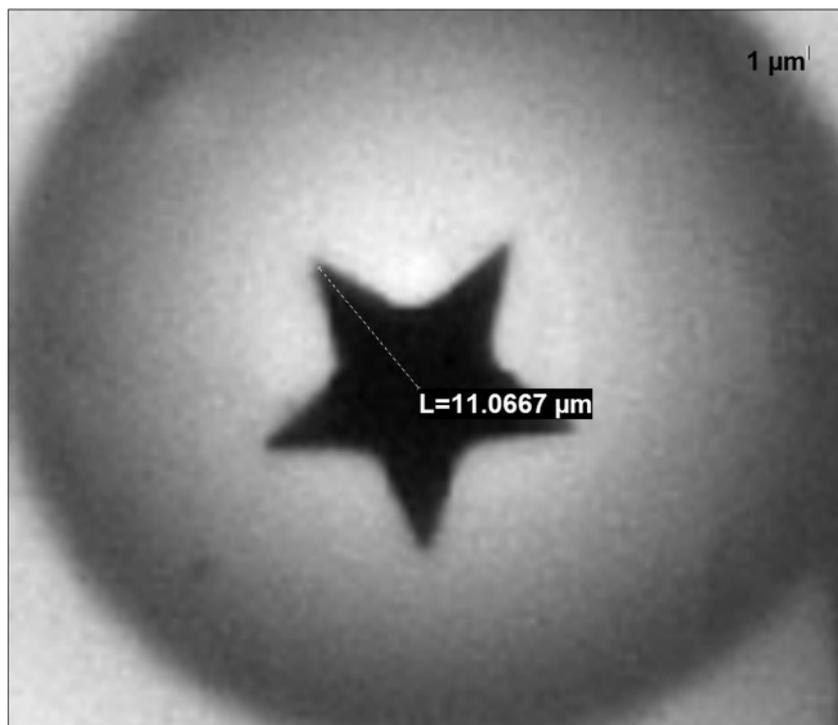


Рисунок 10. Изображение структуры на стеклянном образце с золотым напылением. Микросфера BaTiO_3 диаметром 62 мкм дает увеличенное изображение звезды, расстояние от центра изображения звезды до вершины составляет 11 мкм. Реальное расстояние на структуре составляет 5 мкм.

Расстояние от центра звезды до ее кончика составляет 5 мкм, этот же участок на получаемом увеличенном изображении составляет 11 мкм (Рисунок 10). Экспериментально было подтверждено, что микролинза из титаната бария диаметром 62 мкм в силиконовом масле дает увеличение 2,2.

2.4 Электромеханическая кантилеверная система

Чувствительность электромеханических датчиков для обнаружения биологических объектов зависит от различных параметров, таких как форма, размеры, материалы, режим работы, схема обнаружения, окружающая среда и сенсорный слой, который необходимо подбирать в зависимости от обнаруживаемой мишени.

Механические характеристики кантилевера – статическое отклонение и амплитуда резонансных колебаний – могут варьироваться от ангстремов до сотен нанометров, что требует прецизионных методов считывания сигнала для точной количественной оценки.

В данной работе по разработке пьезокерамического биосенсора для обнаружения биологических агентов фиксируется связывание зонд-мишень по изменению характеристик колебаний биочипа. Данное решение не предполагает использование дополнительных меток и химических реагентов. Избирательная сенсорная система полностью расположена на поверхности биочипа, поэтому исчезает необходимость использования дополнительных химических и биологических реагентов: ДНК-праймеров, ТАГ-полимеразы, различных меток и др., в отличие от ПЦР-диагностики и иммуноферментного анализа. При создании сенсорного слоя биочипа, используемого в биосенсоре, используется метод пришивки функциональных молекул на золотую поверхность подложки биочипа. В работе [161] приведены данные относительно химической пришивки дисульфидов к золотой поверхности. При правильном соблюдении технологии пришивки тиолов к поверхности золота образуются совершенные практически бездефектные монослои, что в конечном итоге обеспечивает высокую чувствительность биосенсора, увеличивает его избирательность.

Предлагаемое решение биосенсора состоит из пьезокерамического биочипа в виде диска с диаметром 3 мм и толщиной 100 мкм. Симметричная трехэлектродная конструкция исключает влияние двойного электрического слоя и паразитных диффузионных процессов на поверхности биочипа (Патент на изобретение № 2636048, Биосенсорное устройство для обнаружения биологических микро- и нанообъектов, 2017 г.). В этой конструкции биочипа потенциал подается на центральный электрод, при этом внешние электроды, обращенные к раствору, можно заземлять или держать под потенциалом раствора. При этом в отличие от известных конструкций отпадает

необходимость в дополнительном слое, изолирующем внешние электроды. Применение периодического и импульсного режимов возбуждения колебаний позволяет за счет использования оригинальных алгоритмов достигать высокую чувствительность при обнаружении вируса гриппа А [162].

Измерительная система биосенсора реализована с использованием электроники зондового микроскопа ФемтоСкан.

Жидкостная система может быть выполнена как по микрофлюидной технологии, так и с использованием резервуара миллиметровых размеров. В качестве сенсорного слоя предполагается использование антител, аптамеров и/или синтетических рецепторов. Следует заметить, что неспецифическое связывание в жидкости при наличии различных примесей, осаждаемых на поверхности биочипа, не приводит к существенному изменению механической жесткости поверхностного слоя, и не влияет на сигнал отрыва частицы при большой амплитуде колебаний. Последующая характеристика вируса может проводиться методами хроматографии, просвечивающей электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии [163].

Принцип работы биосенсора основан на микроэлектромеханической системе: при подаче переменного электрического напряжения начинают происходить механические колебания биочипа. Когда частота переменного тока совпадает с частотой механических колебаний биочипа, то появляется резонанс – резкое увеличение амплитуды колебаний кантилевера. На поверхность биочипа нанесен рецепторный слой, специфичный к искомой мишени. Биочип состоит из двух пьезоэлементных дисков, по бокам которых припаяны электроды. В биочипе возбуждаются продольные колебания, которые приводят к растяжению/сжатию сенсорной пленки с прикрепленными вирусными частицами или биомакромолекулами. Сигнал можно подавать как на первый, так и на второй контакт, поэтому приемная сторона любая. Сигнал на приёмной стороне не сдвигается по частоте относительно частоты,

задаваемой синтезатором. Меняется только амплитуда сигнала из-за того, что меняется сопротивление в резонансе и антирезонансе.

На пьезокерамический диск возможно подавать сигнал в диапазоне от -0,5 В до 0,5 В, но в работе используется в основном диапазон от 0 В до 0,5 В. Сдвиг резонансной частоты биочипа говорит о том, что на поверхность пьезоэлектрического кантилевера попал искомый патоген.

Изменение частоты механических колебаний кантилеверного биочипа может происходить вследствие двух разнонаправленных факторов. При увеличении прикрепленной массы происходит уменьшение резонансной частоты. Напротив, если прикрепление вирусов или бактерий к поверхности кантилеверного биочипа сказывается в изменение эффективной жесткости k на величину Δk , будет происходить увеличение резонансной частоты колебаний кантилеверного биочипа.

В работе определяется сдвиг резонансной частоты за счет изменения массы при прикреплении мишени к пьезоэлементу. Для этого сначала необходимо найти резонансную частоту (то есть найти диапазон частот, в которых она располагается). В этом диапазоне частот подать сигнал с постоянной амплитудой (время пробега всего диапазона для примера 1 секунда). После пробега всего диапазона получаем 1 резонансный пик. Затем снова проходим этот диапазон и так получаем N резонансных пиков, которые обрабатываем в дальнейшем (ищем центр масс) и строим зависимость изменения резонансного пика от времени.

Для определения резонансной частоты колебаний пьезокерамического диска диаметром d используется формула [164]

$$f_p = \frac{1,35c}{2d} \quad (\phi 5)$$

c – скорость звука в пьезокерамике ЦТС19 составляет $2,95 \cdot 10^3$ м/с.

Согласно формуле для диска диаметром 3 мм резонансный пик должен быть на частоте 650 кГц (3,9/0,006).

Для измерения резонансной частоты биочипа используется плата цифрового синтезатора частоты. Частотный диапазон цифрового синтезатора должен полностью перекрывать диапазон колебаний биочипа.

В разрабатываемом решении биосенсора выбран следующий диапазон перестройки по частоте выходного сигнала цифрового синтезатора частот 1 кГц – 10 МГц. Для уверенной регистрации сигнала диапазон амплитуд выходного сигнала цифрового синтезатора частоты должен составлять 1 – 500 мВ.

Время поиска резонанса определяется требуемой точностью измерений. Обзорное измерение можно проводить за короткое время около 0,1 сек, что соответствует частоте перестройки цифрового синтезатора в 10 Гц. Детальное измерение резонанса биочипа должно проводиться на существенно более низкой частоте перестройки выходного сигнала цифрового синтезатора – до 0,01 Гц, что соответствует времени перестройки диапазона частот в 100 сек.

После получения данных с помощью ПО Фемтоскан Онлайн [165] рассчитывается центр масс пика, а затем погрешность результата. Был проведен эксперимент, в котором записывались результаты одного резонансного пика 500 раз со скоростью сканирования 0,1 Гц, данные записывались в текстовый документ с двумя столбцами в одном из которых амплитуда, а в другом частота. Центр масс рассчитывался по следующей формуле

$$f_{ц.м.} = \frac{\sum f_i n_i}{\sum n_i} \text{ (ф6)}$$

где f_i – частота, n_i – количество повторений частоты f_i , затем на график, который представлен ниже, наносился центр масс от количества сканирований. Черной линией показаны усреднения, синими точками – 500 измерений резонансной частоты (Рисунок 11).

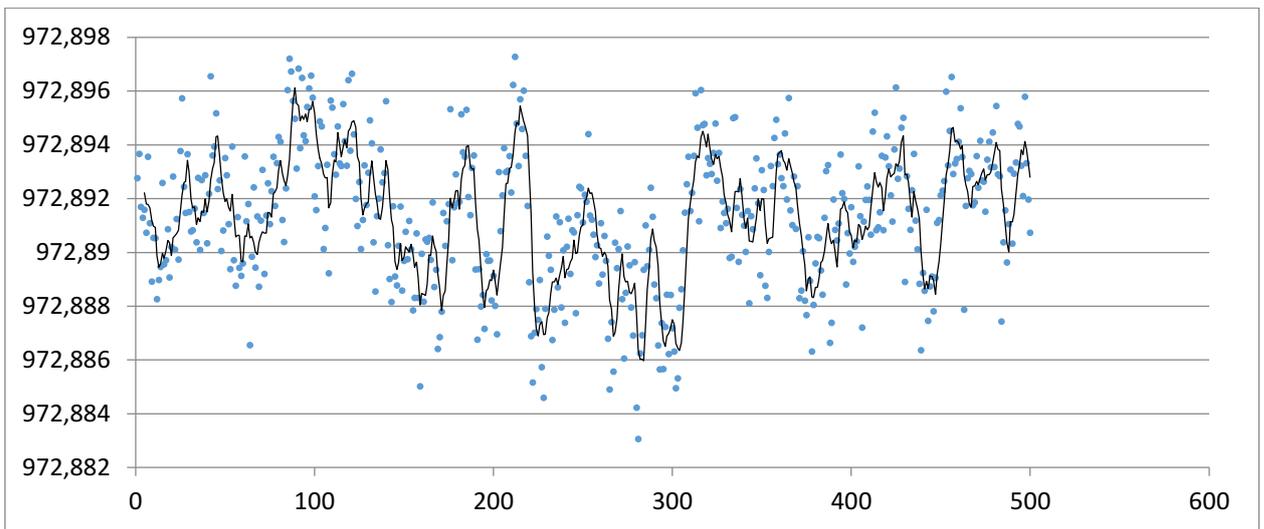


Рисунок 11. График измерения резонансной частоты пьезодиска, рассчитанный с помощью центра масс. Нижняя шкала – количество сканирований с частотой 0,1 Гц.

С помощью графика рассчитывалась погрешность измерения по формуле:

$$\Delta m = \frac{m\Delta f}{2f} \phi^7$$

где m – масса пьезокерамики, Δf – максимальная разность частот центра масс, f – средняя частота центра масс. Массу пьезокерамики можно было найти по формуле $m = \pi r h \rho$. Получается $\Delta m = 4,36 \cdot 10^{-10}$ г. Масса бактерии *E.coli* (с размерами 0,8x0,8x3 мкм) примерно равна $1,92 \cdot 10^{-12}$ г, разделяя одно на другое, можно показать, что порог обнаружения примерно равен 200-ам бактериям.

Проверка расчетного значения резонансной частоты пьезодиска осуществлялась на приборе NOVOCONTROL CONCEPT 40. Измеренные экспериментально и рассчитанные теоретически значения резонансной частоты для диска 3 мм в 650 кГц совпадают в пределах погрешности прибора (Рисунок 12).

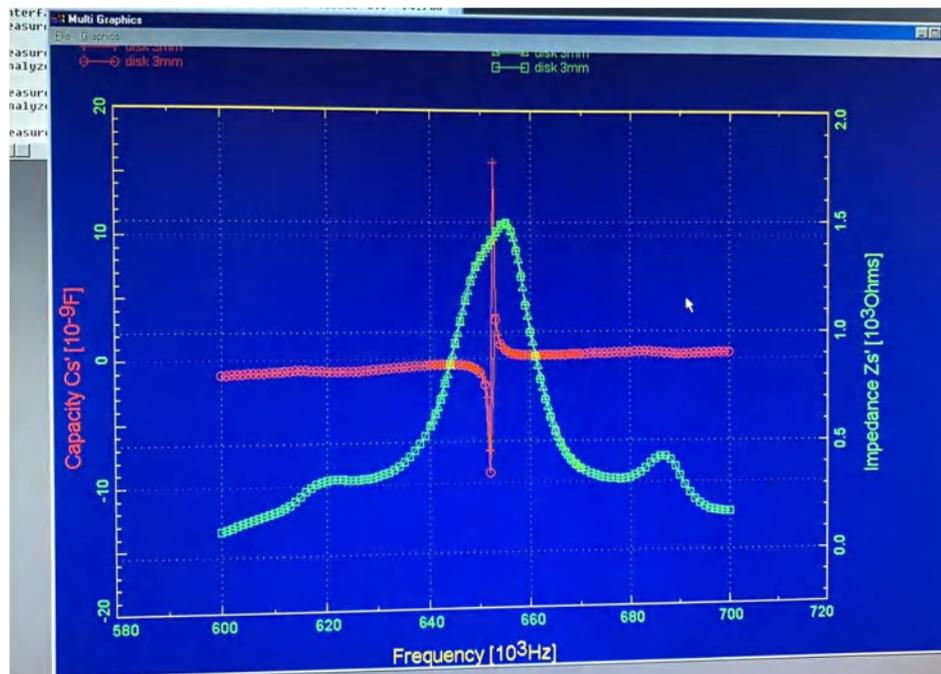


Рисунок 12. Измерение резонансной частоты пьезодиска диаметром 3 мм на диэлектрическом спектрометре NOVOCONTROL CONCEPT 40. На графике снизу указана частота, справа (зеленым) сопротивление, слева (красным) емкость. Пик на частоте 650 кГц.

Глава 3 Исследование структурных и морфологических особенностей клеток, вирусных и бактериальных частиц

3.1 Измерение шероховатости эритроцитов

Материалы и методы

Для исследований на атомно-силовом микроскопе была использована кровь здорового человека. Образец готовился на тонком стерильном стекле: каплю крови объемом примерно 10-12 мкл наносили на стекло, с помощью другого чистого стекла распределяли тонким слоем, помещая его под углом 45° коротким ребром. Изображение получено на микроскопе ФемтоСкан в контактном режиме АСМ на воздухе. В экспериментах использовался кантилевер марки frC01 с жесткостью 0,03 Н/м, время съемки кадра около 8 мин.

Для измерений на капиллярном микроскопе препарат клеток крови приготовлен путём помещения крови, забранной из пальца с использованием ланцета, в изотонический буфер Алена, который в дальнейшем служил и в качестве электролитической среды. Далее препарат наносился на свежесколотую слюду, предварительно модифицированную полилизинном, нейтрализующим отрицательный заряд поверхности слюды и позволяющим прикрепить живые клетки к подложке. Сканирование проводилось с капилляром 60/60, частота колебаний в hopping моде составляла привычные 15 Гц, в то время как амплитуда была увеличена до 3 мкм вследствие значительного перепада высот на исследуемых клетках. Контрольная точка падения величины ионного тока составляла 1,2 % от величины тока на удалении от образца. Размер кадра 10,317×10,317 мкм², разрешение 512×512 точек.

Постобработка снимков проводилась в ФСО посредством трёхпиксельной медианной фильтрации и выравнивания подложки на части снимков.

Результаты

На изображениях мазков крови, полученных с помощью АСМ, нормальные эритроциты выглядят как двояковогнутые диски с диаметром около 8 μm [166, 167]. Пример изображения эритроцита в мазке крови показан ниже (Рисунок 13). АСМ позволяет построить трехмерную карту поверхности эритроцита, измерить его размеры и шероховатость поверхности, с нанометровой точностью охарактеризовать элементы рельефа поверхности. В дополнение к исследованию топографических особенностей, с помощью АСМ исследуют жесткость эритроцитов.

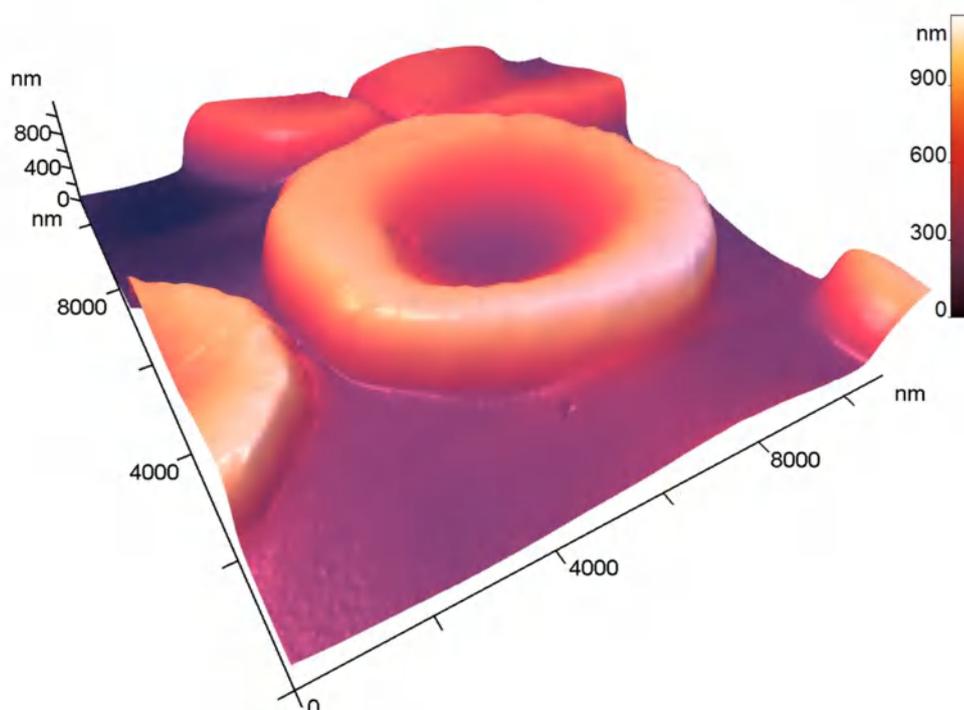


Рисунок 13. Атомно-силовая микроскопия эритроцита в мазке крови.

Линейные размеры эритроцитов (диаметр D , высота H , глубина углубления в центре h) определялись по профилям сечений (Рисунок 14). Площадь сечения проекции S и объем эритроцитов V рассчитывались по выделенной площади клеток. Среднеквадратичная шероховатость поверхности эритроцита (R_q) определялась по выступающим частям клетки, образующим кольцо. Дополнительно вычислялся коэффициент уплощенности клеток (Q), равный отношению площади проекции к высоте эритроцитов. Этот

коэффициент характеризует степень пластичности клеток [168]. Значения морфометрических параметров эритроцитов представлены (Таблица 2).

Таблица 2. Морфометрические характеристики эритроцитов, полученные с помощью АСМ

Эритроцит	D, нм	H, нм	h, нм	Rq, нм	V, $\mu\text{м}^3$	Q, $\mu\text{м}$
1	9014	513	395	33	13,54	87,8
2	7136	400	362	38	9,45	72,2
3	7545	547	400	29	15,52	62,4

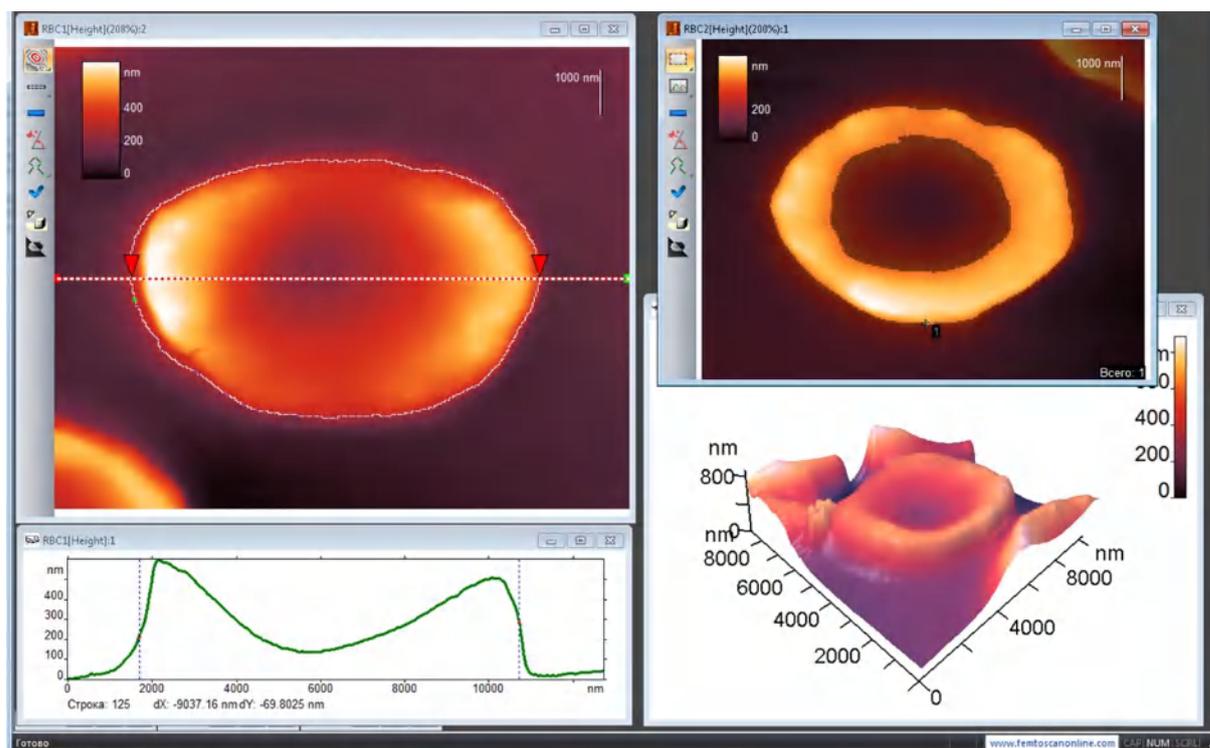


Рисунок 14. Анализ шероховатости эритроцитов. Верхний левый угол – 2D изображение эритроцита, внизу – сечение, справа сверху – выделенное изображение, по которому проводился анализ механических свойств эритроцита, внизу – 3D вид.

Также шероховатость можно рассчитывать по полной поверхности эритроцита, но для этого необходимо убрать крупный рельеф поверхности. В этом случае значение шероховатости изменяются. Из плоскости эритроцита выделяется область размером 6×4 мкм и вычитается средний наклон параболой. Таким образом можно убрать крупный рельеф клетки и рассчитать

среднеквадратичную шероховатость по всему кадру. В данном случае этот параметр составил 48,9 нм на основании 10 измерений.

Еще один способ измерить морфометрические показатели клетки шероховатость – рассчитать следующие параметры, построив 5 сечений на кадре 6x4 мкм:

R_a – средняя шероховатость, определяется как среднее арифметическое отклонение профиля от средней наклонной плоскости, проведенной методом наименьших квадратов.

R_q – среднеквадратичная шероховатость, показывает среднеквадратичное отклонение профиля поверхности относительно средней линии.

R_{max} – расстояние между наибольшим пиком и наибольшей впадиной на базовой линии (плоскости).

R_{sk} – параметр асимметрии. Профиль с положительным коэффициентом асимметрии имеет четкие высокие пики, поверхности с отрицательным коэффициентом асимметрии (пористые поверхности) имеют четкие глубокие впадины в гладких плато. В менее очевидных случаях $R_{sk} \approx 0$.

R_{ku} – мера эксцесса, характеризует ширину пиков или впадин, т.е. отклонение гистограммы от гаусовой формы. Если гистограмма имеет гаусову форму, то $R_{ku}=3$. Если профиль поверхности имеет вытянутые (узкие) пики или впадины, то показатель менее 3 [169].

Среднее значение шероховатости, измеренное с помощью АСМ по 10 эритроцитам, при расчете среднеквадратичной шероховатости по выделенному кадру составила 48,9 нм, при измерении по 5 сечениям R_a 31 нм, R_q 36 нм. По данным таблицам можно охарактеризовать средний профиль как имеющий узкие пики и впадины, при этом по параметру асимметрии в выборке поровну эритроцитов, имеющих глубокие поры в рельефе и имеющих выступы.

Таблица 3. Измерение шероховатости эритроцитов с помощью АСМ.

Погрешность измерений составляет 15%.

	Ra, nm	Rmax, nm	Rq по 5 сеч, nm	Rsk	Rku	Rq по кадру 6x4
1	45,46	201,30	54,48	0,41	2,27	62
2	23,18	99,23	27,18	-0,39	2,04	39
3	24,49	102,80	28,75	-0,39	2,07	37
4	21,45	95,21	25,20	-0,34	2,17	53
5	20,44	91,19	24,04	-0,38	2,24	38
6	37,20	139,10	42,64	0,27	1,81	54
7	47,27	153,20	52,35	0,31	1,59	47
8	62,90	232,90	74,03	0,62	2,14	68
9	23,78	91,06	27,51	-0,03	1,89	66
10	9,58	50,77	11,85	0,42	2,82	25
Средний показатель	31,57	125,67	36,803	0,04	2,1021	48,9

Шероховатость эритроцитов, исследованных с помощью СКМ, оценивалась методами, указанными выше. В таблице 5 приведены значения шероховатости, рассчитанные по выделенной площади эритроцита, в таблице 6 – параметры, рассчитанные по 5 сечениям и по кадру 6x4 мкм.

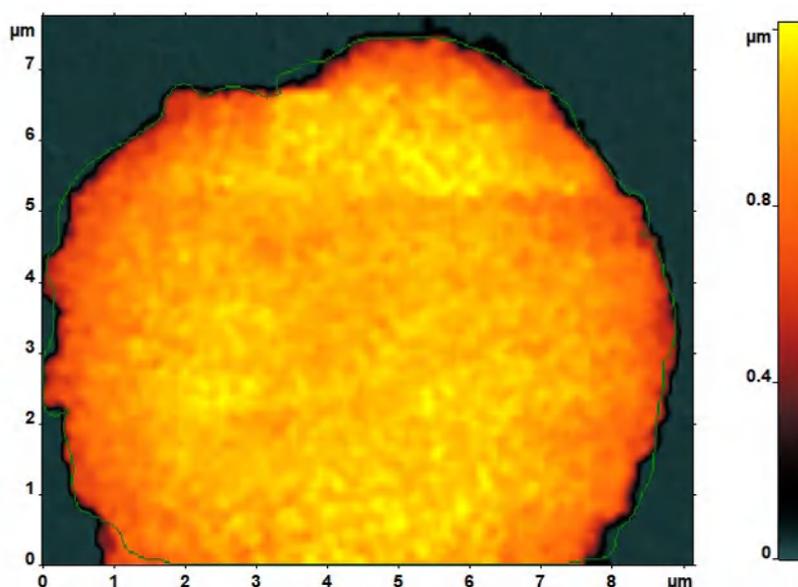


Рисунок 15. СКМ-изображение эритроцита, зеленой линией выделена область, по которой рассчитывается среднеквадратичное отклонение от плоскости.

Таблица 4. Параметры шероховатости эритроциты, рассчитанные по области: периметр, площадь, объем, среднеквадратичная шероховатость, высота, ср. высота.

P, μm	S, μm^2	V, μm^3	RMS, μm	H, μm	H av, μm
29,6	54,9	70,35	0.084	1.568	1.374

Таблица 5. Параметры шероховатости эритроцита, рассчитанные по 5 сечениям и по кадру 6x4.

	Ra, мкм	Rmax, мкм	Rq, мкм	Rsk	Rku
по 5 сечениям	0.02618	0.1419	0.03225	0.2137	2.79
по кадру 6x4	0,035	0,138	0,045	-0,2	3,4

При использовании методики вычитания крупного рельефа поверхности клетки параболой среднеквадратичная шероховатость по кадру 6x4 мкм составила: Ra 35 нм, Rq 45 нм.

Вывод

В данной работе сравнивались морфология и геометрические характеристики эритроцитов, измеренные с помощью АСМ на воздухе на покровном стекле и с помощью СКМ в жидкости на полилизине.

Значение объема эритроцита в СКМ по сравнению с исследованиями на воздухе на АСМ значительно изменилось, почти в 7 раз, а шероховатость осталась почти неизменной – Ra 35 ± 6 нм по данным СКМ и 31 ± 5 нм по данным АСМ. Таким образом, можно сделать вывод, что поверхность мембраны эритроциты не претерпевает значительных деформаций в процессе высыхания.

Из приведенных примеров видно, что поиск физических биомаркеров для эритроцитов в мазках крови является перспективным направлением. АСМ позволяет расширить диагностические возможности анализа мазка крови, но требуется дальнейшее накопление данных по эритроцитам, особенно по топографии клеток доноров с заболеваниями крови.

3.2 Измерение кинетики превращения эритроцитов в эхиноциты

Материалы и методы исследования

Для исследования кинетики превращения эритроцитов в эхиноциты в капиллярном микроскопе материалы и методы были подготовлены в соответствии с описанием из раздела 3.1.

Для исследования с помощью микролинзовой микроскопии был приготовлен буфер Аллена в соотношении 1 мкл крови на 500 мкл буфера. Состав и методика приготовления буфера была взята из работы [170]. После приготовления образца на чашку Петри помещались микросферы титаната бария, а сверху наносилась капля полученного раствора. Наблюдение проводилось на инвертированном микроскопе Nikon Ti-U Eclipse в режиме проходящего света.

Капля буфера с эритроцитами наносится сверху микросфер, расположенных на чашке Петри. Эритроциты вокруг микросфер попадают мимо на поверхность чашки Петри, при этом некоторые клетки находятся выше микросфер, можно наблюдать их увеличенное изображение (Рисунок 16).



Рисунок 16. Схема эксперимента в режиме проходящего света.

Результаты

В инвертированном оптическом микроскопе можно наблюдать превращение клеток крови от начального состояния дискоцитов в эхиноциты и далее в сформировавшиеся эхиноциты или сфероциты (*Рисунок 17*). Эхиноцит – форма эритроцита, который имеет аномальную клеточную мембрану, характеризующуюся множеством мелких, равномерно расположенных выступов – шипов.

В качестве объекта исследования был выбран жизненный цикл эхиноцитов крови: получены снимки дискоцита, переходящего в эхиноцит (*Рисунок 18 а и d*, снимок получен через 1 час после нанесения образца), формирующегося эхиноцита (*Рисунок 18 b и e*, 2 часа после нанесения) и сформировавшегося эхиноцита (*Рисунок 18 с и f*, 3,5 часа после нанесения).

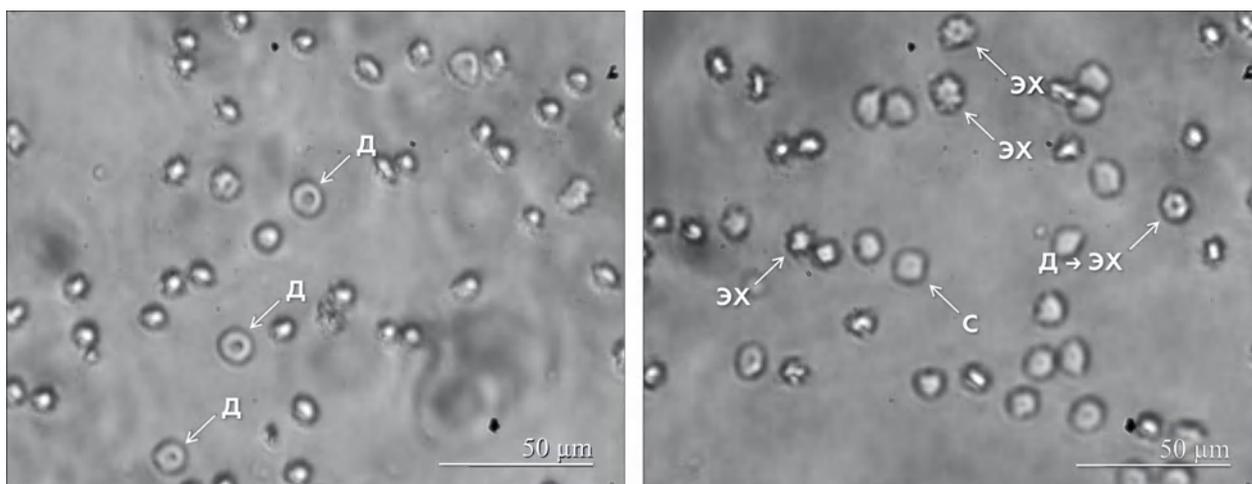


Рисунок 17. Оптические снимки клеток крови в процессе сканирования на капиллярном микроскопе. Стрелками отмечены дискоциты (Д), наблюдаемые сразу после нанесения, эхиноциты (ЭХ) и сфероцит (С). На правом кадре также можно наблюдать дискоцит, переходящий в эхиноцит (Д → ЭХ).

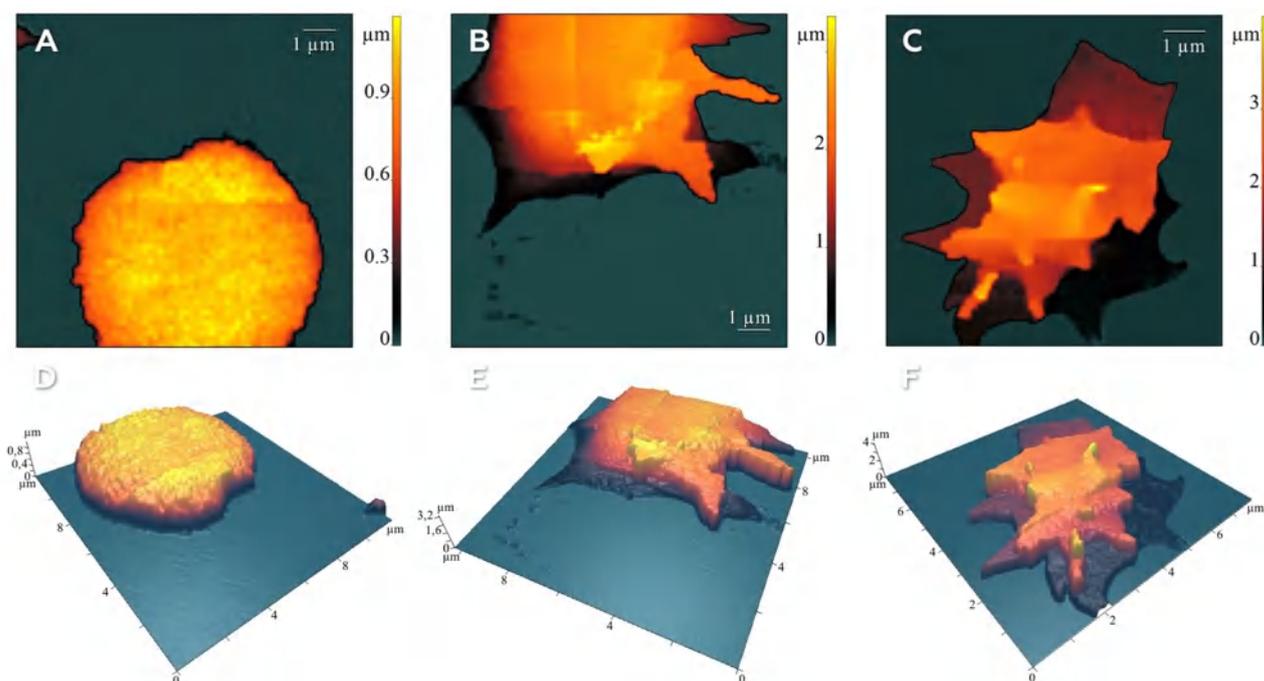


Рисунок 18. 2D и 3D топография исследуемых клеток крови в различные моменты времени: начало формирования эхиноцита через 1 час после нанесения образца (A и D), формирующийся эхиноцит через 2 часа после нанесения (B и E) и сформировавшийся эхиноцит через 3,5 часа (C и F).

На этапах жизненного цикла хорошо видны изменения морфологии клеток. Происходит уменьшение латеральных размеров и заметное вытягивание клетки в высоту, что хорошо отражают характерные сечения клеток (*Рисунок 19*). При переходе в эхиноцит изменяется двояковыпуклая форма, увеличивается высота клетки, на поверхности начинают образовываться шипы (*Рисунок 19а*). В процессе дальнейшего формирования эхиноцита образуются отростки в области прилегания к подложке, и происходит укрупнение шипов (*Рисунок 19б*), среднеквадратичная шероховатость вырастает до 0,15-0,2 мкм. У сформировавшегося эхиноцита присутствуют уже характерные отростки и крупные шипы (*Рисунок 19с*).

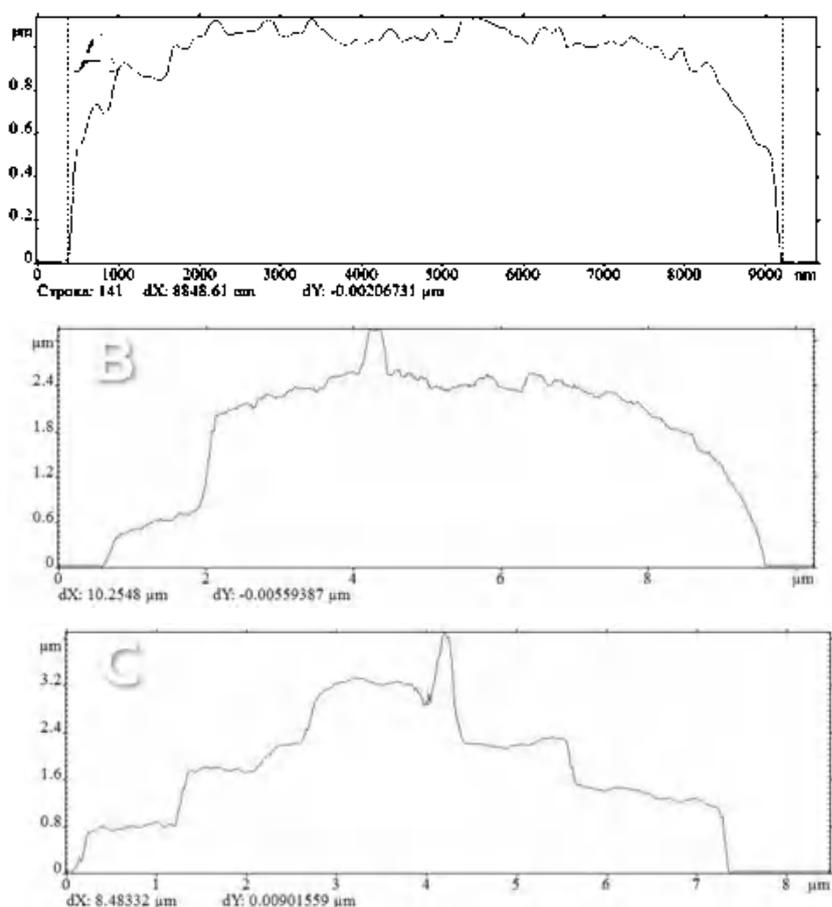


Рисунок 19. Характерные сечения исследуемых клеток крови, соответствующие А-С Рисунок 18.

Также были измерены латеральные размеры и высоты эритроцитов, трансформирующиеся в эхиноциты (Таблица 6).

Таблица 6. Характеристики клеток крови, полученные с помощью СКМ.

Время с момента нанесения, часы	Латеральный размер, мкм	Высота, мкм
1	8,8	1,1
2	7-9	0,5–2(отростки) 2,4 (средняя) 2,8 (шипы)
3,5	4,3-7,8	0,5–1(отростки) 2,7 (средняя) 3-4 (шипы)

При исследовании с помощью микролинзовой микроскопии показано, что средний размер эритроцита составляет около 7 мкм (Рисунок 20 А).

Поднявшись над уровнем поверхности образца на 67 мкм, можно наблюдать увеличенное изображение эритроцита (Рисунок 20 В). Размер получаемого оптического изображения в масштабе кадра составил 14,5 мкм. Увеличение, даваемое линзой ВаТiО₃ диаметром 52 мкм, составило около 2,07.

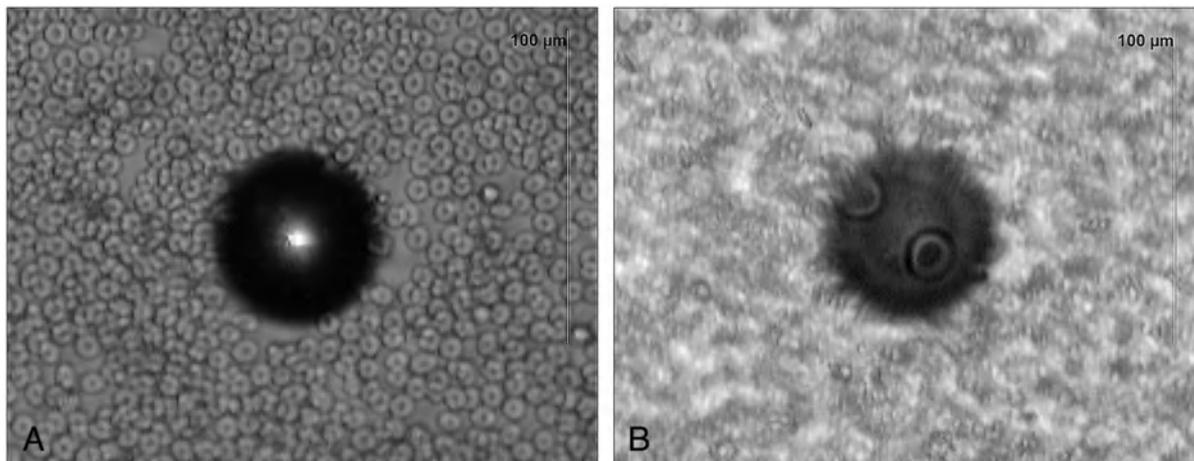


Рисунок 20. Наблюдение увеличенного изображения эритроцита. (А) Фокус находится на поверхности образца. (В) Фокус на изображение в микролинзе, находится на высоте 67 мкм над поверхностью образца.

Особый интерес представляет наблюдение кинетики трансформации эритроцита в эхиноцит с помощью микролинзовой микроскопии, т.к. в данном случае не требуется фиксации клеток и использования дополнительных меток. Были получены изображения с различных стадий превращения эритроцита (Рисунок 21 и 22). Увеличение объектива составляет 40х, диаметр микролинзы 52 мкм.

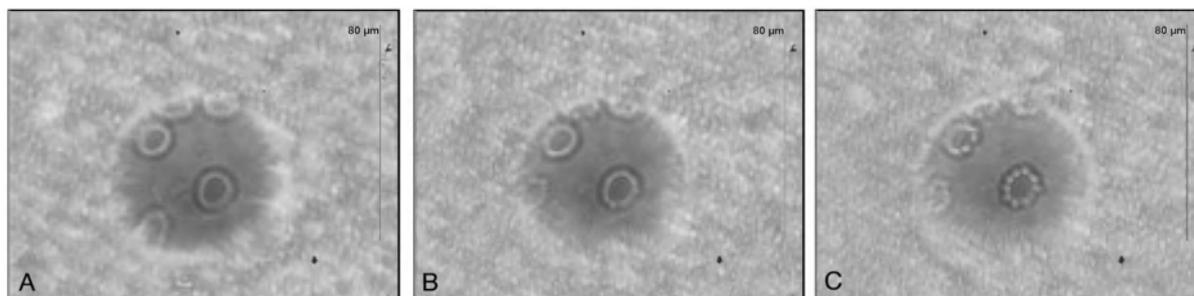


Рисунок 21. Изображения различных стадий трансформации эритроцитов. (А) Начальная стадия. (В) Состояние эритроцита через 40

минут: начинают появляться шиповидные структуры. (С) Состояние эритроцита через 70 минут: он превратился в эхиноцит.

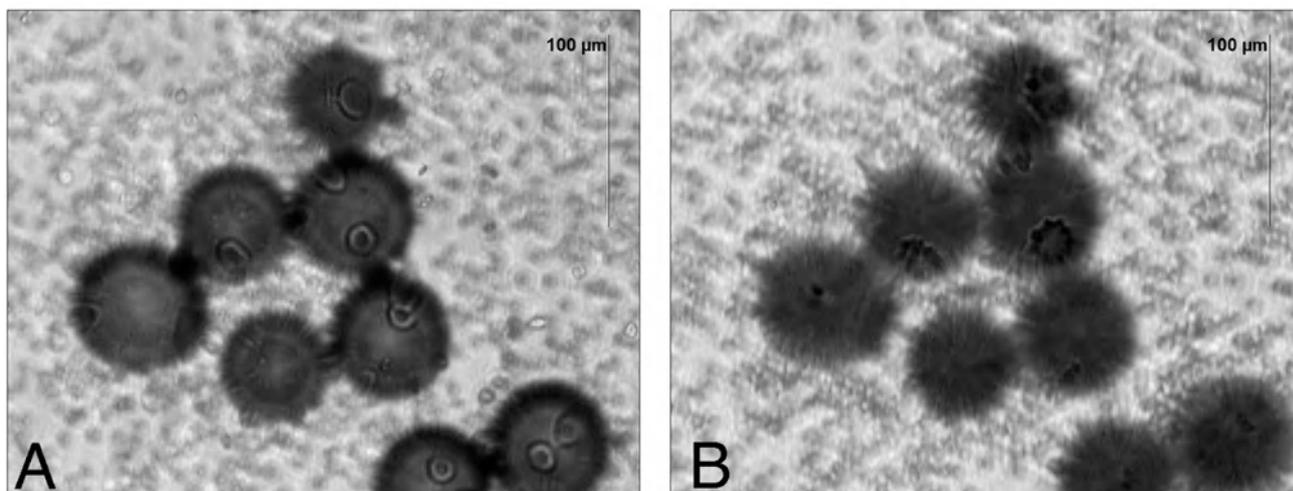


Рисунок 22. Изображения различных стадий трансформации эритроцитов. Общий план. Увеличение объектива 40х. (А) Начальная стадия. (В) Состояние эритроцитов через 70 минут: эхиноциты.

Вывод

Проведено исследование кинетики превращения эритроцитов в эхиноцит с помощью капиллярной и микролинзовой микроскопии. Средняя скорость превращения в эхиноцит при исследовании в микролинзы составила около 70 мин, при исследовании в капиллярном микроскопе – более 2 часов. Разная скорость трансформации эритроцитов, полученная с помощью данных методов, может объясняться фиксацией клеток полилизинном во втором случае, образцами крови от разных доноров, разной скоростью испарения воды из буфера, что влияет на морфологию клеток.

С помощью микролинзовой оптической микроскопии возможно измерить кинетику превращения эритроцита в эхиноцит без фиксации клеток и нанесения дополнительных меток, при этом получить увеличенное в 2 раза изображение по сравнению с обычной оптической микроскопии.

3.3 Влияние лекарственных препаратов на шероховатость клеток HeLa

СКМ позволяет исследовать фенотип и сформировать морфологический портрет опухолевых клеток, определить такие признаки, как форма, шероховатость, размеры клеток и ядра, расположение ядер (наличие скученности ядер), количество внутриклеточного вещества и др.

Материалы и методы исследования

Установка СКМ собрана на базе инвертированного оптического микроскопа Nikon Ti-U.

Объекты исследования – клетки карциномы человека (HeLa, Российская коллекция клеточных культур человека, животных и растений, Институт цитологии, Санкт-Петербург, Россия) выращивали в среде ДМЕМ (ПанЭко, Москва, Россия) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Logan, UT, США), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Москва, Россия) и раствора антибиотика-антимикотика (Gibco, Waltham, MA, USA). Фиксация клеток проводилась в 3,7 % параформальдегиде (PFA) в течении 10 минут, далее клетки отмывались в физрастворе (0,9 M NaCl), который в дальнейшем служил и в качестве электролитической среды в процессе сканирования.

Также рассматривались клетки под воздействием лекарственных препаратов. Образцы клеток HeLa были обработаны в течение 3,5 часов цисплатином в количестве 4 мкг/мл и нокодазолом в концентрации 10 нМ.

Нокодазол может связываться с тубулином и микротрубочками, тем самым подавляя динамику микротрубочек [171]. Механизм действия связан с нарушением полимеризации микротрубочек, в результате чего они теряют способность прикрепиться к кинетохорам (белковая структура на хромосоме) и деление клетки останавливается.

Цисплатин на клеточном уровне вызывает нарушение репликации ДНК и транскрипции, что ведёт к задержке клеточного цикла и апоптозу [172].

Фиксация клеток проводилась в 3,7 % параформальдегиде (PFA), перед сканированием клетки отмывались в физрастворе (0,9 М NaCl), который в дальнейшем служил и в качестве электролитической среды в процессе сканирования.

Сканирование проводилось капилляром с выходным отверстием около 100 нм, амплитуда и частота колебаний в режиме прерывистого контакта (hopping mode) составляли 1 мкм и 15 Гц, соответственно. Контрольная точка падения величины ионного тока составляла 1,2 % от величины тока на удалении от образца. Размер кадра 10,3 x 10,3 мкм², разрешение 512 x 512 точек.

Результаты

В инвертированном оптическом микроскопе наблюдалась организация клеточных структур на подложке: клетки собираются в островки, при этом заметны характерные отростки в местах присоединения клеток к подложке (Рисунок 23).

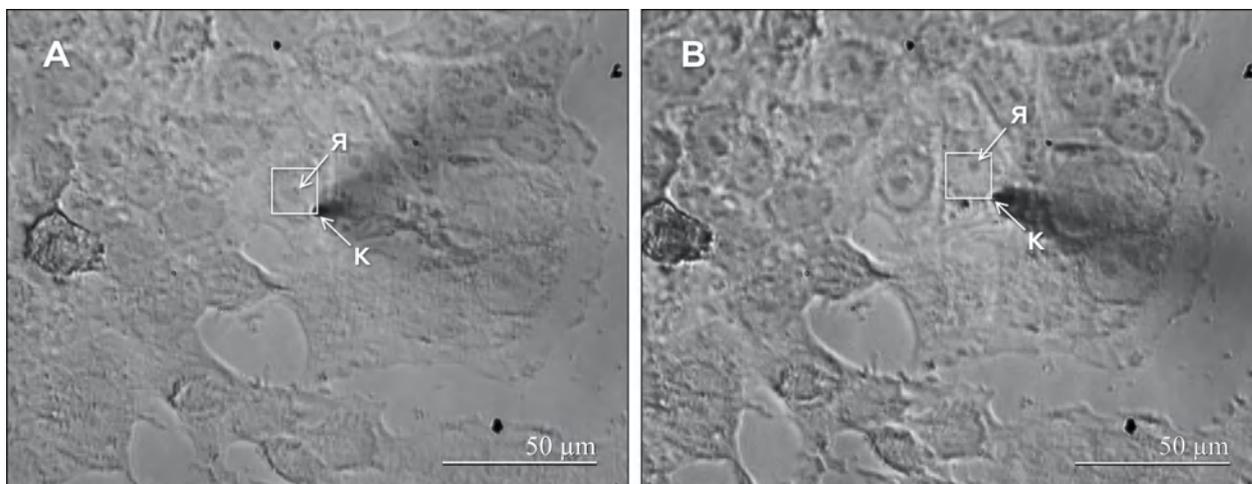


Рисунок 23. Оптические снимки сканируемых областей ядер клеток HeLa (A) и (B) с увеличением 40x. Стрелками (К) и (Я) отмечены кончик капилляра, который виден сквозь образец, и клеточное ядрышко соответственно.

Наблюдается морфология клеточной поверхности, которая также прямо указывает на организацию субмембранных структур: различимо ядрышко клетки (показано жёлтым градиентом), что отчетливо соотносится с данными оптической микроскопии (Рисунок 24).

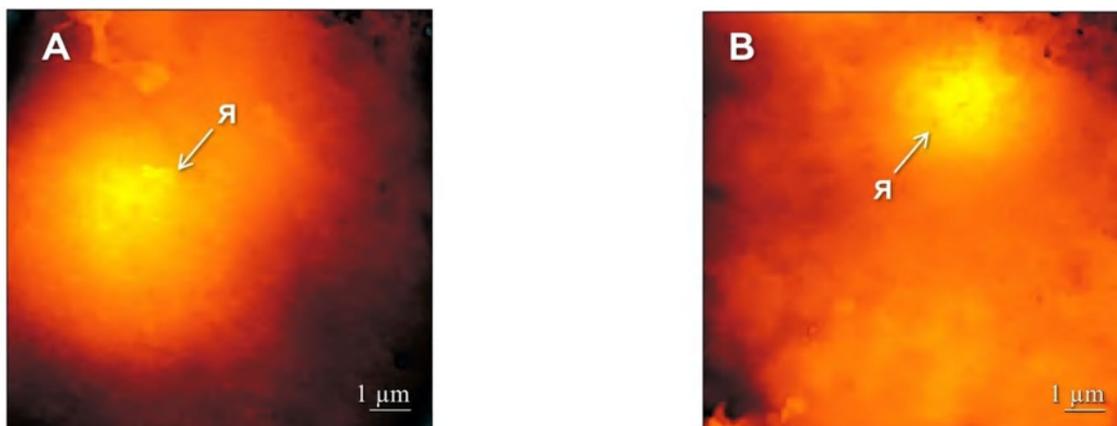


Рисунок 24. 2D топография сканируемых областей, стрелкой (Я) показана область клеточного ядрышка клетки HeLa.

Для изучения в капиллярном микроскопе сначала на оптическом микроскопе были выбраны характерные структуры клеток (Рисунок 25). Далее было получено 3 снимка в различных областях одной группы клеток.

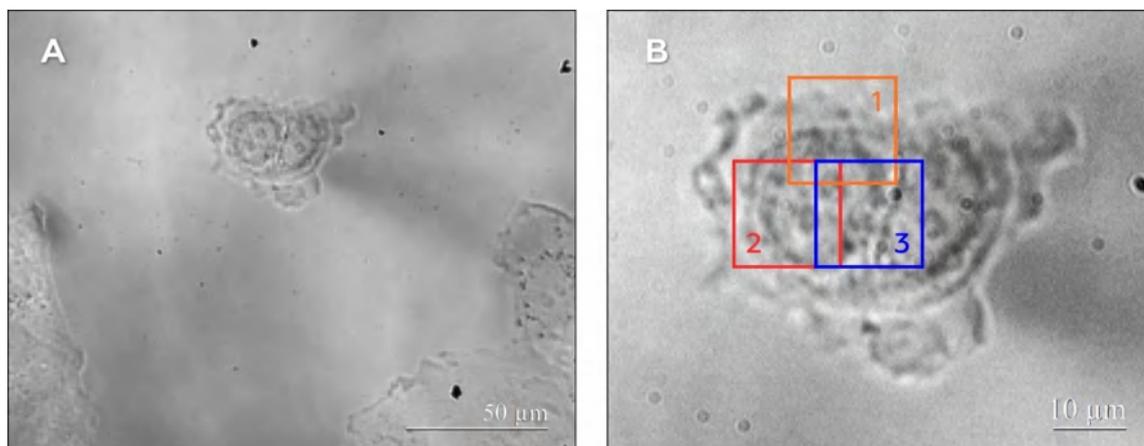


Рисунок 25. Оптические снимки сканируемой группы четырёх клеток HeLa с увеличением 40x (A) и цветом выделены контуры трех разных кадров выбранные для сканирования в капиллярном микроскопе области (B).

Показана морфология клеточной поверхности, которая также прямо указывает на организацию субмембранных структур: различимо ядро клетки

(показано желтым градиентом на 2D и 3D видах), что соотносится с данными оптической микроскопии (Рисунок 26).

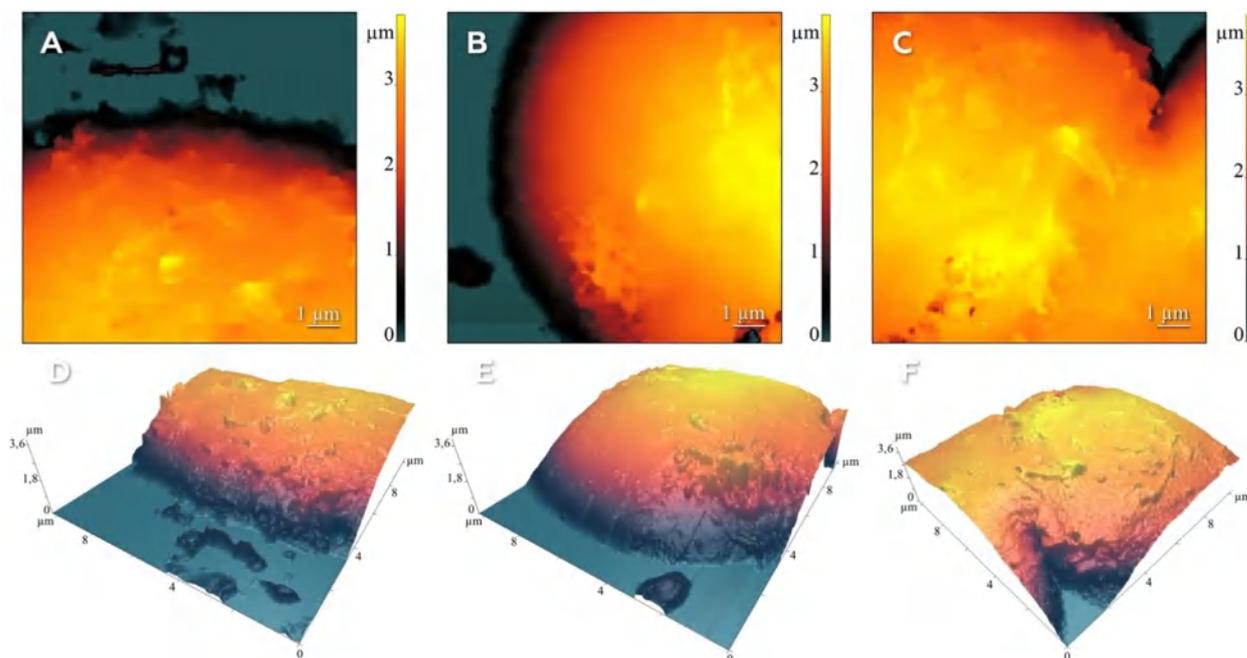


Рисунок 26. 2D и 3D топография сканируемых областей, отмеченных на Рисунок 25: область 1 – A) и D), область 2 – B) и E), область 3 – C) и F).

Также были получены оптические снимки отростков в области прилегания клеточных структур к подложке (Рисунок 27). В области «В» получено два кадра, при постобработке объединенные в один (Рисунок 28).

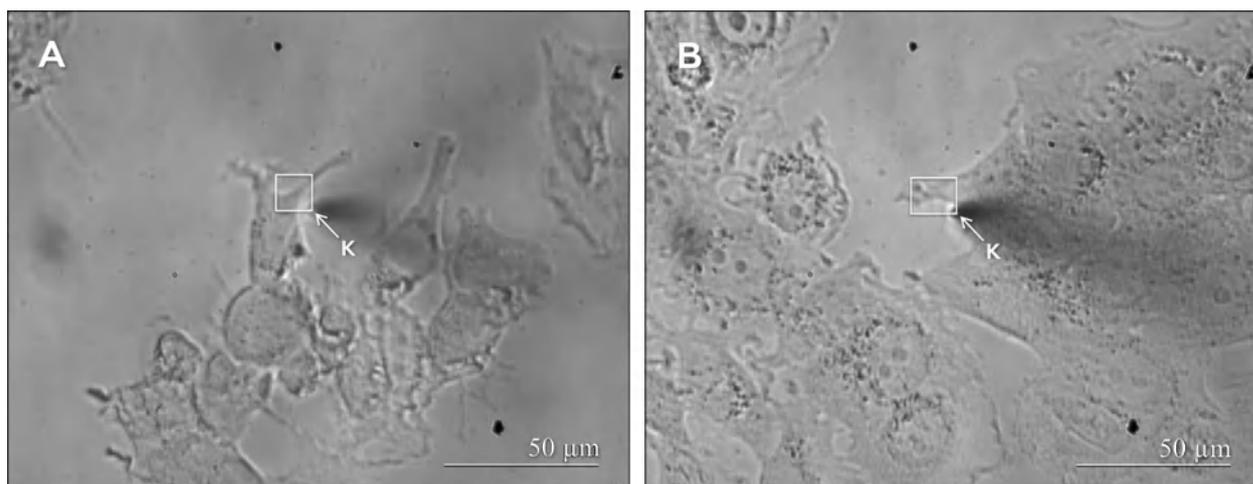


Рисунок 27. Оптические снимки областей с отростками и выделенными областями сканирования на капиллярном микроскопе. Стрелкой (K) отмечен кончик капилляра, который виден сквозь образец.

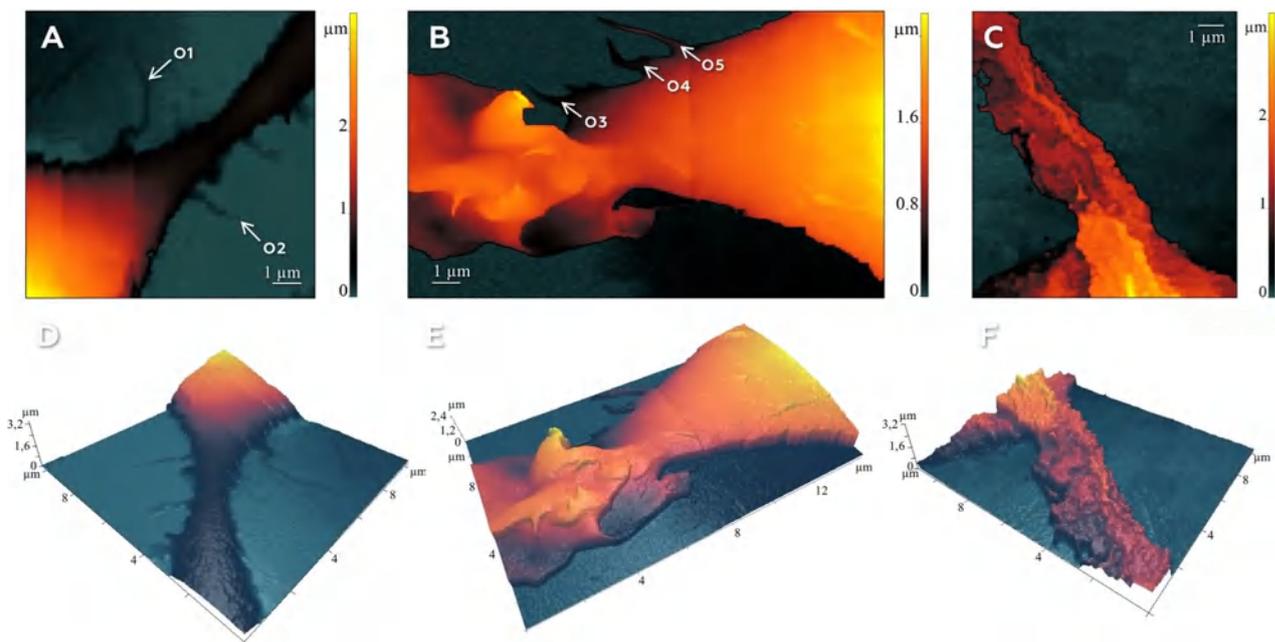


Рисунок 28. 2D и 3D топография сканируемых областей. Стрелками O1 – O5 обозначены отростки клеток.

Длина отростков варьируется от 1,5 мкм до 5 мкм, средняя высота отростков по данным сечения составляет 0,5 мкм. Параметры длины L , ширины d (1/2) и высоты h (1/2) на половине длины для каждого из отростков приведены ниже (Таблица 7).

Таблица 7. Характеристики отростков HeLa клеток

Отросток	L , нм	d (1/2), нм	h (1/2), нм
O1	5170	~ 300	~ 80
O2	3180	~ 380	~ 90
O3	1504	~ 320	~ 235
O4	1920	~ 285	~ 330
O5	2850	~ 170	~ 670

Для корректного определения шероховатости клеток было рассмотрено несколько методик обработки полученных данных. По аналогии с образцами эритроцитов при измерении шероховатости опухолевых клеток необходимо убрать крупный рельеф клетки, который вносит существенный вклад в

значение шероховатости. Для этих целей в простом случае можно удалить средний наклон по параболе, но рельеф клетки гораздо более разнообразный, в отличие от эритроцита. Поэтому также применялась функция «Выравнивание сплайном» с маской 100*100.

На основе полученных изображений клеток (контроль, обработанные цисплатином и нокодазолом) измерена средняя шероховатость поверхности клеток после обработки изображений – вычитания грубого рельефа по сплайну либо по параболе. При измерении шероховатости клеток под воздействием нокодазола и цисплатина были получены следующие данные (Таблица 8).

Таблица 8. Значение шероховатости опухолевых клеток: контроль, под воздействием нокодазола и цисплатина. Погрешность 15%.

Кадр	Шероховатость, нм (сплайн 100x100)		Шероховатость, нм (парабола)	
	Ra	Rq	Ra	Rq
Hela_001	99	133	64	84
Hela_005	52	68	67	95
Hela_006	56	75	57	72
Hela_009	71	97	50	74
среднее значение	70	93	60	81
Hela_цисплатин_001	50	77	58	84
Hela_цисплатин_002	92	138	79	126
Hela_цисплатин_003	55	75	49	63
Hela_цисплатин_004	63	91	70	100
среднее значение	65	95	64	93
Hela_нокодазол_001	106	135	61	84
Hela_нокодазол_004	84	108	104	135
Hela_нокодазол_005	86	110	88	115
Hela_нокодазол_006	103	134	57	74
среднее значение	95	122	78	102

Наибольшая шероховатость Rq 122±7 нм при вычитании сплайном и 102±6 нм при вычитании параболы получилась у клеток, обработанных нокодазолом.

Среднеквадратичная шероховатость контрольного образца составила 93±5 нм при вычитании сплайном, 81±5 нм при вычитании параболой. Под

воздействием цисплатина средняя шероховатость незначительно увеличивается, и под воздействием нокодазола среднее значение шероховатости составило 122 ± 6 нм и 102 ± 8 нм соответственно.

Вывод

Сканирующая капиллярная микроскопия позволяет не только визуализировать объекты в трёхмерном масштабе, но и даёт возможность получать и использовать ряд экспериментальных данных в диагностических целях. На основе полученных изображений измерена средняя шероховатость поверхности клеток карциномы человека, оценено воздействие лекарственных препаратов нокодазола и цисплатина на клеточную мембрану, показано увеличение шероховатости клеток при воздействии нокодазолом.

3.4 Морфометрический анализ вируса клещевого энцефалита (ВКЭ)

Материалы и методы

Возбудитель клещевого энцефалита – РНК-содержащий вирус диаметром 40-50 нм. На атомно-силовом микроскопе и предварительно на ПЭМ было исследовано три образца ВКЭ для определения методики наилучшей очистки образца.

Жидкие пробы инаktivированного (вакцинного) препарата ВКЭ. Препарат получен в соответствии со схемой: инаktivация, концентрация, очистка протаминсульфатом, осаждение ультрацентрифугированием вирионов, зональное сахарозное центрифугирование, смена буфера ультрацентрифугированием. Конечный буфер для образца – 20 мМ Tris-HCl, 26 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, pH 7,8.

Для ПЭМ образец контрастировали фосфорно-вольфрамовой кислотой. На сеточку нанесли 2,5 мкл пробы, выдержали 20 сек, далее нанесли 2,5 мкл контраста, выдержали 5-10 сек, далее промокнули, высушили.

Для АСМ 50 мкл осветлённый дополнительно очищали центрифугированием 5 мин на 1500 оборотах. Оценочная концентрация частиц – 12,4 log. 0,5 мкл образца нанесли на графит, добавили 3 мкл дистиллированной воды, выдержали 5 мин, остатки убрали промокательной бумагой. Визуализация проводилась в контактном режиме, модель кантилевера CSG01, жесткость кантилевера 0,03 Н/м, радиус кривизны кончика зонда 12 нм, частота сканирования 0,8 Гц, и разрешение кадра 512x512.

Результаты

На изображениях ПЭМ в образце присутствуют как целые частицы с характерным размером 39-45 нм, так и разрушенные (несколько частиц в правой части изображения). Форма не всегда правильно круглая, вероятно, вследствие инактивации и центрифугирования.

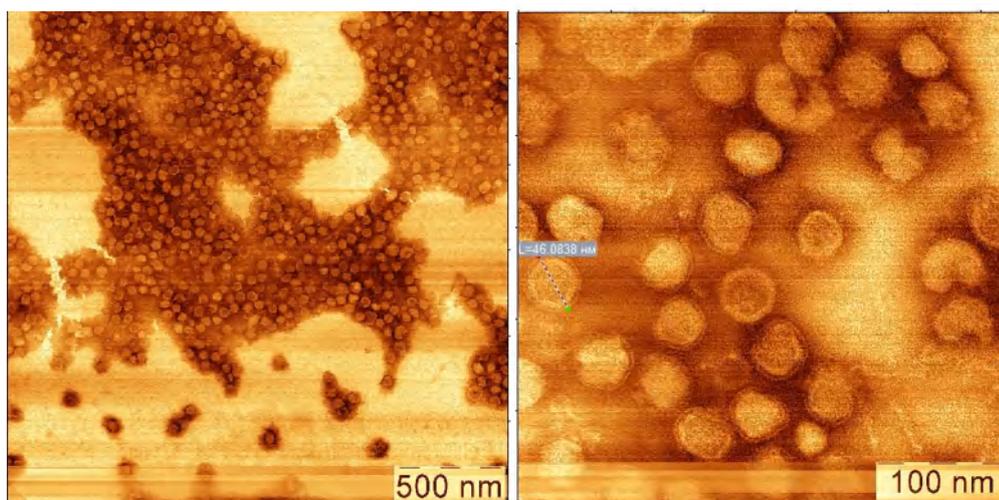


Рисунок 29. Просвечивающая электронная микроскопия ВКЭ. Диаметр частиц на рисунке справа – 46 нм.

По данным ПЭМ, на светлых областях возможно наличие еще частиц, но они недостаточно прокрасились. На изображении заметна оболочка вируса, размер примерно 3 нм. На образце присутствуют отдельные частицы, но, очень редко. Как правило, они встречаются агломерациями.

По данным АСМ, образец на поверхности графита расположился плотным слоем, местами заметно наличие нескольких слоев частиц, но в

размере кадра вирус вполне равномерно покрыл поверхность графита (Рисунок 30).

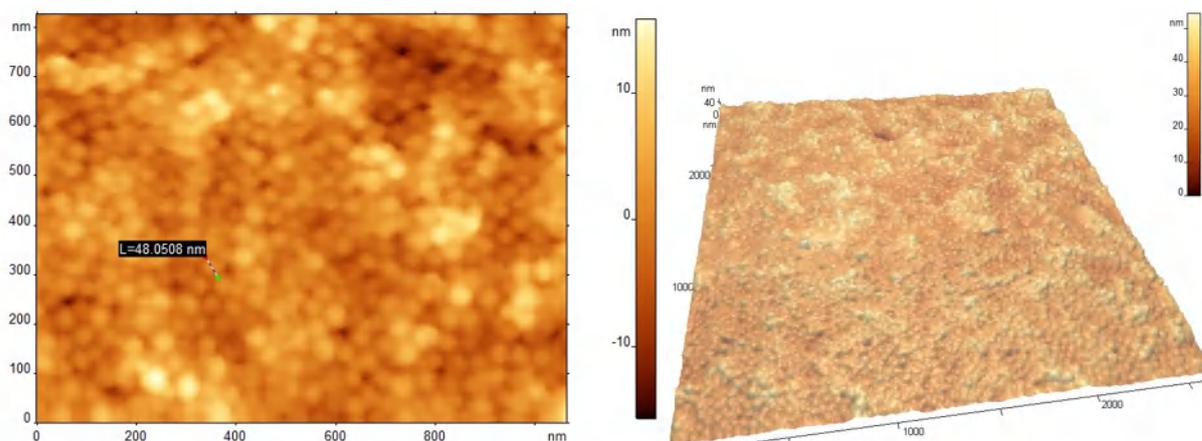


Рисунок 30. Слева 2D, справа 3D АСМ изображение вируса клещевого энцефалита на поверхности графита.

Оценочное значение коэффициента упругости вирусной частицы – 1 Н/м, что соответствует по формуле Герца 10^8 для радиуса кантилевера 12 нм.

Адсорбция вирусных частиц на подложках графита и слюды была оценена с помощью контактной АСМ. На поверхности слюды частицы не агломерируют и не слипаются. Вирусные частицы хорошо закрепляются на поверхности графита, даже после того как образец был промыт 5 мл дистиллированной воды, частицы не были смыты с поверхности (Рисунок 31). Вероятно, они частично удерживаются слоями графита и остаются на поверхности.

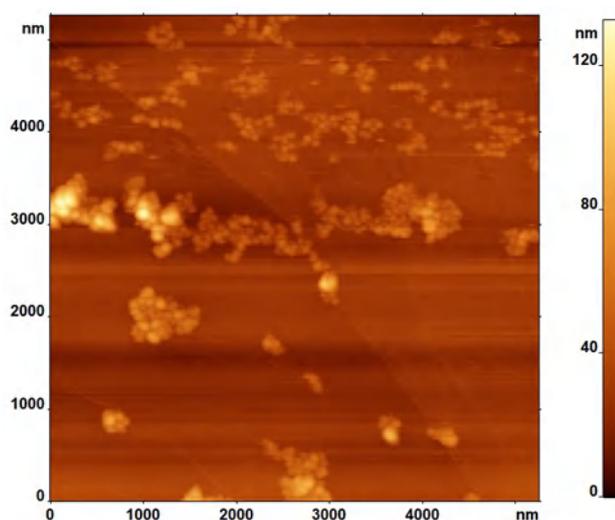


Рисунок 31. Вирусные частицы на поверхности графита.

Также было проведено сканирование поверхности монослоя вирусных частиц с разным приложенным значением силы: 10 нН, 20нН, 15нН (Рисунок 32). Перепад высот между значением силы в 20 нН и 10 нН составил почти 50 нм, что сопоставимо с диаметром частицы. Но при этом на изображении сами частицы не меняют форму, не появляются дополнительных артефактов.

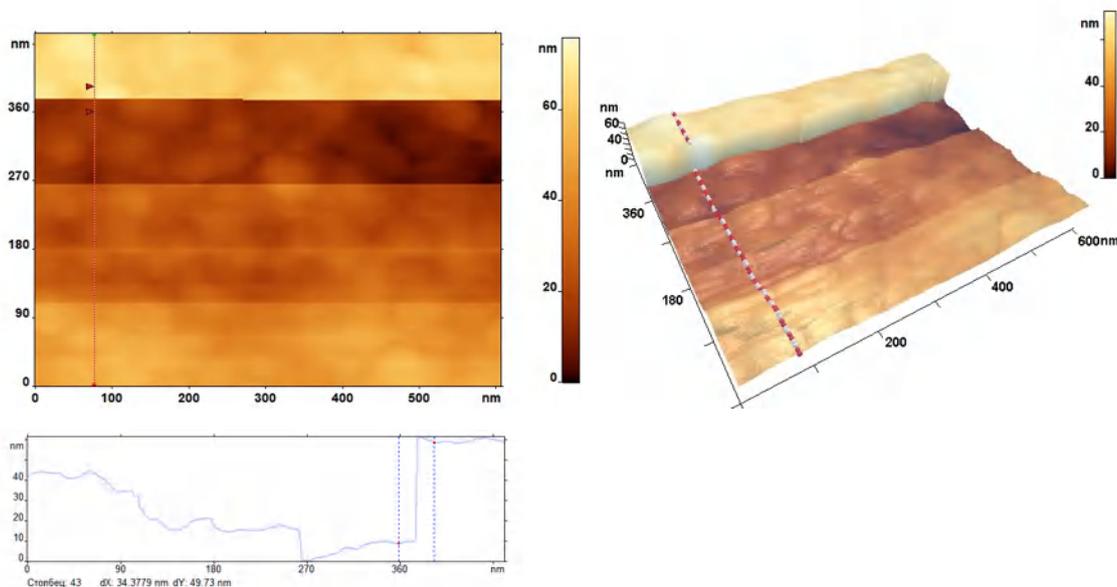


Рисунок 32. Изображение вируса клещевого энцефалита, полученное с разным значением приложенной силы. Вверху слева 2D, вверху справа 3D изображение, бело-красной пунктирной линией показано сечение. Перепад высот составил почти 50 нм между сканированием с силой 10 нН и 20 нН.

Вывод

По итогам проведенных измерений было показано, что частицы вируса клещевого энцефалита даже после инактивации остаются достаточно упругими, при разной приложенной силе не деформируются, хорошо фиксируются на поверхности графита, не слипаются в плотные агломерации. При адсорбции на графит и слюду частицы ложатся равномерно, не агломерируют, при большой концентрации вирусные частицы стремятся расположиться равномерным слоем.

3.5 Исследование адсорбции вируса гриппа А

Вирус гриппа А (*Influenza virus*) – это оболочечный вирус, характеризующийся наличием сегментированного негативного РНК-генома и нуклеокапсида в форме спирали. Он относится к семейству *Orthomixoviridae*. Серотип А встречается как людей, так и у животных, и именно он ответственен за подавляющее большинство случаев сезонных (эпидемических) и пандемических вспышек гриппа.

Материалы и методы

Вирусы гриппа и аллантоисная жидкость предоставлены Федеральным научным центром исследований и разработок иммунных и биологических препаратов им. Чумакова РАН. Предварительно была сделана визуализация образцов с помощью просвечивающей электронной микроскопии (*Рисунок 33*).

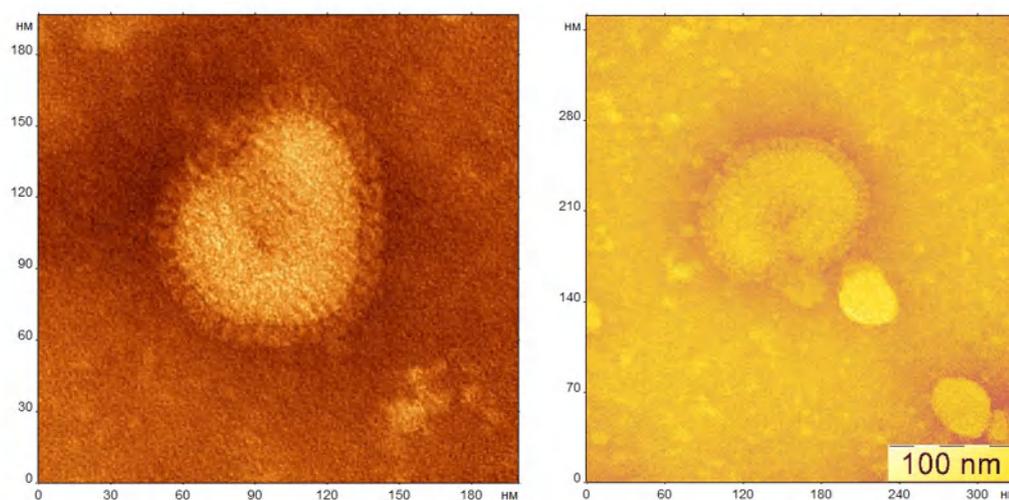


Рисунок 33. Просвечивающая электронная микроскопия вирусных частиц гриппа А: H4N6 (слева) и H3N6 (справа).

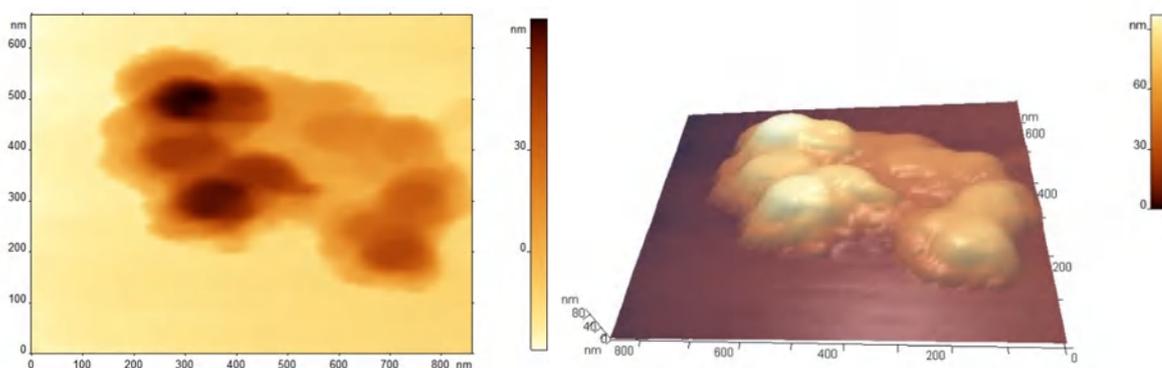


Рисунок 34. Атомно-силовая микроскопия вируса гриппа. Ореол вокруг вирусных частиц соответствует оболочке из гемагглютинаина. Слева двумерный вид, справа – трехмерный вид. [173]

Были изучены следующие вирусы: вирус гриппа А A/chicken/Rostock/45/1934 (H7N1) 6-го пассажа [174]. Вирусные запасы размножали в аллантоисной полости 10-дневных эмбрионов куриных яиц, свободных от специфических патогенов. Яйца инкубировали при 37°C, охлаждали при 4°C через 48 ч после заражения и собирали через 16 ч. Дизайн исследования одобрен Этическим комитетом НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова, Москва, Россия (разрешение №4 от 2 декабря 2014 г.). Вирусы инактивировали добавлением 0,05% (об./об.) глутарового альдегида, консервировали добавлением 0,03% (вес./об.) NaN_3 и хранили при +4°C. Концентрацию вирусов определяли в реакции гемагглютинации по Киллиану [175]. 50 мкл растворов вирусов, разведенных поэтапно в 2 раза в фосфатно-солевом буфере, помещали в V-образный 96-луночный микротитровальный планшет в объеме 50 мкл. Затем в лунку добавляли 50 мкл 0,5% куриных эритроцитов в фосфатно-солевом буфере. Планшет выдерживали в холодильнике при 4°C в течение 1 часа. Затем оценивали титр гемагглютинации как максимальное разведение вируса, не вызывающее преципитации эритроцитов; эта лунка содержала 1 НАУ вируса в пробе.

Итоговый раствор пропустили через мембрану с порами размера 200 нм, в результате чего получили 2 вида образцов: вирусные частицы, прошедшие через мембрану, и частицы, оставшиеся после фильтрации. Первый образец с

концентрацией $4,6 \cdot 10^{11}$ частиц/мл в объеме 0,5 мл смешали в соотношении 1:1 с дистиллированной водой и нанесли 1 мл на подложку из графита. Второй образец с концентрацией $9,5 \cdot 10^{11}$ частиц/мл в объеме 1 мкл мы нанесли на графит и дали высохнуть в течение 5 минут, затем добавили 2 мкл дистиллированной воды, отмыв образец.

Визуализация проводилась в контактном режиме, модель кантилевера CSG01, жесткость кантилевера 0,03 Н/м, радиус кривизны кончика зонда 12 нм, частота сканирования 0,8 Гц, и разрешение кадра 512x512. Для резонансной микроскопии использовался кантилевер NSG01 ANN.

Результаты

Цель данного исследования заключалась в том, чтобы подтвердить изменение характера адсорбции и размера вирусных частиц после прохождения образца через мембрану.

Сначала было проведено контрольное измерение образца с вирусными частицами на поверхности графита (*Рисунок 35*). 1 мкл образца вируса наносили на графит, сканирование проводилось в контактном режиме, кантилевер CSG01.

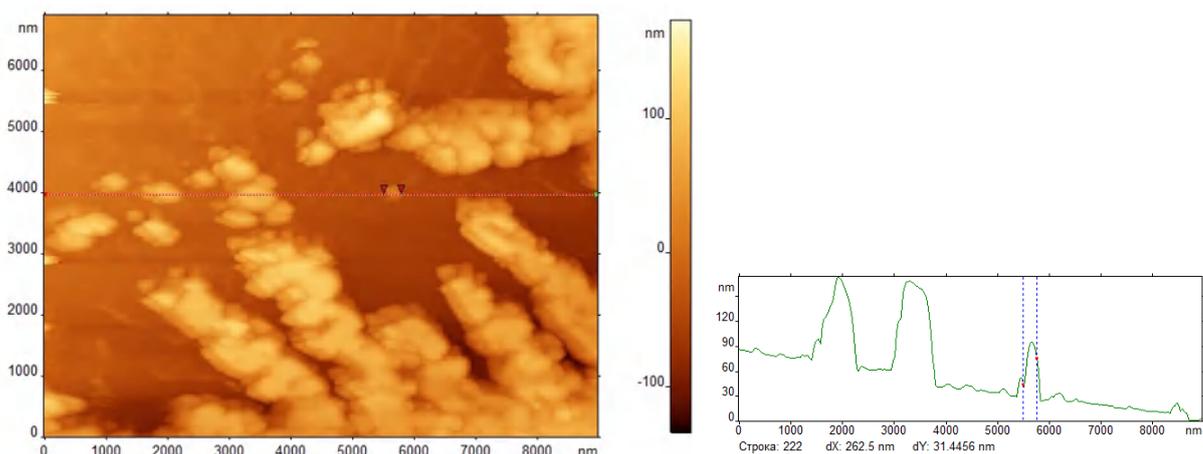


Рисунок 35. Образец вируса гриппа Rbr на графите. Изображение получено в контактном режиме. Вирусные частицы агрегировали.

Далее исследовались образцы вируса, прошедшие через мембрану. В первой фракции, не прошедшей через мембрану, было выявлено большое количество агрегатов, характерный диапазон высот достигает 180 нм. Во

второй фракции, отфильтрованной мембраной, обнаруживаются нанообъекты диаметром около 100 нм, характерный диапазон высот не превышает 40 нм (Рисунок 36).

Вирусы гриппа А имеют тенденцию образовывать агрегаты, так как гемагглютинин одной вирусной частицы связывает сиаловые кислоты на другой вирусной частице. Предположительно, этот процесс мог усиливаться при фильтрации через мембрану.

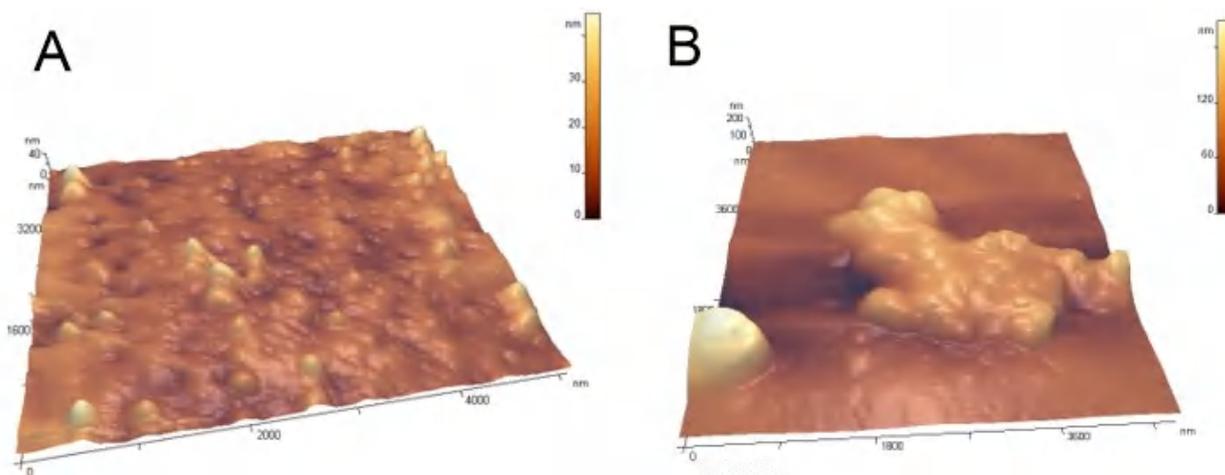


Рисунок 36. Атомно-силовая микроскопия изображений вирусов гриппа А, которые прошли через мембрану (А) и удерживаются мембраной (В). Максимальная высота на изображении А находится в пределах 30-40 нм, на изображении В около 180-200 нм.

Для подтверждения избирательной сорбции вирусных частиц гриппа А на SERS-сенсоре также проводилось исследование кремниевых подложек с напылением из серебра.

Подготовка SERS-сенсора на вирус гриппа А осуществлялась в несколько этапов:

- 1) Инкубация кремниевой пластины в аптамере с тиомодификацией.
- 2) Опытная зона – выдерживалась в образце вируса гриппа А H7N1, а контрольная зона – в NDV.
- 3) Инкубация в аптамере с флуоресцентным красителем.
- 4) Отмывка в воде.

Исследован характер адсорбции вирусных частиц на SERS-сенсоре в резонансном режиме АСМ. Концентрация частиц вируса в образце составила 10^2 на мл. На изображении виден монослой частиц, характерный размер частиц 80-120 нм, средняя высота 20-50 нм (Рисунок 37).

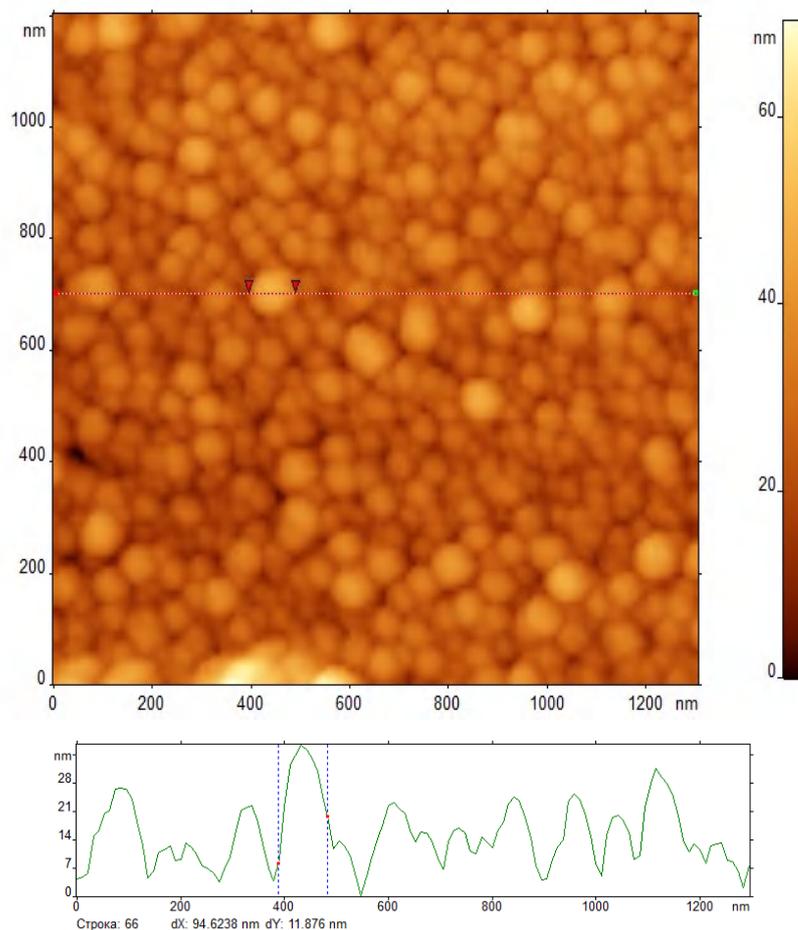


Рисунок 37. Опытная зона. Вирусные частицы гриппа А равномерно распределились по поверхности сенсора.

При исследовании контрольной зоны на образце обнаруживаются лишь частицы серебряного напыления, адсорбции вируса болезни Ньюкастла (NDV) не произошло (Рисунок 38).

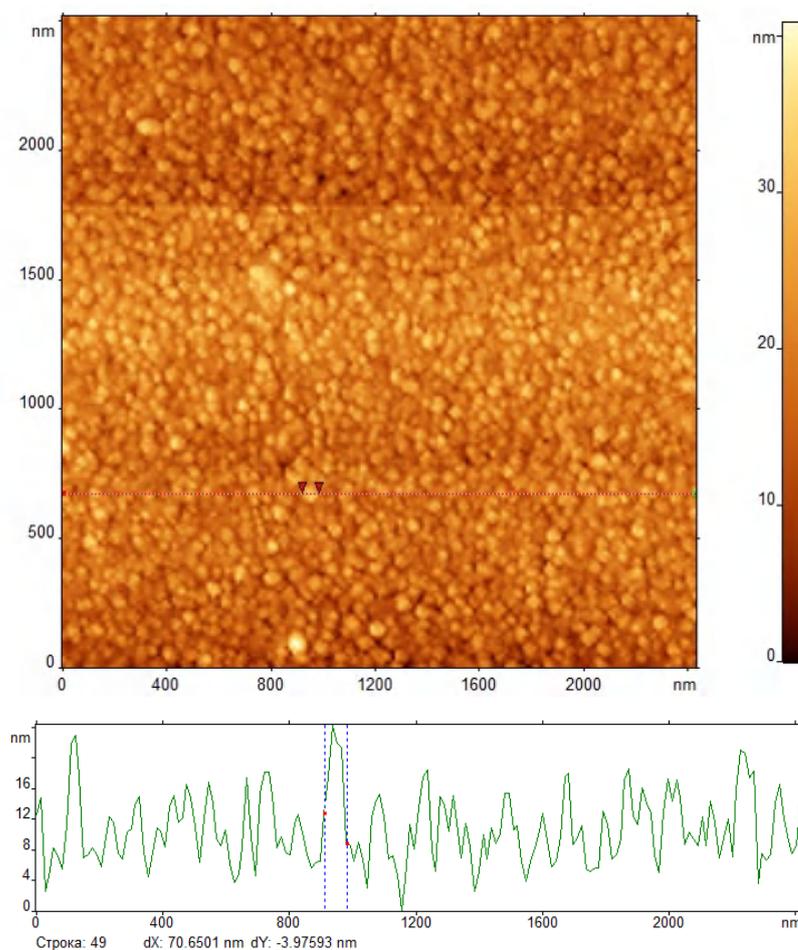


Рисунок 38. Контрольная зона (чистая подложка). Зафиксировано равномерное распределение частиц серебра.

Вывод

Важным моментом является снижение концентрации низкомолекулярных веществ и макромолекул в образце во избежание неспецифических взаимодействий. Вирусы гриппа в основном имеют сферическую форму с характерным диаметром 100 нм, однако вирусы склонны к образованию агрегатов и нитевидных структур размером 300 нм и выше [176]. Мембрана с размером пор 320 нм была использована для дальнейшей пробоподготовки образца вируса. Собирали около 200 мкл раствора после фильтрации и промывали мембрану 200 мкл буфера для вымывания вируса, не прошедшего через мембрану. Содержание вируса в этих двух фракциях оценивали методом гемагглютинации. Раствор после фильтрации содержал 1000 ГАЕ/мл вируса гриппа А (25%); промывка

мембраны содержала 500 НАУ/мл (12,5%). т.е. 62,5% вируса уложены внутри мембраны. Таким образом, концентрация вируса в очищенном образце уменьшилась в 8 раз, однако фильтрация значительно улучшила характеристики образца.

С помощью АСМ была подтверждена эффективность использования мембраны для селективной фильтрации частиц вируса гриппа. Подтверждена избирательная способность сенсора на кремнии с аптамером, в зоне эксперимента наблюдается монослой вирусных частиц, в контрольной зоне присутствуют лишь серебряные наночастицы. Проведено сравнение с контрольным образцом на графите, где частицы агломерируют, в образце присутствуют соли и посторонние частицы, которые не обнаруживаются в зоне эксперимента на кремниевых подложках с аптамером, и в образце, отфильтрованном мембраной.

3.6 Влияние биоцидных препаратов на морфологию бактериальных клеток

В разделе описаны результаты АСМ исследований морфологии и геометрических характеристик бактерий *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria flavescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Проведено сравнение влияния инкубирования в водном растворе олигогексаметиленгуанидина (ОГМГ), полимерного биоцида широкого спектра действия, подавляющего развитие различных бактерий и грибов, а также препятствующего образованию биопленок [177], на образцы бактериальных и грибковых культур. Описаны результаты АСМ исследований влияния ОГМГ на морфологию, геометрические характеристики и процесс осаждения биопленки на подложку из слюды.

Материалы и методы

Цель работы - оценка влияния дезинфектанта ОГМГ на морфологию бактериальных и грибковых клеток. Исследованы подложки с различной

концентрацией препарата, воздействующего на клеточные и грибковые культуры. [178, 179]

Тест-штаммы микроорганизмов, использованных в работе:

1. *Staphylococcus aureus* R 116-14 (МБК=32 мг/л).
2. *Staphylococcus epidermidis* R194-18 (МБК=16 мг/л).
3. *Neisseria flavescens* F 502-18 (МБК н/о).
4. *Pseudomonas aeruginosa* Z720-17R (МБК=32 мг/л).
5. *Candida albicans* G21-0218 (МБК=2 мг/л).
6. *Aspergillus niger* F503-18 (МБК н/о).

Культуры бактерий инкубировали на кровяном агаре в течение 24 ч при 36С, культуры грибов – на агаре Сабуро в тех же условиях. По окончании инкубирования культуры суспендировали в физрастворе до финальной плотности суспензии порядка 10^9 КОЕ/мл.

Суспензия бактерий смешивалась с равным объемом водного раствора ОГМГ или воды (контроль) и инкубировалась в течение 15 минут при комнатной температуре. Использовали растворы ОГМГ с концентрацией 100 мг/л и 40 мг/л. После инкубирования 5 мкл суспензии наносились на свежесколотую слюду и высушивались, помещались в индивидуальные чашки Петри, фиксировались на двухсторонний скотч.

Всего подготовлено по 3 образца на каждый штамм микроорганизма (ОГМГ 100 мг/л, 40 мг/л и контроль (вода)).

Измерения проведены в контактном режиме, кантилеверы CSG01. Использовались стандартные фильтры вычитания плоскости постоянного наклона и выравнивания по строкам. В данной работе исследовались бактериальные клетки, подготовленные Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Результаты

***Образец Staphylococcus epidermidis* К**

Staphylococcus epidermidis в основном колонизирует кожу человека и представляет опасность для здоровья из-за участия в внутрибольничных инфекциях. Колонии *S. epidermidis* округлые, приподнятые, блестящие, серые, с ровными краями, представляет собой грамположительную бактерию. Диаметр клетки составляет от 0,6 до 1,2 мкм [180]. *Staphylococcus epidermidis* склонны образовывать биопленки на поверхности. На контрольном образце хорошо различимы шаровидные бактерии, частично клетки прикреплены к кристаллу соли, осевшему из буфера. Встречаются единичные экземпляры или небольшими группами. Длина частицы 712 нм.

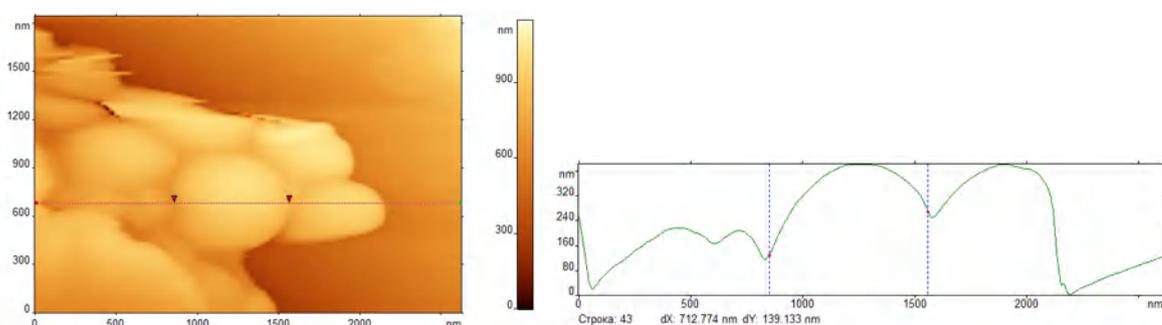


Рисунок 39. Контрольное изображение *Staphylococcus epidermidis*. Размер выбранной частицы 712 нм, высота около 600 нм по данным сечения.

Образец *Staphylococcus epidermidis* 40

Образцы бактерий гладкие, без видимых нарушений оболочек. Преимущественно бактерии встречаются плотными колониями.

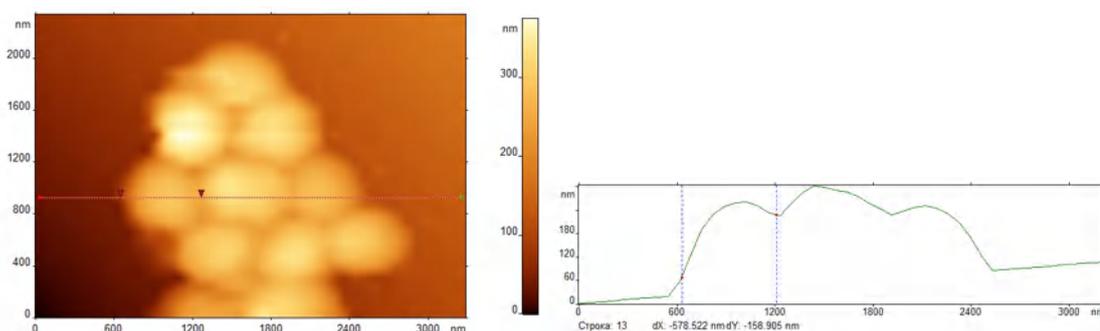


Рисунок 40. *Staphylococcus epidermidis* 40. Длина частицы 578 нм, высота до 300 нм.

Образец *Staphylococcus epidermidis* 100

Аналогично предыдущему образцу частицы гладкие без морфологических нарушений оболочек, встречаются исключительно

плотными колониями. На подложке присутствует пленка, а также выпавшие соли из буфера, которые слегка смазывают изображение.

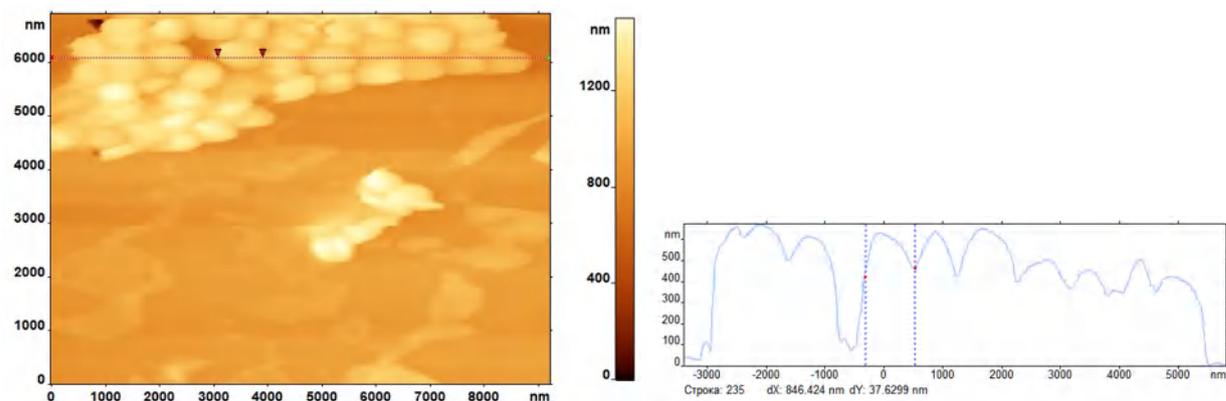


Рисунок 41. *Staphylococcus epidermidis* 100. Размер частиц на сечении составляет около 850 нм, высота около 600 нм.

Образец *Staphylococcus aureus* K

Staphylococcus aureus – вид шаровидных грамположительных бактерий из рода стафилококков, длина которой 0,5—1,0 мкм, является одним из распространенных патогенов внутрибольничных инфекций. На контрольном образце шарообразные бактерии представлены небольшими и неплотным группами из 5-6 бактерий. Оболочки гладкие и ровные.

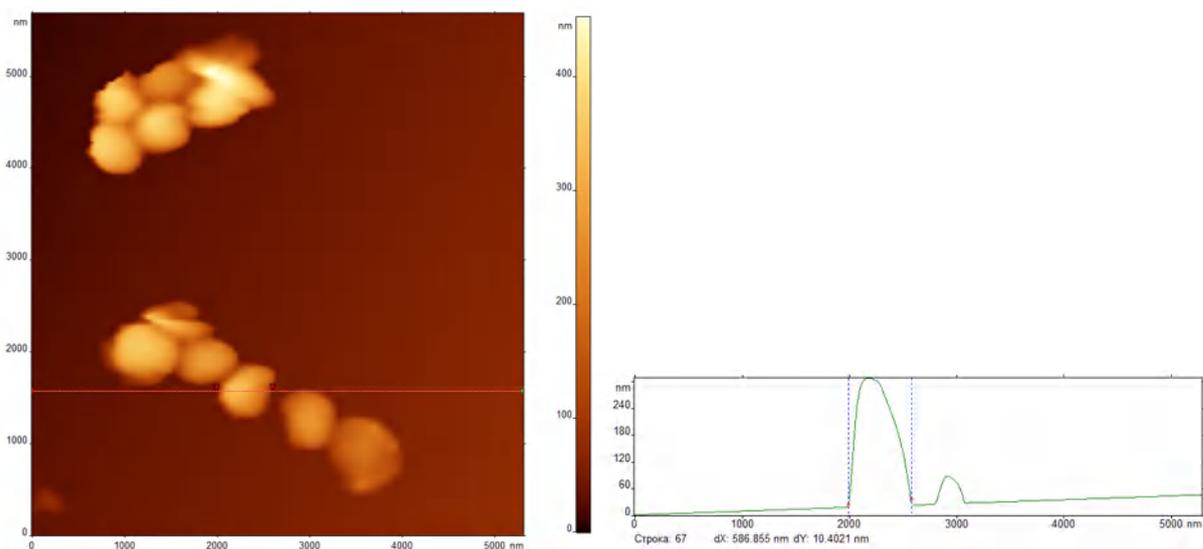


Рисунок 42. *Staphylococcus aureus* K. Вверху слева 2D вид, вверху справа – 3D вид, внизу – сечение. По данным сечения диаметр частицы около 590 нм, высота 300 нм.

Образец *Staphylococcus aureus* 40

Бактерии представлены небольшими группами, хотя встречаются плотные сборки бактерий, одиночных образцов не обнаружено, структурные повреждения оболочек также отсутствуют.

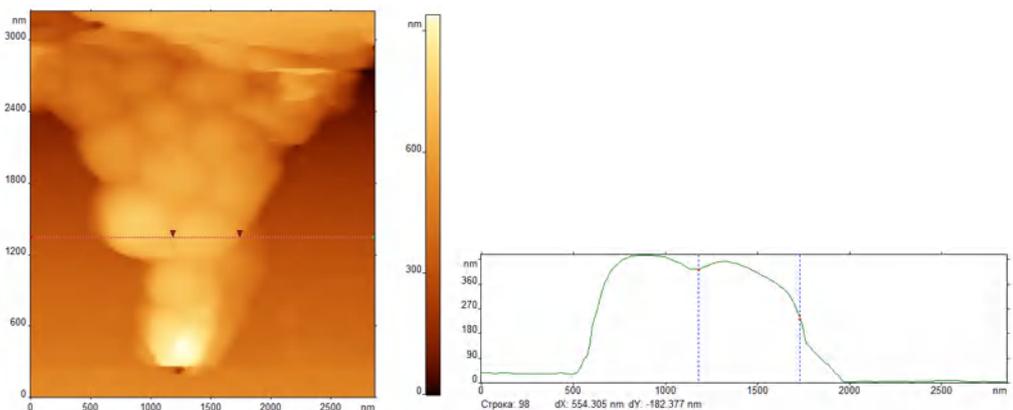


Рисунок 43. Staphylococcus aureus 40. Группа клеток, прикрепленная к кристаллу соли. Диаметр частицы 550 нм, высота 450 нм.

Образец *Staphylococcus aureus* 100

При добавлении ОГМГ структурных изменений не обнаружено, но заметно образование колоний, плотных скоплений, одиночных образцов не обнаружено.

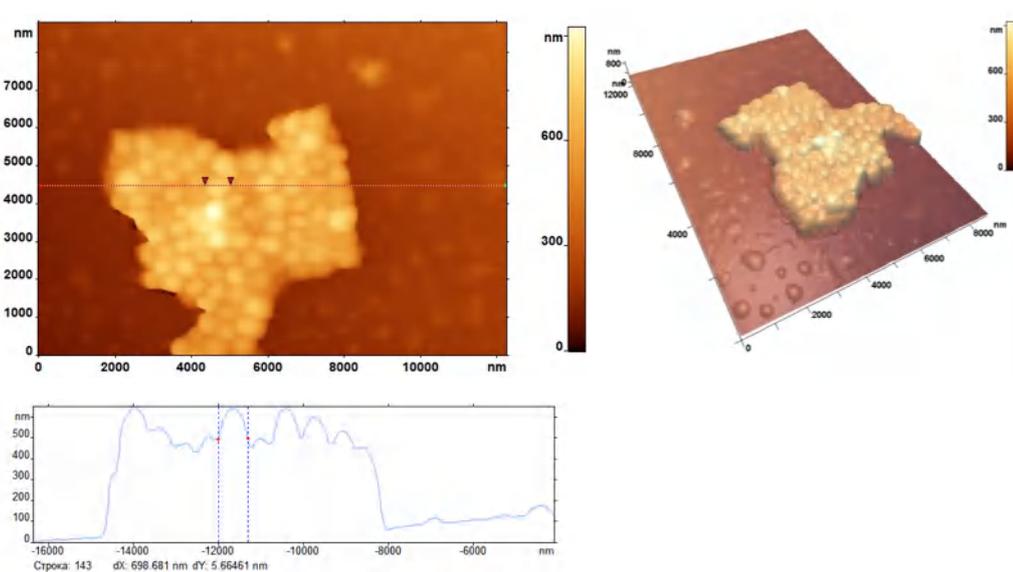


Рисунок 44. Staphylococcus aureus 100. Слева сверху 2D вид, справа сверху 3D изображение. По данным сечения длина частиц около 700 нм, высота около 600 нм.

Образец *Pseudomonas aeruginosa* Контроль

Pseudomonas aeruginosa – это грамотрицательные, прямые палочки размером 1-3 мкм, не образующие спор. Форма бактерий вытянутая, в образце преимущественно округлая. Бактерии в контрольном образце представлены в основном колониями или плотными небольшими группами.

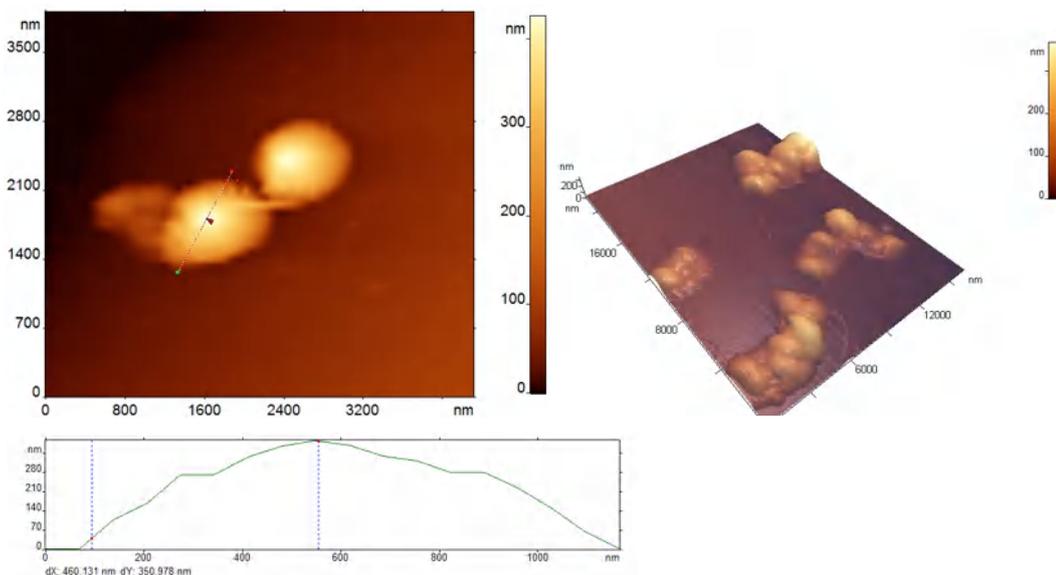


Рисунок 45. Pseudomonas aeruginosa Контроль. Слева сверху 2D вид, справа сверху 3D изображение. По данным сечения длина частицы около 900 нм, высота около 350 нм.

Образец *Pseudomonas aeruginosa* 40

В отличие от предыдущих образцов при добавлении ОГМГ чаще встречаются одиночные образцы. Изменений оболочек или формы не обнаружено.

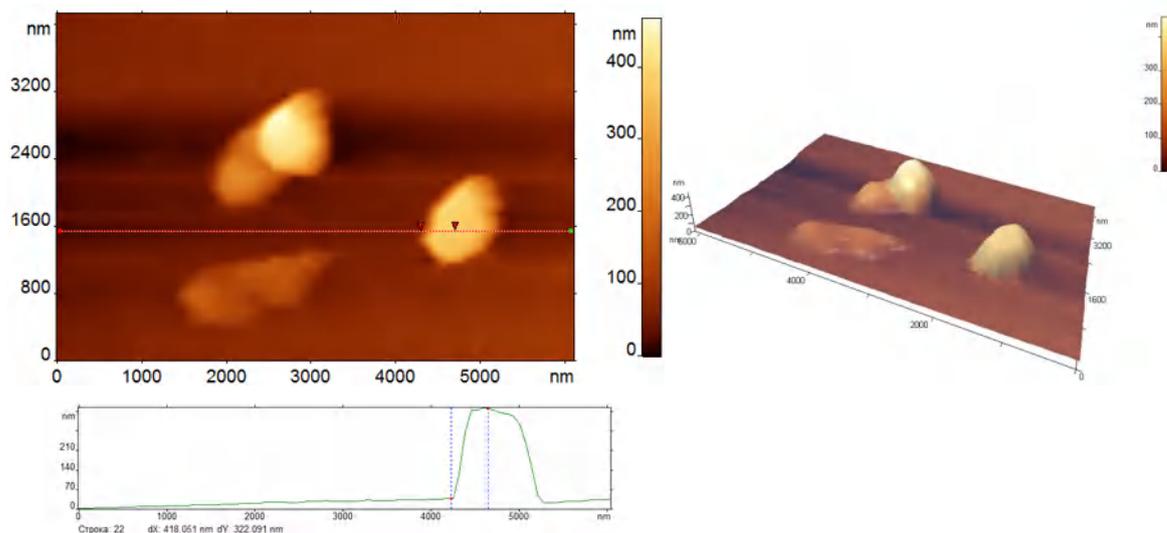


Рисунок 46. *Pseudomonas aeruginosa* 40. Одиночные частицы. Слева сверху 2D вид, справа сверху 3D изображение. По данным сечения длина частицы примерно 800 нм, высота до 400 нм.

Образец *Pseudomonas aeruginosa* 100

Много одиночных объектов по сравнению с образцом в концентрации 40 и по сравнению с контролем, но очевидных повреждений оболочек нет. Соответственно, если предполагать агрегацию как защитный механизм при ухудшении внешних условий, то *Pseudomonas aeruginosa* под воздействием ОГМГ, наоборот, распадается на одиночные частицы.

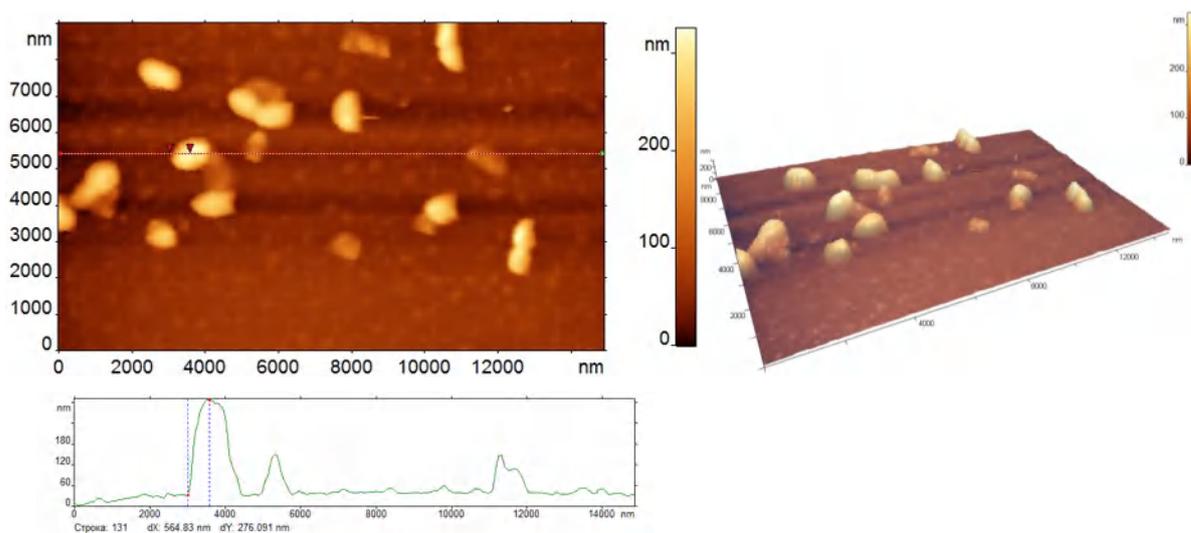


Рисунок 47. *Pseudomonas aeruginosa* 100. Слева сверху 2D вид, справа сверху 3D изображение. По данным сечения длина частицы около 1 мкм, высота до 300 нм.

Образец *Neisseria flavescens* K

Нейссерии [181] (лат. *Neisseria*) — род бактерий из семейства *Neisseriaceae* типа протеобактерий. Грамотрицательные диплококки, под микроскопом напоминают кофейные зёрна. На контрольном образце встречаются как одиночные образцы бактерии, так и большие колонии. Форма круглая, гладкая.

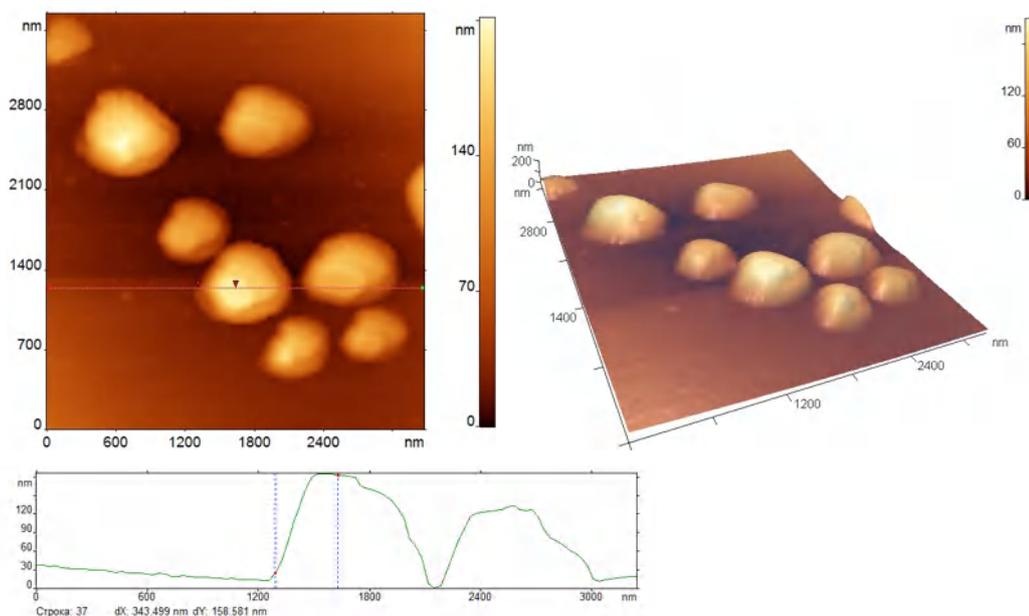


Рисунок 48. Neisseria flavescens K. Слева сверху 2D вид, справа сверху 3D изображение. По данным сечения длина частицы около 690 нм, высота около 160 нм.

Образец *Neisseria flavescens* 40

Встречаются как одиночные образцы бактерий, так и колонии. Существенных изменений по сравнению с контрольным образцом или изменений оболочки не обнаружено. Зафиксировано несколько разрушенных клеток – с высотой не более 100 нм, но данные незначительно повлияли на общую статистику.

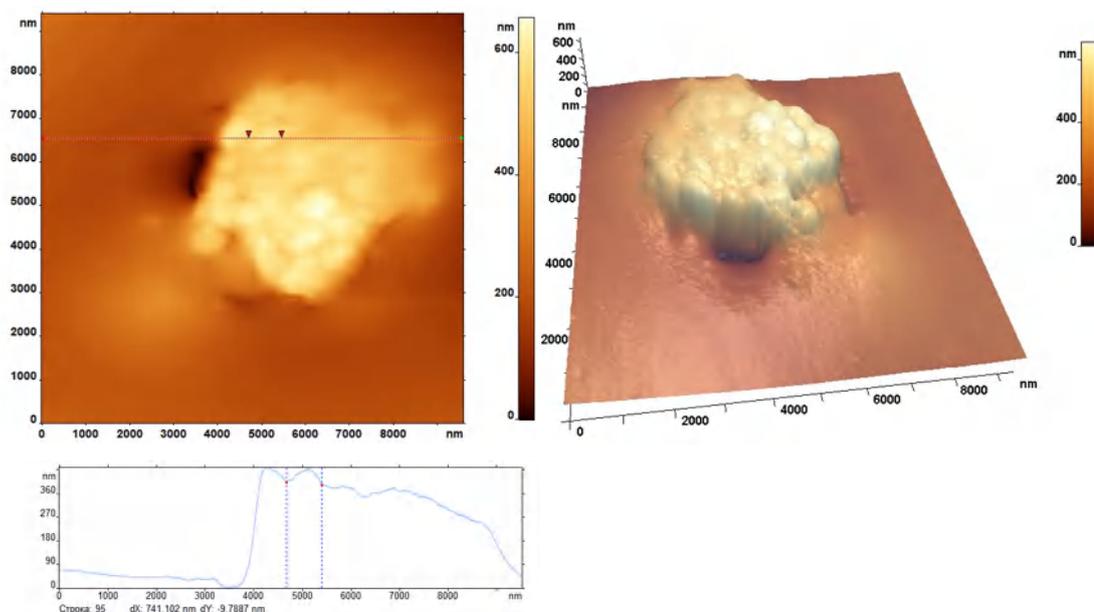


Рисунок 49. *Neisseria flavescens* 40. Слева сверху 2D вид, справа сверху 3D изображение. По данным сечения длина частицы около 750 нм, высота около 360 нм.

Образец *Neisseria flavescens* 100

Встречаются и колонии, и одиночные образцы с ровными краями, геометрические размеры сопоставимы с контрольной группой. Чаще по сравнению с предыдущим образцом встречаются небольшие группы из 20-30 частиц. Полученные результаты не позволяют выявить разрушительное влияние ОГМГ на клеточную мембрану бактерии.

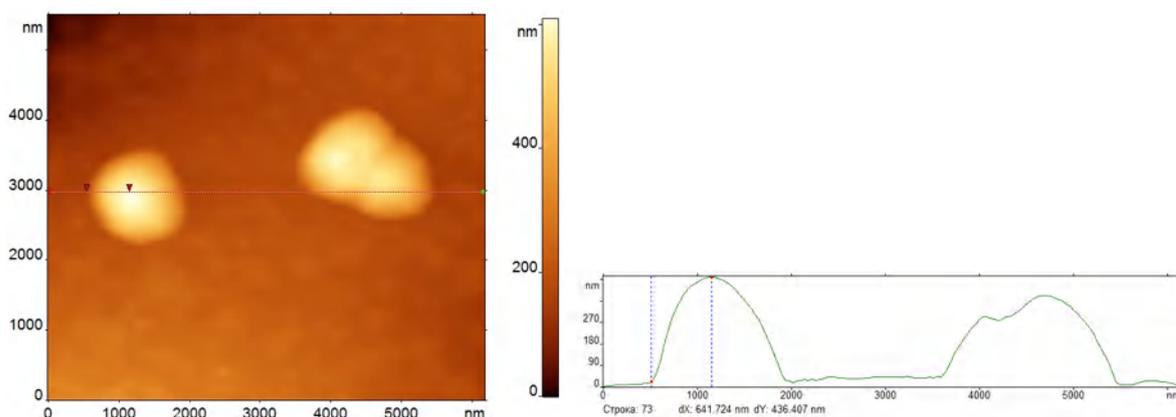


Рисунок 50. *Neisseria flavescens* 100. Диаметр частицы около 1,2 мкм, высота чуть более 400 нм.

Образец *Candida albicans* K

На контрольном образце видны небольшие цепочки мицелия. Образцы с ровной оболочкой, встречаются парами или по несколько штук, слегка смазываются при сканировании.

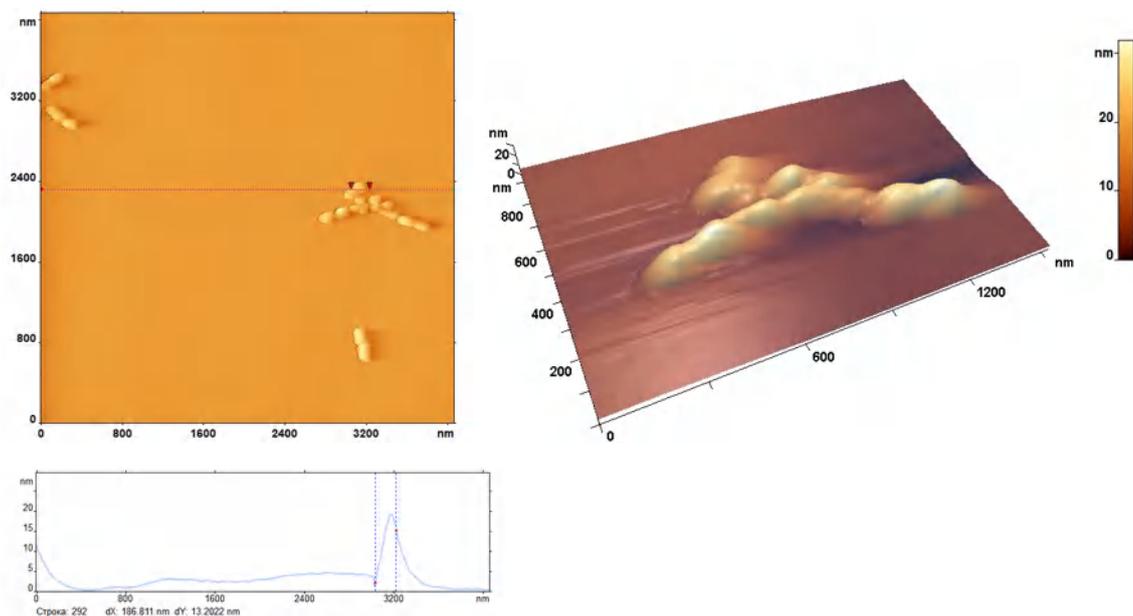


Рисунок 51. *Candida albicans* K. Слева сверху 2D вид, справа сверху 3D изображение. По данным сечения длина частицы около 200 нм, высота 20 нм.

Образец *Candida albicans* 40

Наблюдаются структурные изменения – на данном образце частицы становятся чуть более рыхлыми, с неровными краями. В отличие от контрольного образца, где чаще встречаются одиночные частицы, при добавлении ОГМГ цепочки объединяются в длинные ветвистые структуры.

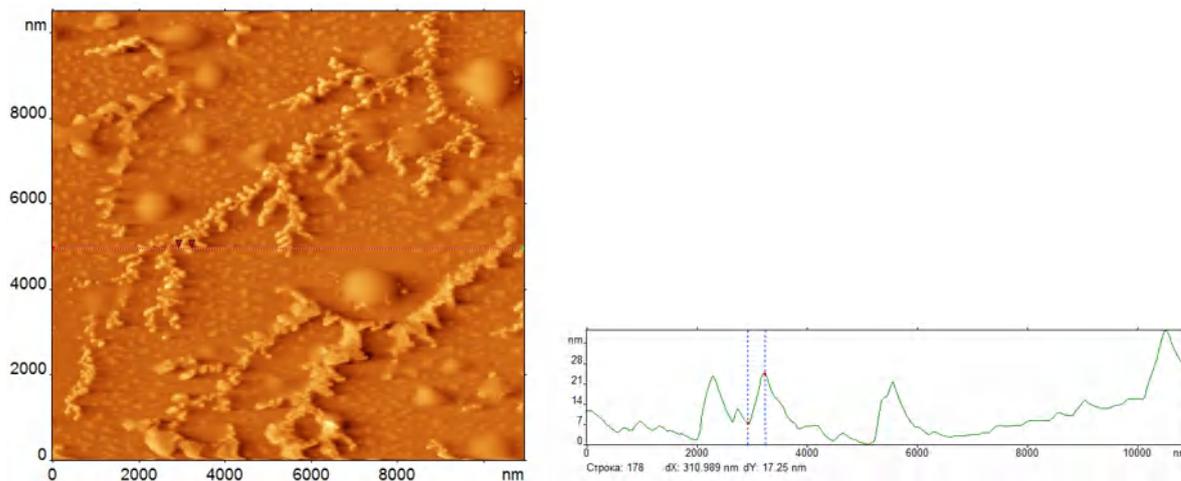


Рисунок 52. *Candida albicans* 40. Высота частиц до 40 нм. При сканировании частицы начинают смазываться.

Образец *Candida albicans* 100

Структурные изменения аналогичные, как на образце в концентрации ОГМГ 40. Встречаются отдельные частицы неправильной формы, как будто разрушенные.

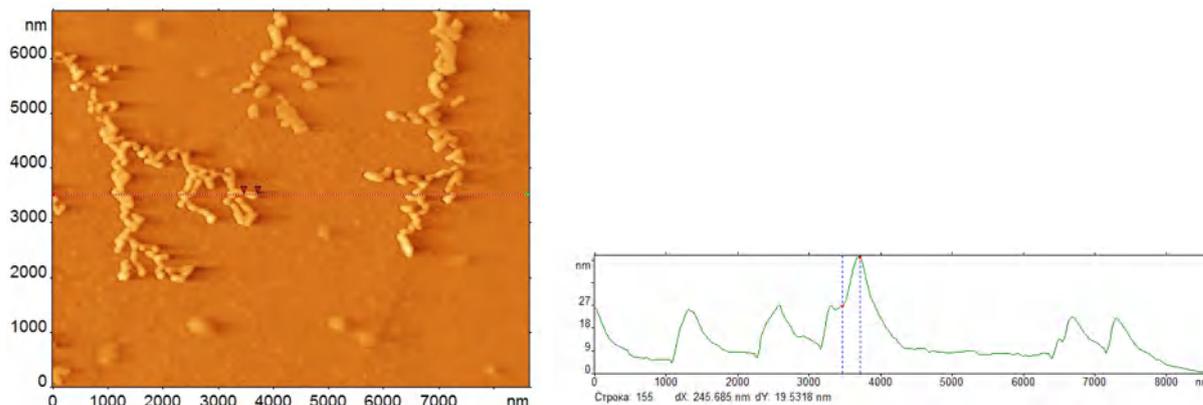


Рисунок 53. Candida albicans 100. Высота частиц до 40 нм. При сканировании частицы начинают смазываться.

Образец *Aspergillus niger* K

На контрольном образце встречаются одиночные споры или небольшие группы из 2-3 штук. Края мягкие, слегка подвергаются деформации при сканировании в контактном режиме.

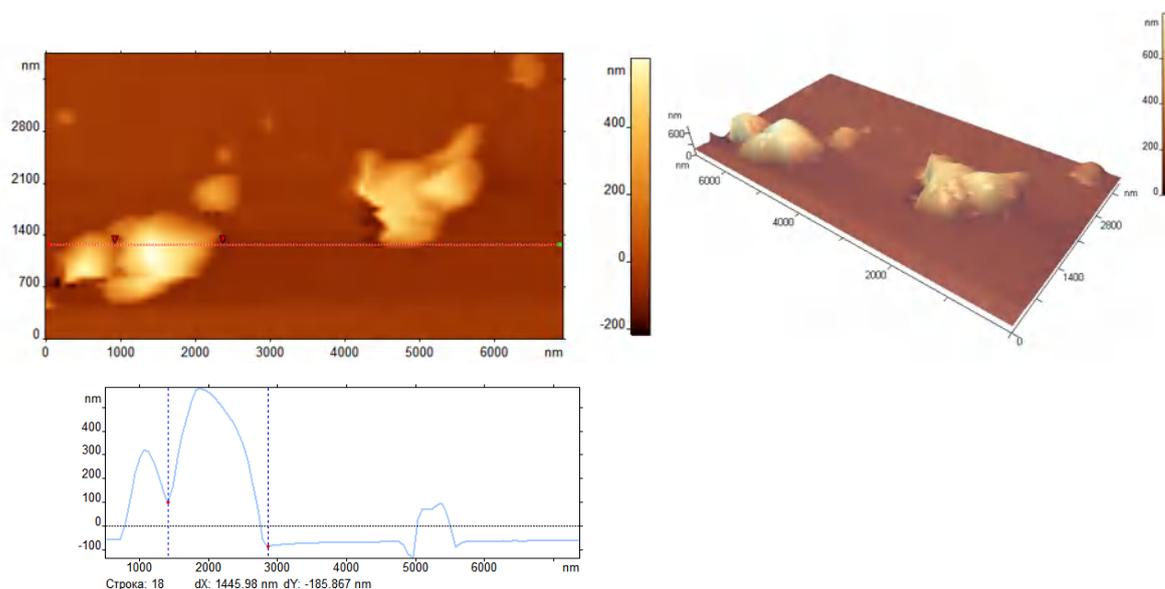


Рисунок 54. Aspergillus niger K. Слева сверху 2D вид, справа сверху 3D изображение. По данным сечения длина частицы 1,5 мкм, высота около 500 нм.

Образец Aspergillus niger 40

На поверхности обнаружены плотные скопления грибов. Края слегка размыты, частицы различной формы.

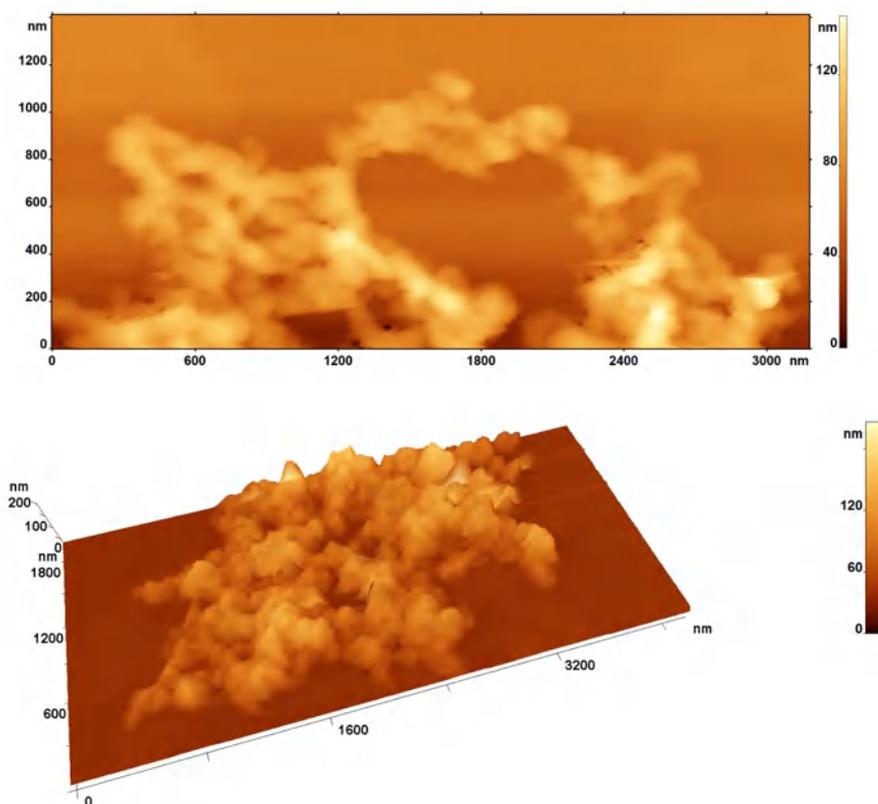


Рисунок 55. Aspergillus niger 40. Вверху 2D, внизу 3D изображение колонии. Высота частиц в пределах 180 нм.

Образец Aspergillus niger 100

Обнаружены скопления одинакового вида: слипшиеся, с нечеткие краями, бесформенные. Есть основания предполагать, что частицы полуразрушены.

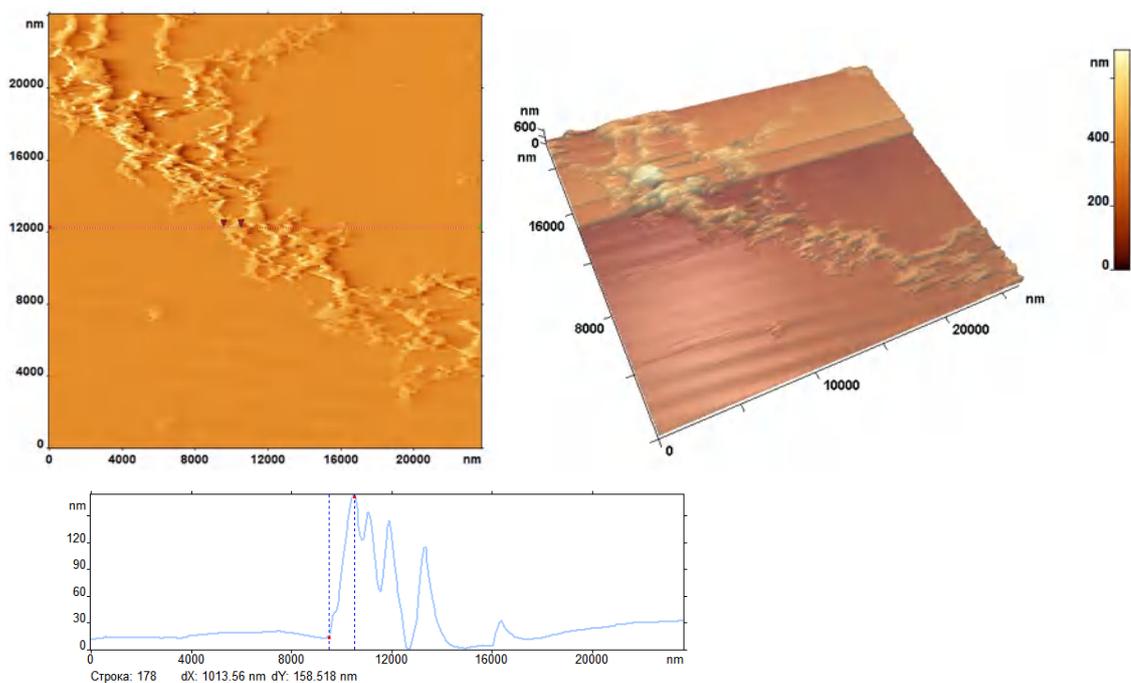


Рисунок 56. Aspergillus niger 100. Вверху слева 2D, вверху справа 3D изображение колонии. На 3D изображении виден контраст при увеличении силы сканирования от светлого к темному, частицы начинают смазываться и разрушаться. Высота частиц в пределах 150 нм.

Выводы

По результатам измерений была составлена таблица значений геометрических размеров частиц, диаметр и высота определялись по данным сечения, погрешность составляет ± 200 нм (Таблица 9). Не удалось померить размеры частиц для грибковых клеток, т.к. под воздействием ОГМГ они теряли структурную целостность.

По характеру влияния ОГМГ было замечено, что некоторые культуры клеток подвержены структурным изменениям, а другие, не получая морфологических повреждений, меняют характер агрегации.

Таблица 9. Геометрические размеры частиц для образцов контроль, ОГМГ 40 и 100. Погрешность в пределах 2-5%.

Образец	Диаметр, нм	Высота, нм
<i>Staphylococcus aureus</i> контроль	590	300
<i>Staphylococcus aureus</i> ОГМГ 40	550	450
<i>Staphylococcus aureus</i> ОГМГ 100	700	600
<i>Staphylococcus epidermidis</i> контроль	700	600
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ОГМГ 40	580	300
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ОГМГ 100	850	600
<i>Neisseria flavescens</i> контроль	650	200
<i>Neisseria flavescens</i> ОГМГ 40	750	360
<i>Neisseria flavescens</i> ОГМГ 100	1200	400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> контроль	900	350
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ОГМГ 40	800	600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ОГМГ 100	1000	300
<i>Candida albicans</i> контроль	200	20
<i>Candida albicans</i> ОГМГ 40	-	40
<i>Candida albicans</i> ОГМГ 100	-	40
<i>Aspergillus niger</i> контроль	-	630
<i>Aspergillus niger</i> ОГМГ 40	-	400
<i>Aspergillus niger</i> ОГМГ 100	-	500

При изучении влияния ОГМГ на бактериальные клетки выявлено несколько вариантов воздействия.

1. *Neisseria flavescens* - отсутствие значительного воздействия. Обнаружены разрушенные частицы, но однозначного вывода о существенном влиянии препарата на жизнедеятельность биопленки сделать нельзя.
2. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* - изменений в структуре поверхности и биопленки не выявлено, но в образцах с ОГМГ, то есть ухудшении внешних условий, бактерии начинают плотнее объединяться в колонии, таким образом включается защитный механизм.
3. *Aspergillus niger* и *Candida albicans* – заметно нарушение внешней структуры.

4. *Pseudomonas aeruginosa* под воздействием ОГМГ колония разбивается на одиночные частицы.

3.7 Биоспецифическое связывание антител на микроальбумин

В предыдущих разделах исследовались морфометрические показатели биологических объектов с помощью зондовой и микролинзовой микроскопии. В данном разделе с помощью техники зондовой микроскопии исследовался процесс биоспецифического связывания антител на микроальбумин на поверхности пьезокерамического биочипа по изменению резонансной частоты колебаний.

Материалы и методы

Для проверки активности антител к микроальбумину использовались мышинные моноклональные антитела к альбумину человека. Три разных изоформа антител IgG2b, IgG2a, IgG1 были куплены в компании «Биалекса». Параллельно для выбора наилучшего связывания, проверки активности и специфичности антител, а также в качестве контроля использовался иммуноферментный анализ (ИФА).

В эксперименте использовались конъюгаты антител, меченые пероксидазой хрена, и мышинные моноклональные антитела на альбумин, в данном случае антитела связываются через Fc фрагмент (рецептор) [182].

Сначала в эппендорфах готовились два раствора антител с карбонатным буфером (0,05M pH 9,0) в соотношении 100 мкл буфера/2 мкг антител и 100 мкл буфера/ 4 мкг антител. Раствор размешивался с помощью миксера. На плашку Nunc MaxiSorp из полистирола 8x12 ячеек объемами 300 мкл заливала с помощью механической пипетки полученные растворы и оставили в холодильнике при температуре 4⁰C на 12 ч.

После содержимое плашки выливали, ячейки промывали раствором PBST (фосфатный буферный раствор с твином 20) дважды по 100 мкл в

каждую ячейку и раствором PBS (фосфатный буферный раствор) единожды по 100 мкл в каждую ячейку. Затем в каждую ячейку плашки заливают раствор 150 мкл 1% BSA+ 1% казеин и оставляют на 30 минут при температуре 37⁰С для заполнения пустых мест на дне каждой ячейки. Далее следует аналогичная промывка. После добавляется конъюгат (пероксидаза с козьими и кроличьими антителами) в соотношении 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 на 1,5 часа при 4⁰С. По истечению этого времени содержимое ячеек выливалось, аналогично ячейки промывались, и затем добавлялся ТМВ (тетраметилбензидин гидрохлорид) в каждую ячейку по 100 мкл, который позволял подкрашивать конъюгат. Далее процесс гасили с помощью серной кислоты, чтобы в дальнейшем измерить спектры (*Рисунок 57*).

Показания спектрометра по итогам проведенного ИФА-теста на активность антител представлены в таблице (Таблица 10). В таблице используются обозначения: кр/м — это конъюгат антител кролика против мыши, коз/м – конъюгат антител козы против мыши.

Таблица 10. Показания спектрометра

конъюгат	4мкг	4мкг	2мкг	2мкг	4мкг	4мкг	2мкг	2мкг	4мкг	4мкг	2мкг	2мкг
1/250	2,745	3,197	2,655	3,052	2,618	3,08	2,455	2,999	2,506	2,86	2,432	2,957
1/500	1,946	2,496	1,879	2,383	1,854	2,468	1,779	2,3	1,788	2,308	1,703	2,241
1/1000	1	1,448	0,958	1,398	0,996	1,417	0,881	1,268	0,947	1,326	0,9	1,317
1/2000	0,531	0,776	0,499	0,797	0,501	0,791	0,462	0,68	0,491	0,73	0,47	0,699
1/4000	0,263	0,401	0,253	0,395	0,255	0,392	0,219	0,344	0,248	0,394	0,234	0,37
1/8000	0,13	0,196	0,132	0,2	0,13	0,213	0,112	0,174	0,131	0,195	0,114	0,187
1/16000	0,069	0,103	0,065	0,102	0,067	0,108	0,053	0,084	0,061	0,104	0,058	0,094
1/32000	0,034	0,055	0,035	0,057	0,034	0,058	0,027	0,045	0,032	0,053	0,028	0,049
антитела	НС15	НС15	НС15	НС15	НА1	НА1	НА1	НА1	НА11	НА11	НА11	НА11
	кр/м	коз/м										



Рисунок 58. Пьезокерамические диски с нанесенным слоем золота

На диски с помощью напылительной установки был нанесен слой золота толщиной 40 нм. Затем 3 сдвоенных диска и 3 одинарных сразу после нанесения золота были помещены в 4-аминотиофенол с концентрацией 0,16 г/л (набор №1), остальные 3 диска (набор №2) были помещены в этиловый спирт. Первый набор керамик погружался в аминотиофенол, а второй в этиловый спирт на 6 дней при комнатной температуре.

На первый набор дисков после аминотиофенола наносили антитела с раствором EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимид гидрохлорид) для улучшения связывания антител с аминогруппой. Для получения раствора антител с EDC антитела сначала помещали в натрий цитратный буфер с рН около 5. Концентрация буфера выбиралась таким образом, чтобы в дальнейшем развести раствор EDC и антитела в соотношении один к одному.

Антитела с EDC в количестве 29 мкл с концентрациями 5;50;100 мкг/мл наносили на диски диаметром 16 мм и по 5 мкл с такой же концентрацией на сдвоенные диски диаметром 4 мм, после чего оставляли на 12 часов при комнатной температуре.

Второй набор дисков помещали в раствор цистамина (меркаптоэтиламина) с концентрацией 0,05М на 12 часов. Затем в объеме 29 мкл с концентрациями 5;50;100 мкг/мл на каждый пьезокерамический диск наносили раствор антител с EDC. Диски из первого набора диаметром 16 мм

объединили со вторым набором. После этого второй набор дисков модифицировали следующим образом: наносили конъюгат с козьими антителами, промывали, а затем подкрашивали с помощью ТМВ раствора.

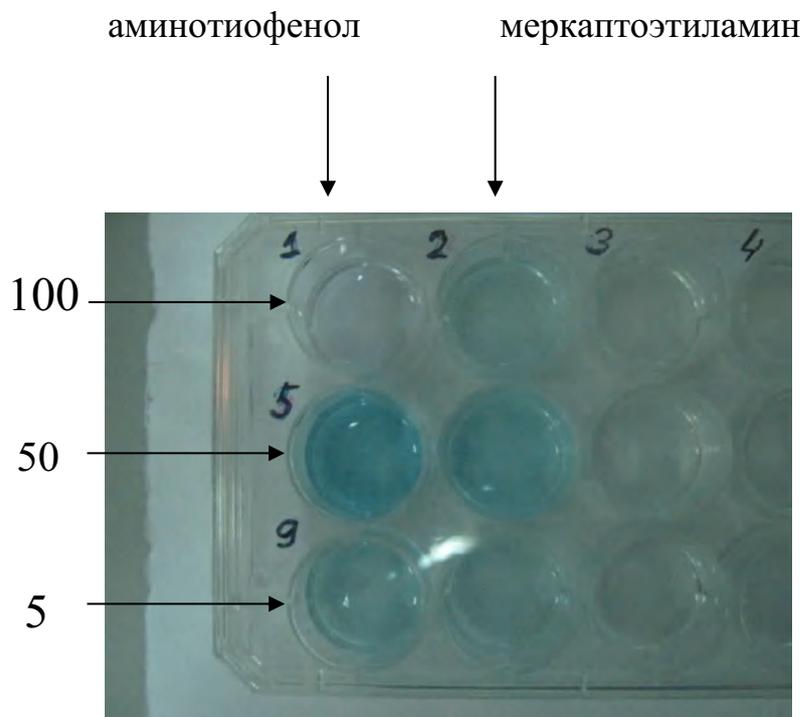


Рисунок 59. Результаты ИФА. Наилучшее связывание образовано аминоктиофенолом с концентрацией антител 50 мкг/мл.

Результаты ИФА показали, что наилучшее связывание образовано аминоктиофенолом с концентрацией антител 50 мкг/мл. Параллельно с ИФА проводился эксперимент с пьезокерамическими дисками диаметром 4 мм. С помощью биосенсора [183] сдвоенные диски с концентрацией антител 50 мкг/мл помещались в проточную систему. Сначала были измерены шумы в PBST буфере. Для проведения измерения сначала детектируются шумы – измеряется зависимость амплитуды колебаний биочипа от частоты в области резонансного пика. Измерялся резонансный пик с шагом 1 секунда, затем для каждого резонансного пика вычислялся центр масс и строился график.

Для определения резонансной частоты f_{cp} использовался метод определения центра масс [184]:

$$f_{cp} = \sum_{i=1}^N \frac{A_i f_i}{A_1 + A_2 + \dots + A_N} \quad (\Phi 8)$$

где A_i – напряжение на частоте f_i .

Ниже представлен график зависимости значений резонансной частоты от времени [185]. В контрольном измерении отклика биосенсора в буфере PBST за 1000 сек среднее значение резонансной частоты сместилось на 0,3 кГц. (Рисунок 60). Точки на графике являются значениями частоты резонанса, а линией обозначено усредненное по 5 точкам значение.

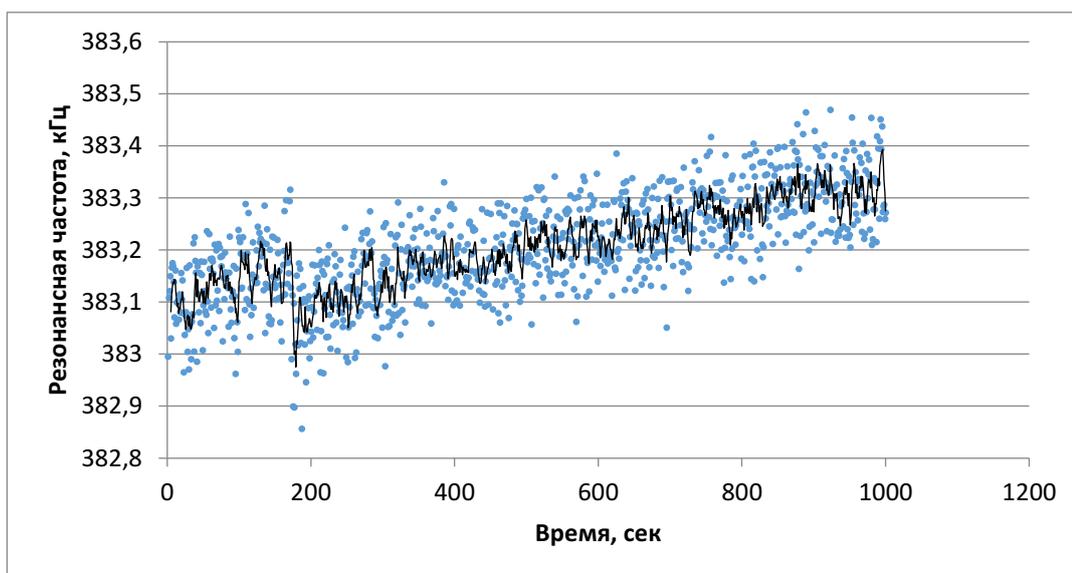


Рисунок 60. Контрольное измерение колебаний биочипа в буфере, сдвиг резонансной частоты составил 0,3 кГц.

По итогам проведенного ИФА теста на активность антител для дальнейших экспериментов использовался конъюгат антител козы против антител мыши (Иммунотех) и мышинные моноклональные антитела НС15.

Далее биочип с концентрацией иммобилизованных антител Н-С15 50 мкг/мл поместили в ячейку на 50-й секунде. В 0,75 мл фосфатного буферного раствора добавили 0,25 мл конъюгата с буфером с соотношением 1:1000000. Ниже представлена кривая связывания антител на поверхности биочипа (Рисунок 61).

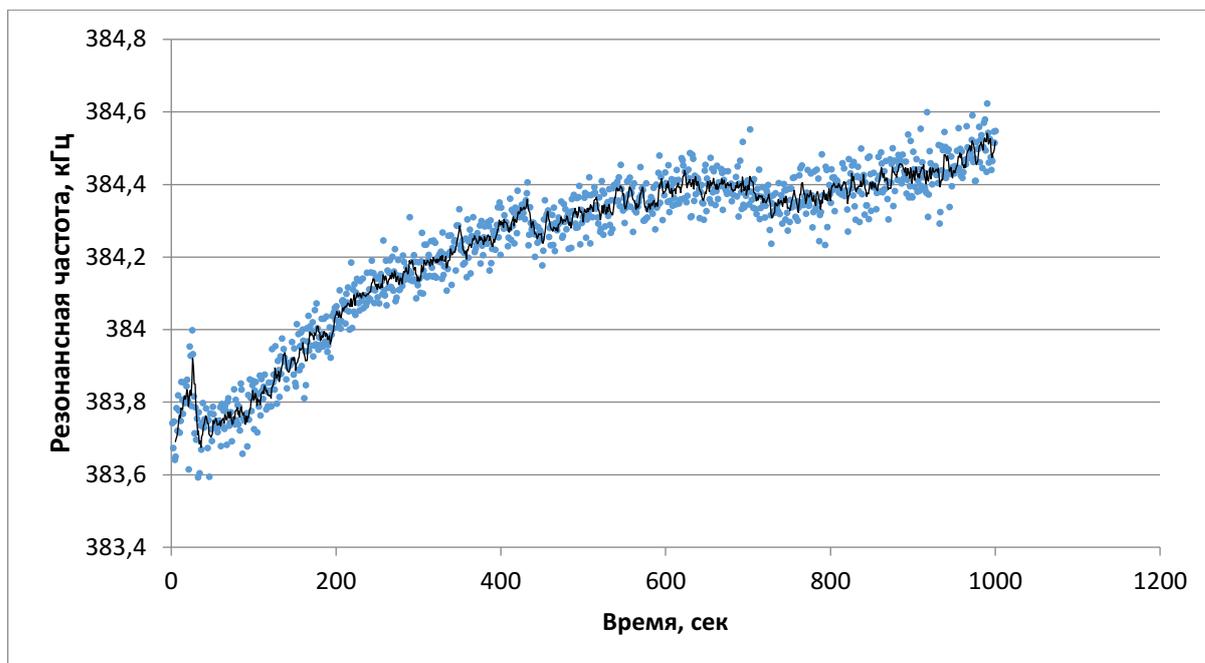


Рисунок 61. Кривая сорбции. Пьезокерамический диск (подложка золото+аминотиофенол+антитела H-C15 к альбумину) помещен в проточную ячейку, в момент времени 50 сек. в объем буфера PBST 0,75 мл добавлено 0,25 мл конъюгата с буфером с соотношением 1:1000000. За 1000 сек. сдвиг по частоте составил 0,8 кГц.

После проведенных измерений через 30 минут снова были измерены шумы системы.

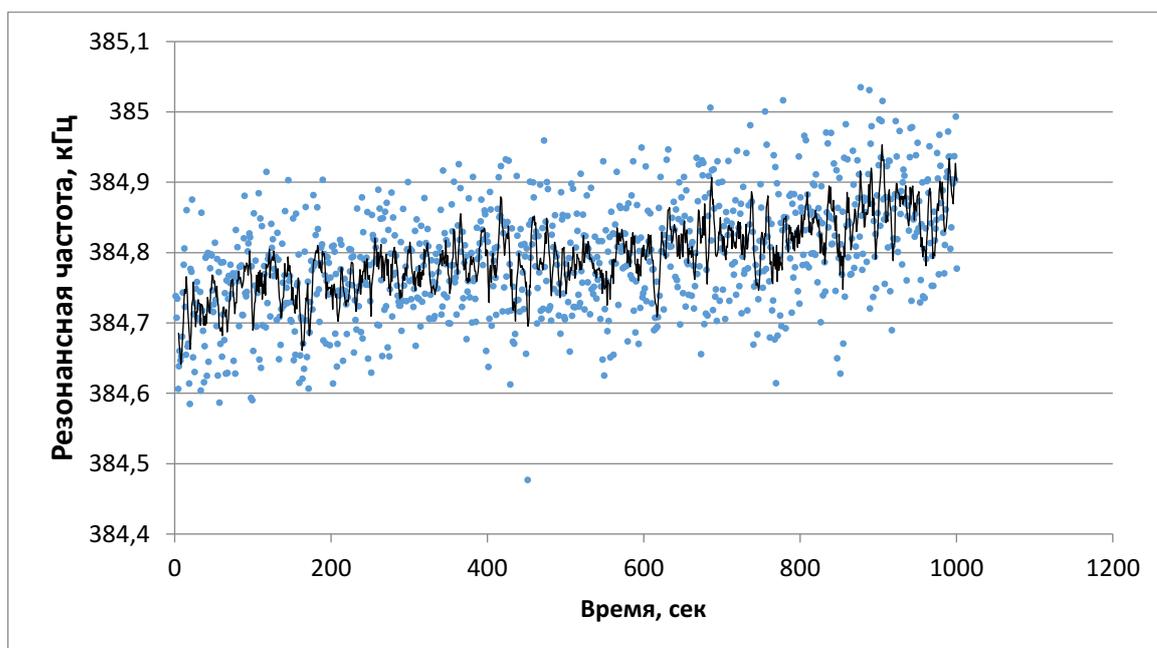


Рисунок 62. Измерение шумов в системе через 30 мин после эксперимента. Сдвиг резонансной частоты составил 0,3 кГц.

Также были проведены измерения изменений резонансной частоты для биочипов с концентрацией иммобилизованных антител Н-С15 5 мкг/мл (Рисунок 63).

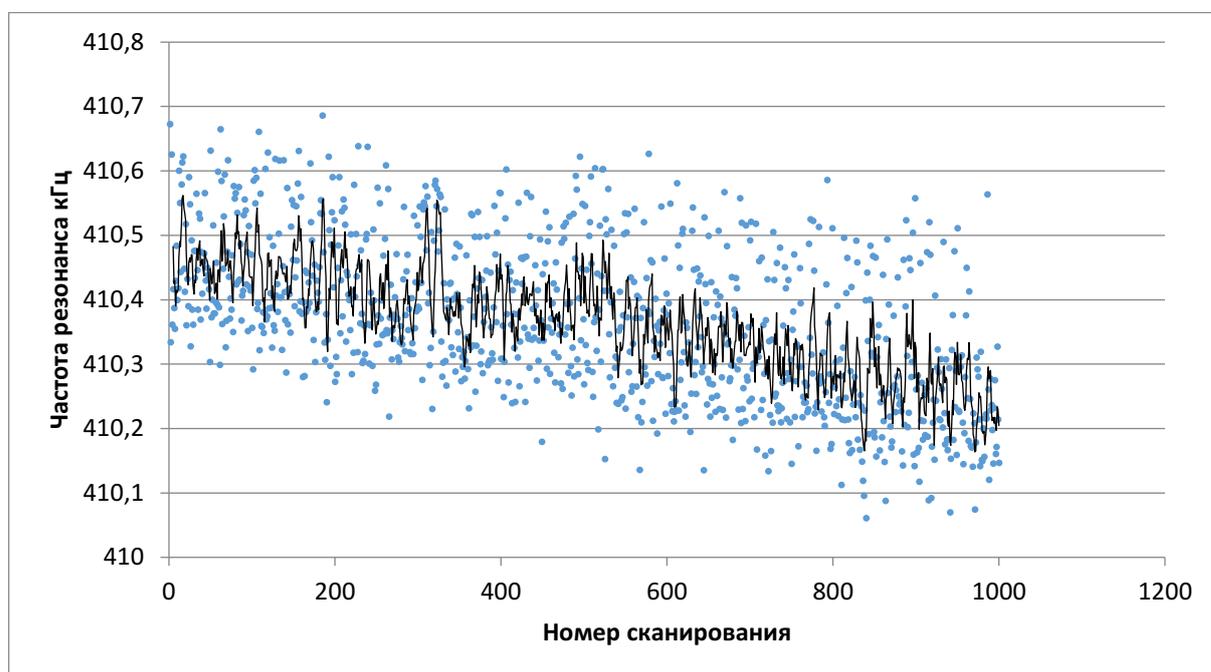


Рисунок 63. Контрольное измерение для буфера PBST. За 1000 сек резонансная частота сдвинулась на 0,3 кГц.

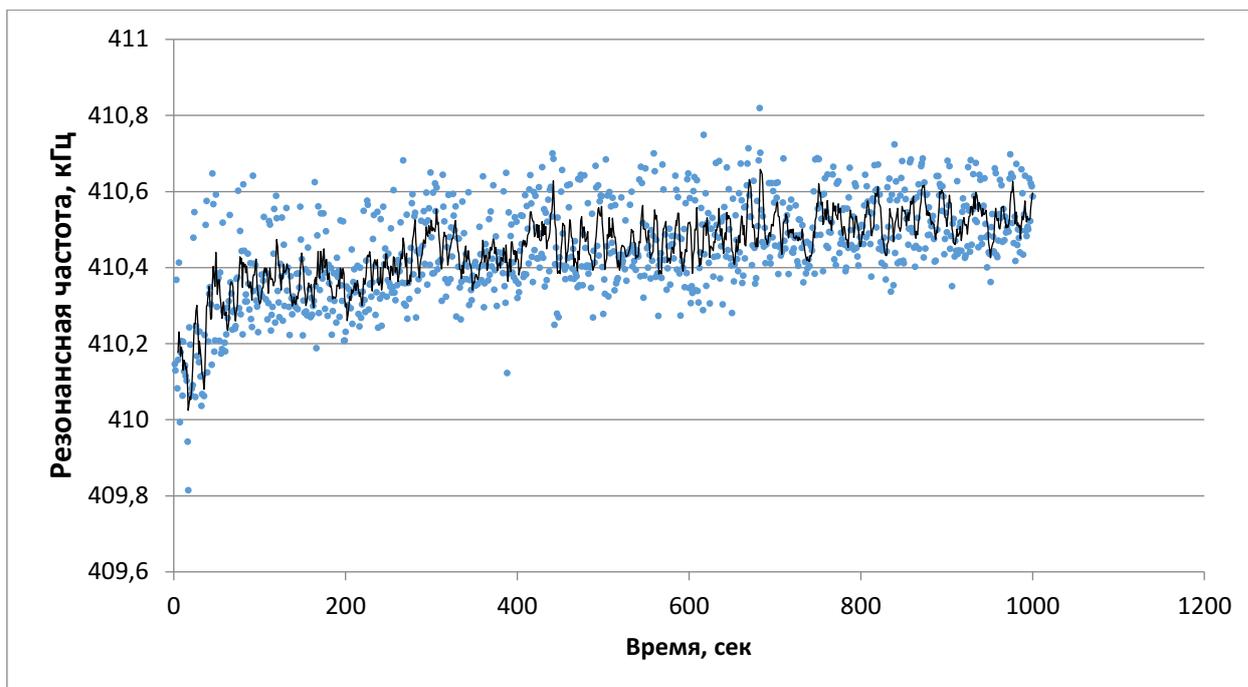


Рисунок 64. Кривая связывания конъюгата антител козы с иммобилизованными антителами на поверхности биочипа. Пьезокерамический диск с концентрацией 5 мкг/мл (подложка золото+аминотиофенол+антитела Н-С15 к альбумину) помещен в проточную ячейку, в момент времени 30 сек. в объем буфера PBST 0,75 мл добавлено 0,25 мл конъюгата с буфером с соотношением 1:1000000. За 1000 сек. сдвиг по частоте составил 0,5 кГц.

При этом концентрация вводимых в пробу антител не изменялась. Сдвиг резонансной частоты составил 0,5 кГц. В 0,75 мл буфера PBST добавлено 0,25 мл конъюгата с буфером с соотношением 1:1000000.

После была измерена кривая сорбции системы через 2 часа.

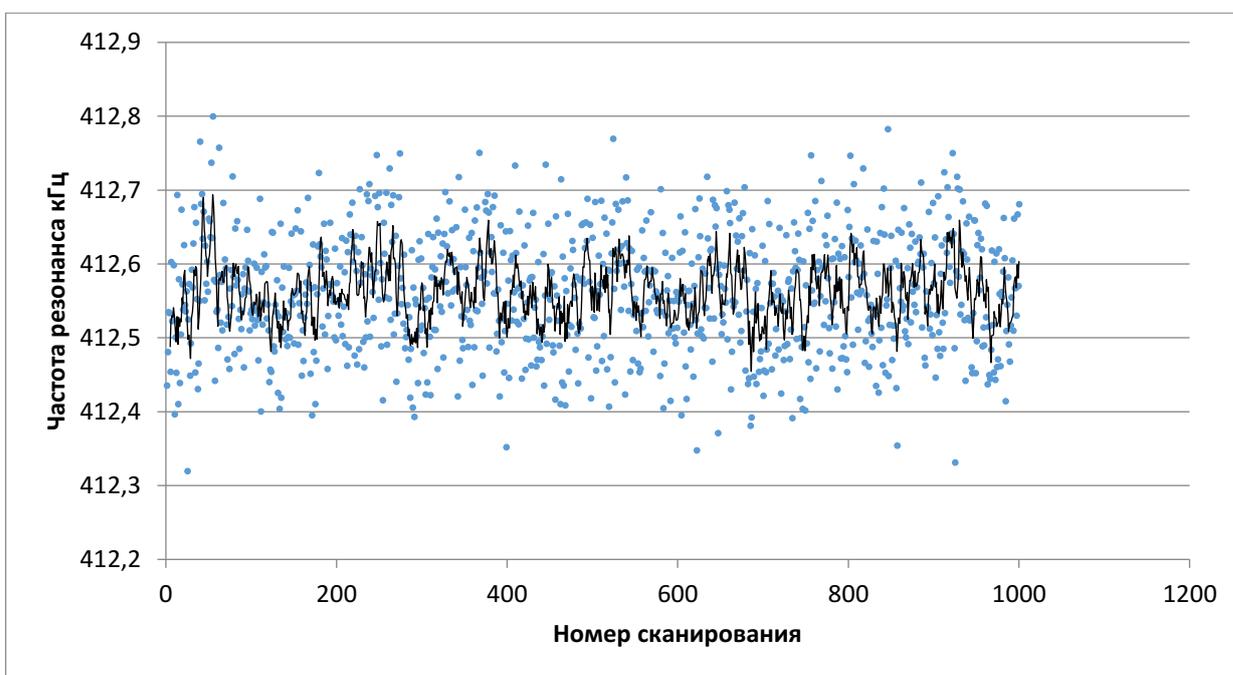


Рисунок 65. Кривая сорбции на поверхности биочипа. 2 часа после эксперимента. Значение шума в пределах 0,3 кГц

Вывод

Уменьшение сдвига резонансной частоты с уменьшением концентрации иммобилизованных антител на поверхности биочипа свидетельствует о том, что резонансная частота зависит от количества осевших моноклональных антител на поверхности биочипа. При меньшей концентрации иммобилизованных антител на поверхности биочипа диаметром 3 мм происходит меньшее количество связываний с моноклональными антителами, что видно по кривой - сдвиг резонансной частоты составляет 0,5 кГц, меньшее значение, сопоставимое с шумом измерительной системы. Очевидно, что концентрация антител 5 мкг/мл недостаточная. Для увеличения чувствительности необходимая концентрация иммобилизованных антител на биочипе диаметром 3 мм составляет 50 мкг/мл.

Отсутствие результата при избыточной концентрации специфических антител (100 мкг/мл), нанесенных на пьезокерамические диски, объясняется тем, что на поверхности образуется несколько монослоев, которые связываются друг с другом за свободные фрагменты. Из-за этого добавленный

в систему конъюгат практически не связывается с антителами и не вносит вклад в изменение резонансной частоты. Такой же вывод подтвердил и ИФА-анализ.

В работе было проведено экспериментальное исследование активности антител, определено, что наилучшее связывание антител на поверхности сенсорного слоя происходит с аминотиофенолом, а не цистамином. Наиболее активное связывание происходило между антителами HC15 и конъюгатом антител козы против антител мыши, меченых пероксидазой.

Увеличение резонансной частоты в зависимости от осевших частиц на поверхности биочипа говорит о том, что существенный вклад в изменение резонансной частоты вносит изменение жесткости, а не массы. Пьезоэлектрический биосенсор для обнаружения бактерий, вирусов, биомакромолекул является относительно дешевым методом, не требующим меток, красителей или реагентов. Как правило, он наиболее применим к таким мишеням, как целые бактерии, вирусы, биомакромолекулы. Сложнее использовать эту методику для обнаружения короткой последовательности нуклеиновой кислоты.

Основные результаты и выводы

1. Зарегистрирована кинетика трансформации эритроцита в эхиноцит с нанометровым пространственным разрешением с помощью капиллярной и микролинзовой микроскопии. Подтверждено, что данные по шероховатости эритроцита, исследованного с помощью АСМ на воздухе, коррелируют с данными, полученными с помощью СКМ в жидкости.
2. Методами сканирующей капиллярной микроскопии зафиксированы структурные изменения мембраны опухолевых клеток под воздействием цисплатина и нокодазола. Под воздействием нокодазола показано наибольшее изменение шероховатости клеток.
3. Методами сканирующей зондовой микроскопии проведена характеристика вирусов гриппа, клещевого энцефалита. Методом СЗМ продемонстрирована эффективность аптамера для селективной адсорбции вируса гриппа на кремниевых подложках.
4. Проведена визуализация живых бактериальных и грибковых клеток (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria flavescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*) на воздухе. Определено влияние олигогексаметиленгуанидина на морфологические признаки частиц и характер адсорбции бактериальных частиц:
 - 1) для *Neisseria flavescens* показано отсутствие воздействия: существенных изменений между контрольным образцом и образцами с различными концентрациями биоцидного препарата не выявлено;
 - 2) для *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* показано отсутствие изменений в структуре поверхности, но выявлено изменение в характере агрегации частиц: в присутствии ОГМГ

- бактерии начинают плотнее объединяться в колонии, что может свидетельствовать о включении защитного механизма;
- 3) для *Aspergillus niger* и *Candida albicans* зафиксировано нарушение внешней структуры;
 - 4) *Pseudomonas aeruginosa* под воздействием ОГМГ колония разбивается на одиночные частицы.
 5. Разработана методика проверки активности и специфичности антител в жидкости по изменению характера колебаний пьезокерамического биочипа. Продемонстрирована зависимость чувствительности биосенсора от концентрации антител, адсорбированных на сенсорный слой. Наилучшее связывание конъюгата антител козы с иммобилизованными антителами достигнуто при концентрации антител в 50 мкг/мл.

Благодарность

В заключение хочу выразить глубокую благодарность своему научному руководителю Яминскому И.В., научному сотруднику физического факультета МГУ Мешкову Г.Б. и сотруднице ИНЭОС РАН Сеницыной О.В. за помощь в анализе экспериментальных результатов и в создании экспериментальных установок.

Выражаю благодарность сотрудникам ФГАНУ ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН, Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, а также научному сотруднику НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского М.А.Тихомировой за предоставленные образцы. Выражаю признательность Завьяловой Е.Г. и Жданову Г.А. за предоставленную возможность провести эксперименты с SERS-сенсором и мембраной для вируса гриппа А.

Не могу не поблагодарить всех сотрудников кафедры химической энзимологии за оказанную ими помощь в ходе работы, в особенности академика РАН Егорова А.М., Рубцову М.Ю., Преснову Г. за помощь в проведении экспериментов с помощью иммуноферментного анализа.

Выражаю искреннюю признательность всем студентам лаборатории зондовой микроскопии: Советникову Т.О., Сенотрусовой С.А., Власову В.А., Павловой М.А., Труховой А.А., Корнилову Д.В.

Список литературы

1. Suganya Devi K., Arutperumjothi G., Srinivasan P. Diagnosis Evaluation and Interpretation of Qualitative Abnormalities in Peripheral Blood Smear Images—A Review. In: Patgiri R., Biswas A., Roy P. (eds) Health Informatics: A Computational Perspective in Healthcare. Studies in Computational Intelligence, 2021, 932. Springer, Singapore.
2. Bain B.J. Diagnosis from the blood smear. *New England Journal of Medicine*. 2005, 353, 5, 498-507.
3. Wang Z., Guo W., Li L., *et al.* Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope, *Nature Communications*, 2011, 2, 218.
4. Akhmetova A. I., Yaminsky I. V., Senotrusova S. A. Scanning probe microscopy of biological objects and data processing. *Medicine and high technologies*, 2021, 4, 5–8.
5. Strijkova-Kenderova V., Todinova S., Andreeva T., Bogdanova D., Langari A., Danailova A., Krumova S., Zlatareva E., Kalaydzhiev N., Milanov I., Taneva S.G. Morphometry and Stiffness of Red Blood Cells—Signatures of Neurodegenerative Diseases and Aging *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 227.
6. Nirmalraj P. N., Schneider T., Felbecker A. Spatial organization of protein aggregates on red blood cells as physical biomarkers of Alzheimer’s disease pathology. *Sci. Adv.* 2021, 7, eabj2137, 1-11
7. Langari, A.; Strijkova, V.; Komsa-Penkova, R.; *et al.* Morphometric and Nanomechanical Features of Erythrocytes Characteristic of Early Pregnancy Loss. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 4512.
8. Chen Y., Zhang Y., Quan C., Luo J., Yang Y., Yu M., Kong Y., Ma G., Su Z. Aggregation and antigenicity of virus like particle in salt solution—A case study with hepatitis B surface antigen Vaccine, 2015, 33 (35) 4300– 4306.
9. Dika C., Gantzer C., Perrin A., Duval J. F. L. Impact of the virus purification protocol on aggregation and electrokinetics of MS2 phages and corresponding virus-like particles *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, 15 (15) 5691– 5700.

10. Da Silva A. K., Kavanagh O. V., Estes M. K., Elimelech M. Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45 (2) 520–526.
11. Gerba C. P., Betancourt W. Q. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, 51, 7318–7325.
12. Hoff J. C., Akin E. W. Microbial resistance to disinfectants: Mechanisms and significance, *Environ. Health Perspect.*, 1986, 69, 7–13.
13. Lin S., Lee C. K., Lee S. Y., Kao C. L., Lin C. W., Wang A. B., Hsu S. M., Huang L. S. Surface ultrastructure of SARS coronavirus revealed by atomic force microscopy. *Cell. Microbiol.*, 2005, 7, 1763–1770.
14. Kiss B., Kis Z., Pályi B., Kellermayer M. S. Z. Topography, Spike Dynamics, and Nanomechanics of Individual Native SARS-CoV-2 Virions, *Nano Lett.* 2021, 21, 6, 2675–2680
15. Celik U., Celik K., Celik S., Abayli H., Can Sahna K., Tonbak S., Toraman Z. A., Oral A. Interpretation of SARS-CoV-2 behaviour on different substrates and denaturation of virions using ethanol: an atomic force microscopy study, *RSC Adv.*, 2020, 10, 44079.
16. Alsteens, D., Newton, R., Schubert, R. et al. Nanomechanical mapping of first binding steps of a virus to animal cells. *Nature Nanotech* 12, 177–183 (2017).
17. Müller, D., Dufrêne, Y. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nature Nanotech* 3, 261–269 (2008).
18. Hinterdorfer, P. & Dufrene, Y. F. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat. Methods* 3, 347–355 (2006).
19. Dubrovin E.V., Voloshin A. G., Kraevsky S.V., *et al.* Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 2008, 24 (22) 13068–13074.

20. Dubrovin E. V., Popova A. V., Kraevskiy S. V., *et al.* Atomic force microscopy analysis of the *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ap22 lytic cycle. PLoS ONE, 2012, 7(10) e47348.
21. Longo G., Alonso-Sarduy L., Marques Rio L., Bizzini A., Trampuz A., Notz J., Dietler G., Kasas S.. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. Nat. Nanotechnol., 2013, 8(7), 522–526.
22. Stupar P., Podolski-Renić A., Ines Villalba M., *et al.* Nano-Motion Analysis for Rapid and Label Free Assessing of Cancer Cell Sensitivity to Chemotherapeutics. Medicina 2021, 57(5), 446.
23. Fletcher M. Bacterial biofilms and biofouling, Current Opinion in Biotechnology, 1994, 5, 3, 302-306.
24. Costa F., Silva B., Tavares T. Biofilm Bioprocesses in Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Bioprocesses, Bioreactors and Controls, Ed. Ch. Larroche, M. A. Sanroma'n, G. Du, A. Pandey, Elsevier, 2017.
25. James S. A., Hilal N., Wright C. J. Atomic force microscopy studies of bioprocess engineering surfaces – imaging, interactions and mechanical properties mediating bacterial adhesion. Biotechnol. J., 12: 1600698.
26. Reguera G., McCarthy K. D., Mehta T., Nicoll J. S., Tuominen M. T., Lovley D. R. Extracellular Electron Transfer Via Microbial Nanowires. Nature, 2005, 435, 1098-101.
27. Гостев В. В., Сидоренко С. В. Бактериальные биопленки и инфекции. Журнал инфектологии. 2010. № 3. 4–14.
28. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I. Studies of viruses and bacteria using scanning probe microscopy. Medicine and High Technologies, 2020, 3, 17–20.
29. Яминский И., Ахметова А. Атомно-силовая микроскопия вирусов и бактерий. Медицина и высокие технологии, 2, 2021, 18-21
30. Dexiang Z, Xiaodan J, Ruxiang X, Yingqian C, Jiliang H, et al. (2008) Assessing the cytoskeletal system and its elements in C6 glioma cells and astrocytes by atomic force microscopy. Cellular and Molecular Neurobiology 28: 895–905.

31. Kim KS, Cho CH, Park EK, Jung M-H, Yoon K-S, et al. (2012) AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. *PLoS ONE* 7(1): e30066.
32. Xu W, Mezencev R, Kim B, Wang L, McDonald J, et al. (2012) Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *PLoS ONE* 7(10): e46609.
33. Li Q.S., Lee G.Y.H., Ong C.N., Lim C.T. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 374, 609–613
34. Gaman A, Osiac E, Rotaru I, Taisescu C. Surface morphology of leukemic cells from chronic myeloid leukemia under atomic force microscopy. *Curr Health Sci J*. 2013, 39, 45–7.
35. Kaul-Ghanekar R, Singh S, Mamgain H, Jalota-Badhwar A, Paknikar KM, Chattopadhyay S. Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study. *BMC Cancer*. 2009, 9, 350.
36. Platet N, Hinkel I, Richert L, Murdamoothoo D, Moufok-Sadoun A, Vanier M, Lavalle P, Gaidon C, Vautier D, Freund JN, Gross I. The tumor suppressor CDX2 opposes pro-metastatic biomechanical modifications of colon cancer cells through organization of the actin cytoskeleton. *Cancer Lett*. 2017, 386, 57–64.
37. Cao R, Ji H, Feng N, Zhang Y, Yang X, Andersson P, Sun Y, Tritsarlis K, Hansen AJ, Dissing S, Cao Y. Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012, 109, 15894–9.
38. Liu B, Ma J, Wang X, Su F, Li X, Yang S, Ma W, Zhang Y. Lymphangiogenesis and its relationship with lymphatic metastasis and prognosis in malignant melanoma. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008, 291, 1227–35.
39. Fraley SI, Feng Y, Krishnamurthy R, Kim DH, Celedon A, Longmore GD, Wirtz D. A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat Cell Biol*. 2010, 12, 598–604.

40. Cross SE, Jin YS, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol.* 2007, 2, 780–3.
41. Xu W, Mezencev R, Kim B, Wang L, McDonald J, Sulchek T. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS ONE.* 2012, 7:e46609.
42. Cross SE, Jin YS, Tondre J, Wong R, Rao J, Gimzewski JK. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology.* 2008, 19, 384003.
43. Hansma P.K., Drake B., Marti O., Gould S.A., Prater C.B. The scanning ion-conductance microscope. *Science,* 1989, 243, 641–643.
44. Proksch R., Lal R., Hansma P.K., Morse D., Stucky G. Imaging the internal and external pore structure of membranes in fluid: TappingMode scanning ion conductance microscopy. *Biophys. J.* 1996, 71, 2155–2157.
45. Korchev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M., Vodyanoy I., Lab M.J. Scanning ion conductance microscopy of living cells. *Biophys. J.* 1997, 73: 653-658.
46. Korchev Y.E., Milovanovic M., Bashford C.L., Bennett D.C., Sviderskaya E.V., Vodyanoy I., Lab M.J. Specialized scanning ion-conductance microscope for imaging of living cells. *J. Microsc.* 1997, 188, 17-23.
47. Korchev Y.E., Gorelik J., Lab M.J., Sviderskaya E.V., Johnston C.L., Coombes C.R., Vodyanoy I., Edwards C.R. Cell volume measurement using scanning ion conductance microscopy. *Biophys. J.* 2000, 78, 451-457.
48. Korchev Y.E., Raval M., Lab M.J., Gorelik J., Edwards C.R., Rayment T., Klenerman D. Hybrid scanning ion conductance and scanning near-field optical microscopy for the study of living cells. *Biophys. J.* 2000, 78, 2675-2679.
49. Seifert J., Rheinlaender J., Novak P., Korchev Y., Schäffer T.E. Comparison of atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy for live cell imaging. *Langmuir.* 2015.
50. Chiao-Chen Chen, Yi Zhou, and Lane A. Baker. Scanning Ion Conductance Microscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry* 2012.

51. Ying LM, Bruckbauer A, Zhou D, Gorelik J, Shevchuk A, et al. The scanned nanopipette: a new tool for high-resolution bioimaging and controlled deposition of biomolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005. 7:2859–66
52. Shevchuk AI, Frolenkov GI, Sanchez D, James PS, Freedman N, *et al.* Imaging proteins in membranes of living cells by high-resolution scanning ion conductance microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006. 45:2212–16.
53. Leo-Macias A, Agullo-Pascual E, Sanchez-Alonso JL, Keegan S, Lin X, Arcos T, Feng-Xia-Liang, Korchev YE, Gorelik J, Fenyó D, Rothenberg E, Delmar M. *et al.* Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc, *Nature communications*, 2016. 7, ISSN: 2041-1723.
54. Яминский И. Маршруты биомедицинской сканирующей зондовой микроскопии. *Наноиндустрия*, 2018, 2, 81, 132–136.
55. Lyon AR, MacLeod KT, Zhang YJ, Garcia E, Kanda GK, et al. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, 6854–59.
56. Ibrahim M, Al Masri A, Navaratnarajah M, Siedlecka U, Soppa GK, *et al.* Prolonged mechanical unloading affects cardiomyocyte excitation-contraction coupling, transverse-tubule structure, and the cell surface. *FASEB J.* 2010, 24:3321–29.
57. Gorelik J, Yang LQ, Zhang YJ, Lab M, Korchev Y, Harding SE. A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure. *Cardiovasc. Res.* 2006. 72, 422–29
58. Piper JD, Clarke RW, Korchev YE, Ying L, Klenerman Det al., 2006, A renewable nanosensor based on a glass nanopipette, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128, 16462-16463, ISSN: 0002-7863.
59. Ахметова А. И., Яминский И. В. Сканирующая капиллярная микроскопия. *Наноиндустрия*. 2017, 7, 78, 42–47.
60. Яминский И. В. Сканирующая капиллярная микроскопия. *Наноиндустрия*. 2016. 1(63), 76–79.

61. Макарова Е., Багров Д., Горелкин П., Яминский И. Наблюдение эритроцитов с помощью атомно-силовой и сканирующей ион-проводящей микроскопии. *Наноиндустрия*, 2015, 2(56), 42–47.
62. Ахметова А. И., Яминский И. В. Сканирующая капиллярная микроскопия. *Наноиндустрия*, 2017, 7, 78, 42–47.
63. Ushiki, T., Ishizaki, K., Mizutani, Y. *et al.* Scanning ion conductance microscopy of isolated metaphase chromosomes in a liquid environment. *Chromosome Res*, 2021, 29, 95–106.
64. Leitao S.M., Drake B., Pinjusic K., *et al.* Time-Resolved Scanning Ion Conductance Microscopy for Three-Dimensional Tracking of Nanoscale Cell Surface Dynamics. *ACS Nano* 2021, 15, 11, 17613–17622.
65. Potter C.M.F., Lundberg M.H., Harrington L.S., Warboys C.M., Warner T.D. Role of shear stress in endothelial cell morphology and expression of cyclooxygenase isoforms. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, 31, 384–414.
66. Sanchez D., Johnson N., Li C., Novak P., Rheinlander J. Noncontact measurement of the local mechanical properties of living cells using pressure applied via a pipette. *Biophys. J.* 2008, 95, 3017–27.
67. M.A. O’Connell, M.E. Snowden, K. McKelvey, F. Gayet, I. Shirley, D.M. Haddleton, P.R. Unwin. Positionable vertical microfluidic cell based on electromigration in a theta pipet. *Langmuir*, 2014, 30:10011–10018.
68. McKelvey K., O’Connell M.A., Unwin P.R. Meniscus confined fabrication of multidimensional conducting polymer nanostructures with scanning electrochemical cell microscopy (SECCM). *Chem. Comm.* 2013, 49, 2986–2988.
69. Paolo A., Sergiy T., Jan C. *et al.* Electrochemical nanoprobe for single-cell analysis. *ACS Nano*. 2014, 8, 1, 875–884.
70. Bruckbauer A., Ying L., Rothery A.M., *et al.* Writing with DNA and Protein Using a Nanopipet for Controlled Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (30):8810–8811 (2002).

71. Rodolfa K.T., Bruckbauer A., Zhou D., *et al.* Nanoscale Pipetting for Controlled Chemistry in Small Arrayed Water Droplets Using a Double-Barrel Pipet. *Nano Lett.*, 2006, 6(2) 252–257.
72. Actis P., Maalouf M.M., Kim H.J., Lohith A., Vilozny B., Seger R.A., Pourmand. N. Compartmental genomics in living cells revealed by single-cell nanobiopsy. *ACS Nano*, 2014, 8:546–553.
73. Nashimoto Y., Takahashi Y., Zhou Y., Ito H., Ida H., Ino K., Matsue T., Shiku H.. Evaluation of mRNA localization using double barrel scanning ion conductance microscopy. *ACS Nano*, 2016, 10:6915–6922.
74. The Nobel Prize in Chemistry 2014 Press Release, Nobel Media AB 2014.
75. Hell S. W., Schmidt R., Egner A. Diffraction-unlimited three-dimensional optical nanoscopy with opposing lenses, *Nat. Photon.* 2009, 3, 381–387.
76. Chen Z., Taflove A., Backman V. Equivalent volume-averaged light scattering behavior of randomly inhomogeneous dielectric spheres in the resonant range. *Opt. Express*, 2004, 12, 1214.
- 77 Lee S. *et al.* Overcoming the diffraction limit induced by microsphere optical nanoscopy, *J. Opt.* 2013, 15 125710.
78. Fan W., Yan B., Wang Z. B., Wu L. M. Three-dimensional all dielectric metamaterial solid immersion lens for subwavelength imaging at visible frequencies, *Sci. Adv.* 2016, 2, e1600901.
79. Pendry J. B. Negative refraction makes a perfect lens. *Phys. Rev. Lett.*, 2000, 85, 3966–9.
80. Zhang X., Liu Z. Superlenses to overcome the diffraction limit. *Nat. Mater.* 2008, 7, 435–441.
81. Rogers E. T., Lindberg J., Roy T., Savo S., Chad J. E., Dennis M. R., Zheludev N. I. A super-oscillatory lens optical microscope for subwavelength imaging. *Nat. Mater.* 2012, 11, 432–435.
82. Bitton O., Bruch R., Leonhardt U. Two-dimensional Maxwell fisheye for integrated optics. *Phys. Rev. Appl.* 2018, 10, 044059.

83. Li H., Fu L., Frenner K., Osten W. Cascaded plasmonic superlens for far-field imaging with magnification at visible wavelength. *Opt. Express*, 2018, 26, 10888–10897.
84. Chen Z., Taflove A., Backman V. Photonic nanojet enhancement of backscattering of light by nanoparticles: a potential novel visible-light ultramicroscopy technique. *Opt. Express*, 2004, 12, 1214–1220.
85. Lu Y.F., Zhang L., Song W. D., Zheng Y. W., Luk'yanchuk B. S. Laser writing of a subwavelength structure on silicon (100) surfaces with particle-enhanced optical irradiation. *J. Exp. Theor. Phys. Lett.* 2000, 72, 457–459.
86. Wang Z. B. *et al.* Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope. *Nat. Commun.* 2011, 2, 218.
87. Krivitsky L. A., Wang J. J., Wang Z., Luk'yanchuk B. Locomotion of microspheres for super-resolution imaging. *Sci. Rep.* 2013, 3, 3501.
88. Yan Y., Li L., Feng C., Guo W., Lee S., Hong M. H. Microsphere coupled scanning laser confocal nanoscope for sub-diffraction limited imaging at 25 nm lateral resolution in the visible spectrum. *ACS Nano*, 2014, 8, 1809–1816.
89. Monks J. N., Yan B., Hawkins N., Vollrath F., Wang Z. B.. Spider silk: mother nature's bio-superlens. *Nano Lett.* 2016, 16, 5842–5845.
90. Li Y., Liu X., Li B. Single-cell biomagnifier for optical nanoscopes and nanotweezers. *Light-Sci. Appl.*, 2019, 8, 61.
91. Wang F., Liu L., Yu H. *et al.* Scanning superlens microscopy for non-invasive large field-of-view visible light nanoscale imaging. *Nat. Commun.* 2016, 7, 13748.
92. Guo M., Ye Y.H., Hou J., *et al.* Size-dependent optical imaging properties of high-index immersed microsphere lens. *Appl. Phys. B* 2016, 122, 65.
93. Lee S., Li L., Wang Z., *et al.* Immersed transparent microsphere magnifying sub-diffraction-limited objects. *Appl. Opt.* 2013, 52, 7265-7270.
94. Hao X., Kuang C., Liu X., Zhang H., Li Y.. Microsphere based microscope with optical super-resolution capability. *Appl. Phys. Lett.* 2011, 99, 203102.

95. Wang F., Yang S., Ma H., *et al.* Microsphere-assisted super-resolution imaging with enlarged numerical aperture by semi-immersion. *Appl. Phys. Lett.* 2018, 112, 023101.
96. Du B., Ye YH., Hou J., *et al.* Sub-wavelength image stitching with removable microsphere-embedded thin film. *Appl. Phys. A*, 2016, 122, 15.
97. Butt H.-J. A Sensitive Method to Measure Changes in the Surface Stress of Solids. *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, 180, 251–260.
98. Zhao Y., Ganapathysubramanian B., Shrotriya P. Cantilever deflection associated with hybridization of monomolecular DNA film, *J. Appl. Phys.* 2012, 111.
99. Biswal S.L., Raorane D., Chaiken A., *et al.* Nanomechanical detection of DNA melting on microcantilever surfaces, *Anal. Chem.* 2006, 78, 7104–7109.
100. Thundat T., Wachter E.A., Sharp S.L., *et al.* Detection of mercury-vapor using resonating microcantilevers, *Appl. Phys. Lett.* 1995, 66, 1695–1697.
101. Kim H.H., Jeon H.J., Cho H.K., *et al.* Highly sensitive microcantilever biosensors with enhanced sensitivity for detection of human papilloma virus infection, *Sens. Actuators B: Chem.* 2015, 221, 1372–1383.
102. Lavrik N.V., Sepaniak M.J., Datskos P.G. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors, *Rev. Sci. Instrum.* 2004, 75 2229–2253.
103. Fritz J. Cantilever biosensors. *Analyst*, 2008, 133 (7), 855–863.
104. Arntz Y., Seelig J.D., Lang H.P., *et al.* Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array, *Nanotechnology*, 2003, 14, 86–90.
105. Thundat T., Warmack R.J., Chen G.Y., *et al.* Thermal and ambient-induced deflections of scanning force microscope cantilevers, *Appl. Phys. Lett.* 1994, 64, 2894–2896.
- 106 Kim H.H., Jeon H.J., Cho H.K., *et al.* Highly sensitive microcantilever biosensors with enhanced sensitivity for detection of human papilloma virus infection, *Sens. Actuators B: Chem.* 2015, 221, 1372–1383.

107. Li H., Bai X., Wang N., *et al.* Aptamer-based microcantilever biosensor for ultrasensitive detection of tumor marker nucleolin, *Talanta*, 2016, 146, 727–731.
108. Loo L., Capobianco J. A., Wu W., *et al.* Highly sensitive detection of HER2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients by piezoelectric microcantilevers. *Anal. Chem.* 2011, 83, 3392.
109. Capobianco J. A., Shih W. H., Leu J. H., Lo G. C., Shih W. Y. Label free detection of white spot syndrome virus using lead magnesium niobate–lead titanate piezoelectric microcantilever sensors. *Biosens. Bioelectron.* 2010, 26, 964.
110. McGovern J. P., Shih W. Y., Rest R., Purohit M., Pandya Y., Shih W. H. Label-free flow-enhanced specific detection of *Bacillus anthracis* using a piezoelectric microcantilever sensor, *Analyst*, 2008, 133, 649.
- 111 Д. Колесов, И. Яминский, А. Ахметова, О. Сеницына, Г. Мешков. Кантилеверные биосенсоры для обнаружения вирусов и бактерий. *Наноиндустрия*, 2016, 66(4), 26–35.
- 112 Колесов Д., Ахметова А. И., Яминский И. В., Сеницына О. В., Мешков Г. Б. Кантилеверные биосенсоры для обнаружения вирусов и бактерий. *Наноиндустрия*, 2016, 67(5), 90–98
- 113 Erofeev A. S. Gorelkin P. V., Kolesov D. V., Yaminsky I. V. Label-free sensitive detection of influenza virus using pzt discs with a synthetic sialylglycopolymer receptor layer. *Royal Society Open Science*, 2019, 6, 190255.
114. Feng, X. L., He, R. R., Yang, P. D., Roukes, M. L. Very high frequency silicon nanowire electromechanical resonators. *Nano Letters*, 2007, 7 (7), 1953–1959.
115. Lee, J., Shen, W. J., Payer, K., Burg, T. P., & Manalis, S. R. Toward attogram mass measurements in solution with suspended nanochannel resonators. *Nano Letters*, 2010, 10 (7), 2537–2542
116. Kwon, H.-S., Han, K.-C., Hwang, K. S., Lee, J. H., Kim, T. S., Yoon, D. S., & Yang, E. G. Development of a peptide inhibitor-based cantilever sensor assay for cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 585 (2), 344–349.

117. Kwon, D. H., An, H. H., Kim, H. S., Lee, J. H., Suh, S. H., Kim, Y. H., & Yoon, C. S. Electrochemical albumin sensing based on silicon nanowires modified by gold nanoparticles. *Applied Surface Science*, 2011, 257 (10), 4650–4654.
118. Lutwyche, M. I., Despont, M., Drechsler, U., Dürig, U., Häberle, W., Rothuizen, H., Vettiger, P. (2000). Highly parallel data storage system based on scanning probe arrays. *Applied Physics Letters*, 77 (20), 3299–3301.
119. Shuh W.Y., Zhu Q., Shih W.-H. Length and thickness dependence of longitudinal flexural resonance frequency shifts of a piezoelectric microcantilever sensor due to Young's modulus change. *J. Appl. Phys.*, 2008, 104, 074503.
120. Burg T. P., Godin M., Knudsen S. M., Shen W., Carlson G., Foster J. S., *et al.* Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, 2007, 446, 1066–1069.
- 121 Gfeller K. Y., Nugaeva N., Hegner M. Micromechanical oscillators as rapid biosensor for the detection of active growth of *Escherichia coli*. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21, 528–533.
- 122 Chen Y., Qian C., Liu C., *et al.* Nucleic acid amplification free biosensors for pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.* 2020, 153, 112049, 1-17.
- 123 Han S., Soyulu M.C., Kirimli C.E., *et al.* Rapid, label-free genetic detection of enteropathogens in stool without genetic isolation or amplification. *Biosens. Bioelectron.* 2019. 130, 73–80.
- 124 Kirimli C.E., Shih W.-H., Shih W.Y. Specific in situ hepatitis b viral double mutation (hbvdm) detection in urine with 60 copies ml⁽⁻¹⁾ analytical sensitivity in a background of 250-fold wild type without DNA isolation and amplification. *Analyst*, 2015, 140 (5), 1590–1598.
- 125 Wu W., Kirimli C.E., Shih W.H., Shih W.Y. Real-time, in situ DNA hybridization detection with attomolar sensitivity without amplification using (pb(mg1/3nb2/3) o3)0.65-(pbtio3)0.35 piezoelectric plate sensors. *Biosens. Bioelectron.* 2013, 43, 391–399.

- 126 Dubrovin E.V., Presnova G.V., Rubtsova M.Yu., *et al.* Application of atomic force microscopy for 3D analysis of the results of hybridization of nucleic acids on microchips. *Acta naturae*, 2015, 7, 117–124.
127. Kirimli CE, Shih WH, Shih WY (2015) Specific in situ hepatitis B viral double mutation (HBVDM) detection in urine with 60 copies ml⁽⁻¹⁾ analytical sensitivity in a background of 250-fold wild type without DNA isolation and amplification. *Analyst* 140:1590–1598.
128. Dell’Atti D., Zavaglia M., Tombelli S., Bertacca G., Cavazzana A. O., Bevilacqua G., Minunni M., Mascini M., *Clin. Chim. Acta*, 2007, 383, 140.
129. Chen Q., Bian Z., Hua X., Yao C., Wu W., Zhang X., Zhang B., Huang J., Tang W., Fu W. Detection of hybridization of single-strand DNA PCR products in temperature change process by a novel metal-clamping piezoelectric sensor. *Biosens. Bioelectron.* 2010, 25, 2161-2166.
130. Gfeller K. Y., Nugaeva N., Hegner M. Rapid biosensor for detection of antibiotic-selective growth of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 2626–2631.
131. Nugaeva N., Gfeller K. Y., Backmann N., Lang H.P., Düggelein M., Hegner M. Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21, 849–856.
132. Longo G., Alonso-Sarduy L., Rio L. M., Bizzini A., Trampuz A., Notz J., *et al.* Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nat. Nanotech.* 2013, 8, 522–526.
133. Aghayee S., Benadiba C., Notz J., Kasas S., Dietler G., Longo G. Combination of fluorescence microscopy and nanomotion detection to characterize bacteria. *J. Mol. Recognit.* 2013, 26, 590–595.
134. Wu G., Datar R. H., Hansen K. M., Thundat T., Cote R. J., Majumdar A. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 856–860.

135. Arntz, Y., Seelig, J.D., Lang, H.P., Zhang, J., Hunziker, P., Ramseyer, J.P., Meyer, E., Hegner, M. & Gerber, C. Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array. *Nanotechnology*, 2003, 14, 86-90.
136. Vasan AS, Mahadeo DM, Doraiswami R, Huang Y, Pecht M. Point-of-care biosensor system. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2013, 5, 39-71.
137. Zhu, W., Chen, L., Yang, Z. et al. Automatic detection of *Staphylococcus aureus* and *Shigella dysenteriae* with separated electrodes series piezoelectric sensing technique. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24, 1073–1079.
138. Shen, Z.Q., Wang, J.F., Qiu, Z.G., Jin, M., Wang, X.W., Chen, Z.L., Li, J.W., Cao, F.H. Qcm immunosensor detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold. *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26 (7), 3376–3381.
139. Campbell, G.A., Uknalis, J., Tu, S.I., Mutharasan, R. Detect of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef samples using piezoelectric excited millimeter-sized cantilever (pemc) sensors. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22 (7), 1296–1302.
140. Kirimli, C., Lin, S., Su, Y.H., Shih, W.H., Shih, W.Y. In situ, amplification-free double-stranded mutation detection at 60 copies/ml with thousand-fold wild type in urine. *Biosens. Bioelectron.* 2018, 119, 221–229.
141. Kirimli, C.E., Shih, W.-H., Shih, W.Y. Specific in situ hepatitis B viral double mutation (hbvdm) detection in urine with 60 copies ml⁻¹ analytical sensitivity in a background of 250-fold wild type without DNA isolation and amplification. *Analyst* 2015, 140 (5), 1590–1598.
142. Han, S., Soylu, M.C., Kirimli, C.E., Wu, W., Sen, B., Joshi, S.G., Emery, C.L., Au, G., Niu, X., Hamilton, R., Krevolin, K., Shih, W.H., Shih, W.Y. Rapid, label-free genetic detection of enteropathogens in stool without genetic isolation or amplification. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 130, 73–80.
143. Gorelkin P. V., Erofeev A. S., Kiselev G. A., Kolesov D. V., Dubrovin E. V., Yaminsky I. V. Synthetic sialylglycopolymer receptor for virus detection using cantilever-based sensors. *The Analyst*, 2015, 140(17), 6131–6137.

144. Ji H.F., Armon B.D. Approaches to increasing surface stress for improving signal-to-Noise ratio of microcantilever sensors, *Anal. Chem.* 2010, 82, 1634–1642.
145. Dixon, M. C. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling realtime characterization of biological materials and their interactions. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 2008, 19, 151.
146. Burg T.P., Godin M., Knudsen S.M., Shen W., Carlson G., Foster J.S., Babcock K., Manalis S.R. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, 2007, 446, 1066-1069.
147. Arlett, J., Myers, E. & Roukes, M. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nature nanotechnology*, 2011, 6, 203-215.
148. Boisen, A., Dohn, S., Keller, S. S., Schmid, S., Tenje, M. Cantilever-like micromechanical sensors. *Reports on Progress in Physics*, 2011, 74, 036101.
149. Gupta A., Akin D., Bashir R.. Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness. *Appl. Phys. Lett.*, 2004, 84, 11, 1976-1978.
150. Jensen K., Kim Kwanpyo, Zettl A. An atomic-resolution nanomechanical mass sensor. *Nature Nanotechnology*, 2008, 3, 533 - 537.
- 151 Cooper M.A., Dultsev F.N., Minson T., Ostanin V.P., Abell C., Klenerman D. *Nature Biotechnology*, 2001, 19 (9), 833-7.
152. Mohammed Asef Iqbal, S.G. Gupta, Hussaini S.S. A Review on Electrochemical Biosensors: Principles and Applications. *Advances in Bioresearch*, Volume 3[4], December 2012, 158 – 163.
153. Wei Wu, Wei-Heng Shih, Wan Y. Shih. Direct observation of binding stress-induced crystalline orientation change in piezoelectric plate sensors. *Journal of Applied Physics*, 2016, 119, 124512.
154. Wan Y. Shih, Qing Zhu, Wei-Heng Shih. Length and thickness dependence of longitudinal flexural resonance frequency shifts of a piezoelectric microcantilever sensor due to Young's modulus change. *Journal of Applied Physics*, 2008, 104, 074503.

155. US20140315284 - Enhanced detection sensitivity with piezoelectric microcantilever sensors. Wan Y. Shih, Wei-Heng Shih, Qing Zhu. https://patentscope.wipo.int/search/ru/detail.jsf?docId=US123301839&_cid=P22-KIHASK-17106-1
156. Ломоносов А.М., Ахметова А.И., Яминский И.В. Анализатор бактерий на основе сканирующей зондовой микроскопии с передачей данных дистанционным способом. Медицина и высокие технологии, 2018, 2, 14-20.
157. Yaminsky I. V., Akhmetova A. I., Meshkov G. B. FemtoScan Online software and visualization of nanoobjects in high resolution microscopy. Nanoindustry, 2018, 11, 6 (85), 414–416.
158. Ахметова А. И., Яминский И. В., Ванг З. Интеграция методов сканирующей зондовой микроскопии и матричной технологии оптических суперлинз. Наноиндустрия, 2020, 13, 5 (98), 258–262.
159. Wang F., Liu L., Yu H. *et al.* Scanning superlens microscopy for non-invasive large field-of-view visible light nanoscale imaging. Nat Commun, 2016, 7, 13748.
160. Luk'yanchuk B. S., Paniagua-Domínguez R., Minin I., Minin O., Wang Z. Refractive index less than two: photonic nanojets yesterday, today and tomorrow. Opt. Mater. Express, 2017, 7, 1820-1847.
161. Cherian S., Gupta R.K., Mullin B.C., Thundat Th. Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors. Biosensors and Bioelectronics 2003, 19 411-416.
162. Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Kolesov D. V., Kiselev G. A., Dubrovin E. V., Yaminsky I. V. Label-free sensitive detection of influenza virus using PZT discs with a synthetic sialylglycopolymer receptor layer. Royal Society Open Science, 2019, 6:190255.
- 163 Ахметова А. И., Яминский И. В., Павлова М. А. Раннее обнаружение вирусных инфекций с использованием твердотельных пьезокерамических биосенсоров. Наноиндустрия, 2020, 13, 3-4 (97), 188–195.

164. Фрид Е.А., Азарх С.Х. Пьезокерамические фильтры. М.: Энергия, 1967. – 40.
165. Yaminsky I.V., Filonov A.S., Sinitsyna O.V., Meshkov G.B. FemtoScan Online software. *Nanoindustry*, 2016, 2, 64, 42–46.
166. Makarova E., Bagrov D., Gorelkin P., Erofeev A., Yaminsky I. Observations of erythrocytes using atomic force and scanning ion-conducting microscopy. *Nanoindustry*, 2015, 2, 56, 42-48.
167. Gorshkova E., Pleskova S., Mikheeva E. Atomic force microscopy of human blood cells. *Nanoindustry* 2012, 4, 34, 50-53
168. Utkin D. V., Bulgakova E. G., Erokhin P. S., Kuznetsov O. S., Kuklev V. E., Osina N. A. Study of the morphological features of *Yersinia pestis* bacterial cells grown under different temperature conditions using atomic force microscopy. *Izvestiya SSU New series. Series Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, 19, 1, 87-93.
- 169 Битюцкая Л.А. и др. (сост.) Нанотехнологии в физике. Дистанционная лаборатория атомно-силовой микроскопии нанообъектов. Часть 1: Тестирование. Обработка и анализ изображения – Учебное пособие, Воронеж: Воронежский государственный университет, — 2007.
170. Макарова, Е.С., Яминский, И.В. Изучение взаимодействия вируса гриппа с единичными клетками эпителия и эритроцитами. *Медицина и высокие технологии*, 2016, 1, 39-55.
171. Choi HJ, Fukui M, Zhu BT. Role of cyclin B1/Cdc2 up-regulation in the development of mitotic prometaphase arrest in human breast cancer cells treated with nocodazole. *PLoS One*. 2011, 6 (8), e24312.
172. Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 1965, 205, 698–699.
173. Яминский И., Ахметова А. Построение, обработка и анализ трехмерных изображений в биомедицинской сканирующей зондовой микроскопии. *Наноиндустрия*, 2021, 7-8 (15), 430-433.

174. Трещалина А., Постникова Ю., Боравлева Е.; Гамбарян А., Белякова А., Ишмухаметов А., Садыкова Г., Прилипов А., Ломакина Н. Замена Arg140Gly в гемагглютинине снижает вирулентность высокопатогенного вируса птичьего гриппа H7N1. *Вирусы*, 2021, 13, 1584.
175. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-0758-8_1
176. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008, 12, 26 Suppl 4, D49-53.
177. Vointseva I.I., Gembitskiy P.A.. Polyguanidines - disinfectants and multifunctional additives in composite materials. Moscow, LKM-press, 2009, 303.
178. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I. Studies of viruses and bacteria using scanning probe microscopy. *Medicine and High Technologies*, 2020, 3, 17–20.
179. Яминский И., Ахметова А. Бактерии и вирусы в объективе зондовой микроскопии. *Медицина и высокие технологии*, 2021, 3, 72-74.
180. Chapter 3 - Supragingival Microbes, Editor(s): Xuedong Zhou, Yuqing Li, *Atlas of Oral Microbiology*, Academic Press, 2015, Pages 41-65, ISBN 9780128022344.
181. Воробьев А. А., Быков А. С., Пашков Е. П., Рыбакова А. М. *Микробиология: Учебник. 2-е изд., перераб. и доп. М. : Медицина, 2003, 307. 336 с. ил. — (Учеб. лит. для студ. фарм. вузов). — ISBN 5-225-04411-5.*
182. Karyakin A. A., Presnova G.V., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M. Oriented Immobilization of Antibodies onto the Gold Surfaces via Their Native Thiol Groups. *Anal. Chem.* 2000, 72, 3805-3811.
183. Яминский И. В., Ахметова А. И., Мешков Г. Б. Физические методы обнаружения вирусов и бактерий с использованием инструментов сканирующей зондовой микроскопии. *Наноиндустрия*. 2017, 3, 73, 56–59.
184. Яминский И., Ахметова А., Назаров И. Детектирование вируса гриппа А с применением пьезокерамических кантилеверов. *Медицина и высокие технологии*, 2017, 1, 5–9.

185. Ахметова А., Назаров И., Преснова Г., Рубцова М. Ю., Егоров А., Яминский И. Обнаружение белковых биомакромолекул с помощью пьезокерамического биочипа. Наноиндустрия, 2017, 8(79), 44–49.

**ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в журналах,
индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ:**

- A1. Wang Z., Lukyanchuk B., Wu B., Yan B., **Akhmetova A.**, Yaminsky I., Yu H., Liu L. Optical super-resonances in dielectric microsphere particles. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1215205. 2022. Impact Factor SJR 0.238.
- A2. **Akhmetova A. I.**, Yaminsky I. V. High resolution imaging of viruses: scanning probe microscopy and related techniques. Methods. 2021. 197, 30-38. Q1, Impact Factor WoS 3.608.
- A3. **Akhmetova A. I.**, Gukasov V. M., Rybakov Y. L., Yaminsky I.V. High-speed scanning probe microscopy in biomedicine. Bio-Medical Engineering. 2021. 6, 54, 434–437. Q2, Impact Factor WoS 0.233.
- A4. Яминский И В., **Ахметова А. И.** Атомно-силовая микроскопия: изучение вирусов. Наноиндустрия. 2021. 2, 14, 102–107. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A5. Яминский И. В., **Ахметова А. И.** Электромеханические кантилеверные сенсоры для обнаружения биологических объектов. Наноиндустрия. 2021. 3-4, 14, 22-28. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A6. Яминский И. В., **Ахметова А. И.** Бактерии и вирусы в объективе зондовой микроскопии. Медицина и высокие технологии. 2021. 3, 72–74. Импакт-фактор по РИНЦ 0,4.
- A7. **Ахметова А. И.**, Яминский И. В. Программное обеспечение ФемтоСкан Онлайн в исследовании вирусов. Наноиндустрия. 2021. 14, 1, 103, 62–67. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A8. Яминский И. В., **Ахметова А. И.** Построение, обработка и анализ трехмерных изображений в биомедицинской сканирующей зондовой микроскопии. Наноиндустрия. 2021. 14, 7-8, 430-433. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A9. Yaminsky I. V., **Akhmetova A. I.**, Kur'yakov V. N., Obolenskaya L. N., Kotlyarova N. V. Hydrosols of titanium dioxide nanoparticles containing

ti(iv) peroxo complexes: Modification, optical properties, morphology, and bleaching kinetics. *Inorganic Materials*, 2020, 56, 11, 1159–1166. Q3, Impact Factor WoS 0,844.

- A10. **Ахметова А. И.**, Яминский И. В. Пьезокерамические биосенсоры для обнаружения вирусов, бактерий, белков. *Гены и клетки*. 2019. 14, № S, 29–30. Импакт-фактор по РИНЦ 0,535.
- A11. **Ахметова А.**, Яминский И. Раннее обнаружение вирусов и бактерий с использованием методов нанотехнологий. *Наноиндустрия*. 2017. 71, 1, 70–74. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A12. Яминский И., **Ахметова А.**, Назаров И. Детектирование вируса гриппа А с применением пьезокерамических кантилеверов. *Медицина и высокие технологии*. 2017. 1, 5–9. Импакт-фактор по РИНЦ 0,4.
- A13. Яминский И. В., **Ахметова А. И.**, Мешков Г. Б. Физические методы обнаружения вирусов и бактерий с использованием инструментов сканирующей зондовой микроскопии. *Наноиндустрия*. 2017. 3, 73, 56–59. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A14. **А. Ахметова**, И. Назаров, Г. Преснова и др. Обнаружение белковых биомакромолекул с помощью пьезокерамического биочипа. *Наноиндустрия*. 2017. 8, 79, 44–49. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A15. Д. Колесов, И. В. Яминский, **А. И. Ахметова** и др. Кантилеверные биосенсоры для обнаружения вирусов и бактерий. *Наноиндустрия*. 2016. 66, 4, 26–35. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A16. **А. И. Ахметова**, И. В. Яминский, О. В. Сеницына, Г. Б. Мешков. Метрологическое обеспечение в бионаноскопии. *Наноиндустрия*. 2016. 66, 4, 36–39. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A17. **Ахметова А.И.**, Яминский И.В. и др. Обнаружение вирусов и бактерий в сканирующей зондовой микроскопии. *Наноиндустрия*. 2016. 69, 7, 80–85. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.
- A18. **Ахметова А.**, Гутник Н., Мешков Г., Назаров И., Сеницына О., Яминский И. Биосенсор для обнаружения вирусов и бактерий в

жидкостях. Наноиндустрия. 2016. 70, 8, 22–27. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.

A19. Колесов Д., **Ахметова А.И.**, Яминский И.В., Сеницына О.В., Мешков Г.Б. Кантилеверные биосенсоры для обнаружения вирусов и бактерий. Наноиндустрия. 2016. 67, 5, 90–98. Импакт-фактор по РИНЦ 1,129.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в сборниках, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ

M1. **Akhmetova A. I.**, Yaminsky I. V. The role of scanning probe microscopy in bacteria investigations and bioremediation. Abatement of Environmental Pollutants: Trends and Strategies. ELSEVIER INC, 2019, 14, 287-312.

Патенты

1. Яминский И.В., **Ахметова А.И.**, Соснин В.С., Яминский Д.И., Мешков Г.Б., Оленин А.В. Проточная жидкостная ячейка для сканирующей зондовой микроскопии. Патент №2645884, 28.02.2018
2. Соснин В.С., **Ахметова А.И.**, Яминский И.В., Яминский Д.И., Мешков Г.Б., Оленин А.В. Проточная жидкостная ячейка для сканирующей зондовой микроскопии. Патент №2638365, 13.12.2017
3. Назаров И.А., **Ахметова А.И.**, Яминский И.В., Мешков Г.Б., Сагитова А.В. Биосенсорное устройство для обнаружения биологических микро- и нанообъектов. Патент №2636048, 17.11.2017

Список тезисов международных и всероссийских конференций:

- 1) **Ахметова А. И.**, Яминский И. В. Биофизические принципы обнаружения биомакромолекул с помощью пьезокерамических биосенсоров // Труды XXV Международного симпозиума. — Т. 1. — Издательство Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского Нижний Новгород, 2021. — С. 285–286.
- 2) **Ахметова А. И.**, Яминский И. В. Зондовая микроскопия в исследовании вирусов // Биотехнология: состояние и перспективы развития. —

- Международный форум Биотехнология: состояние и перспективы развития. — 2020. — С. 119–120.
- 3) **Ахметова А. И., Яминский И. В.** Обнаружение биологических агентов с помощью электромеханических биосенсоров // Биотехнология: состояние и перспективы развития. — Международный форум Биотехнология: состояние и перспективы развития. — 2020. — С. 120–122.
 - 4) **Ахметова А. И., Яминский И. В.** Обнаружение биологических агентов с помощью пьезокерамических биосенсоров // Тезисы докладов 2-й Научно-практической конференции ученых России и Хорватии. — НИТУ МИСиС, 2020 Москва, 2020. — С. 39.
 - 5) **Ахметова А. И., Яминский И. В.** Сканирующая капиллярная микроскопия: новые возможности для биомедицины // Тезисы докладов 2-й Научно-практической конференции ученых России и Хорватии. — НИТУ МИСиС, 2020 Москва, 2020. — С. 40.
 - 6) **Akhmetova A. I., Yaminsky I. V.** Detection of proteins, viruses, bacteria using scanning probe microscopy // Scanning Probe Microscopy. Russia-China Workshop on Dielectric and Ferroelectric Materials. Abstract Book of Joint International Conference. — Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, 2019. — P. 100.
 - 7) **Ахметова А. И., Яминский И. В.** Биофизические принципы обнаружения вирусов, бактерий и биомакромолекул с помощью пьезокерамических биосенсоров // Тезисы докладов международной конференции “Физика А”. — Санкт-Петербург, 2019. — С. 34.
 - 8) **Ахметова А. И., Яминский И. В., Сенотрусова С. А.** Микролинзы для оптики масштаба нано // Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем. — Москва, 2021. — С. 56.