

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ахметова Ассель Иосифовна

**ОБНАРУЖЕНИЕ, ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ ВИРУСОВ,
БАКТЕРИЙ И КЛЕТОК МЕТОДАМИ БИОНАНОСКОПИИ**

Специальность 1.1.10 Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва

2022

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель	—	Яминский Игорь Владимирович , доктор физико-математических наук, профессор
Официальные оппоненты	—	Шайтан Алексей Константинович , член-корреспондент РАН, профессор РАН, доктор физико-математических наук, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии, доцент Батищев Олег Вячеславович , доктор физико-математических наук, ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, заместитель директора института по научной работе Иванов Дмитрий Анатольевич , кандидат физико-математических наук, Институт проблем химической физики РАН, отдел полимеров и композиционных материалов, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «25» октября 2022 г. в 15.30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.011.1 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, ауд. 5-68.

E-mail: info@physics.msu.ru

Диссертация находится на хранении в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/472593252/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.011.1
доцент, кандидат технических наук

Сидорова А.Э.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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.

Основное содержание работы

В введении обоснована актуальность темы диссертации, формулируется цель работы, обсуждается новизна и практическая значимость полученных результатов.

В главе 1 представлен обзор литературы по теме диссертационной работы. Особое внимание уделено исследованиям вирусов, бактерий методами зондовой и микролинзовой микроскопии. Проанализированы работы зарубежных исследовательских групп, посвященные зондовой и микролинзовой микроскопии, кантилеверным сенсорам, указаны преимущества и недостатки методов. Приводится описание последних достижений при измерении вирусов, бактерий, клеток с помощью атомно-силовой, капиллярной и микролинзовой микроскопии. Рассмотрены различные моды колебаний датчиков, определяется оптимальный формат работы пьезокерамического биосенсора для целей обнаружения в жидкости. В конце главы формулируются выводы из анализа литературных

данных о перспективности используемых методов для оценки морфологии биологических объектов.

В главе 2 приводится подробное описание использованных приборов и методов исследования. Описываются метод атомно-силовой микроскопии, устройство сканирующего капиллярного микроскопа, устройство пьезокерамического биосенсора, который использовался для проведения экспериментов по определению активности антител на альбумин, объясняется принцип микролинзовой микроскопии.

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 100 нм, ширина в 450 нм и расстояние между питами в 1750 нм соотносятся по данным АСМ и СКМ (Рисунок 1)

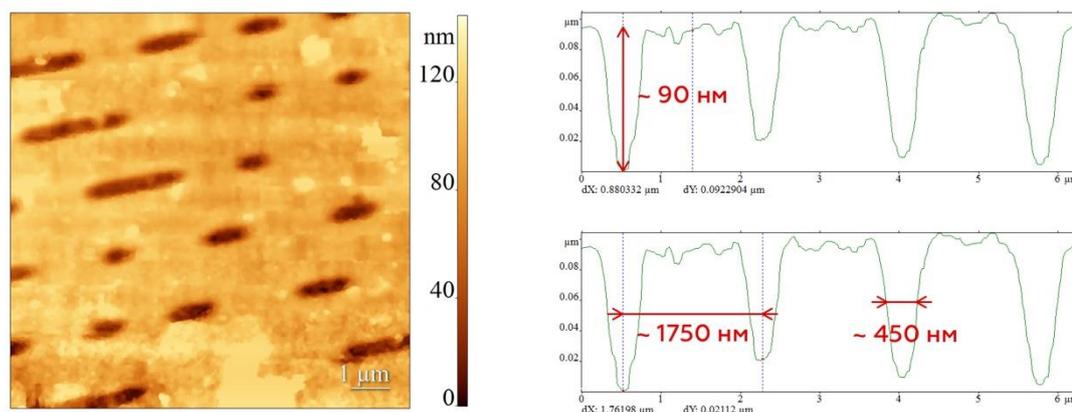


Рисунок 1. Слева СКМ снимок CD-диска и измерение характерных параметров питов по данным сечения.

Для калибровки метода микролинзовой микроскопии был проведен теоретический расчет увеличения, в соответствии с которым увеличение должно составлять 2,12-2,17. Экспериментально было подтверждено, что микролинза из титаната бария диаметром 62 мкм в силиконовом масле дает увеличение 2,2.

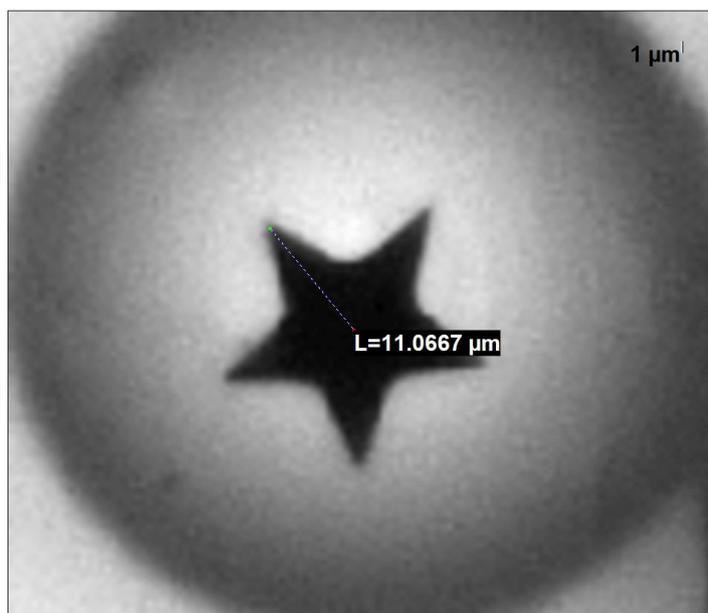


Рисунок 2. Изображение структуры на стеклянном образце с золотым напылением. Микросфера BaTiO_3 диаметром 62 мкм дает увеличенное изображение звезды, расстояние от центра изображения звезды до вершины составляет 11 мкм. Реальное расстояние на структуре составляет 5 мкм.

Предлагаемое решение биосенсора состоит из пьезокерамического биочипа в виде диска с диаметром 0,1-3 мм. 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. Измерительная система биосенсора реализована с использованием электроники зондового микроскопа ФемтоСкан.

В биочипе возбуждаются продольные колебания, которые приводят к растяжению/сжатию сенсорной пленки с прикрепленными частицами. 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 [1] (Рисунок 3).

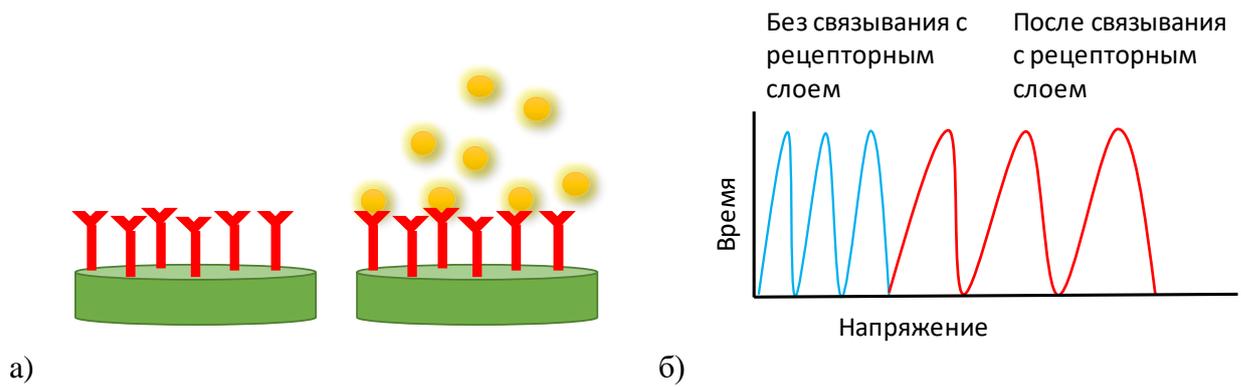


Рисунок 3. а) Пьезоэлектрический диск с антителами (слева) и после присоединения антигенов (справа); б) график зависимости амплитуды колебаний во время обнаружения: синяя до связывания мишени с рецепторным слоем на поверхности диска, красная – после присоединения

В главе 3 представлены результаты СЗМ-исследования клеток, вирусных и бактериальных частиц. Проведено сравнение морфологических характеристик эритроцитов, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии, сканирующей капиллярной и микролинзовой микроскопии. Измерена с помощью микролинзовой (Рисунок 4) и капиллярной микроскопии (Рисунок 5) кинетика трансформации эритроцита в эхиноцит.

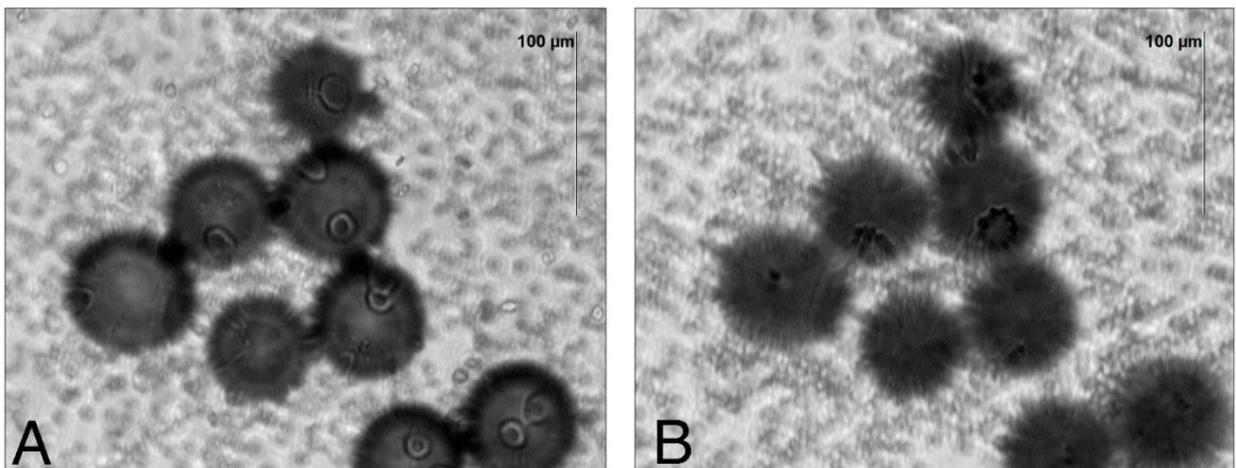


Рисунок 4. Изображения различных стадий трансформации эритроцитов с помощью микролинзовой микроскопии. Общй план. Увеличение объектива 40х. (А) Начальная стадия. (В) Состояние эритроцитов через 70 минут: эхиноциты.

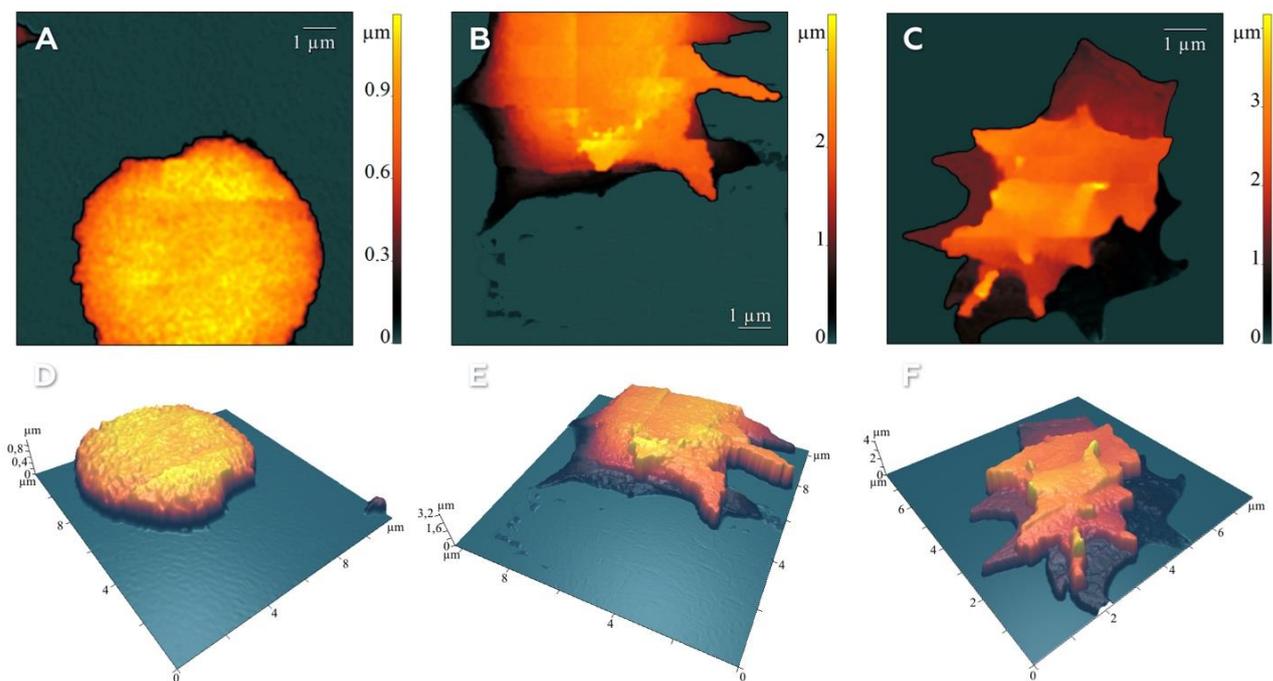


Рисунок 5. 2D и 3D топография исследуемых клеток крови в различные моменты времени: начало формирования эхиноцита через 1 час после нанесения образца (A и D), формирующийся эхиноцит через 2 часа после нанесения (B и E) и сформировавшийся эхиноцит через 3,5 часа (C и F)

Показана морфология клеточной поверхности, которая также прямо указывает на организацию субмембранных структур: различимо ядро клетки (показано желтым градиентом на 2D и 3D видах, *Рисунок б*), что соотносится с данными оптической микроскопии. С помощью капиллярной микроскопии исследованы структурные особенности опухолевых клеток: измерена шероховатость клеток в области ядрышка и в области отростков. Проведено сравнение контрольных образцов клеток Hela и обработанных цисплатином и нокодазолом, оценено изменение шероховатости клеток при воздействии лекарственных препаратов, наибольшее изменение шероховатости зафиксировано при обработке клеток нокодазолом.

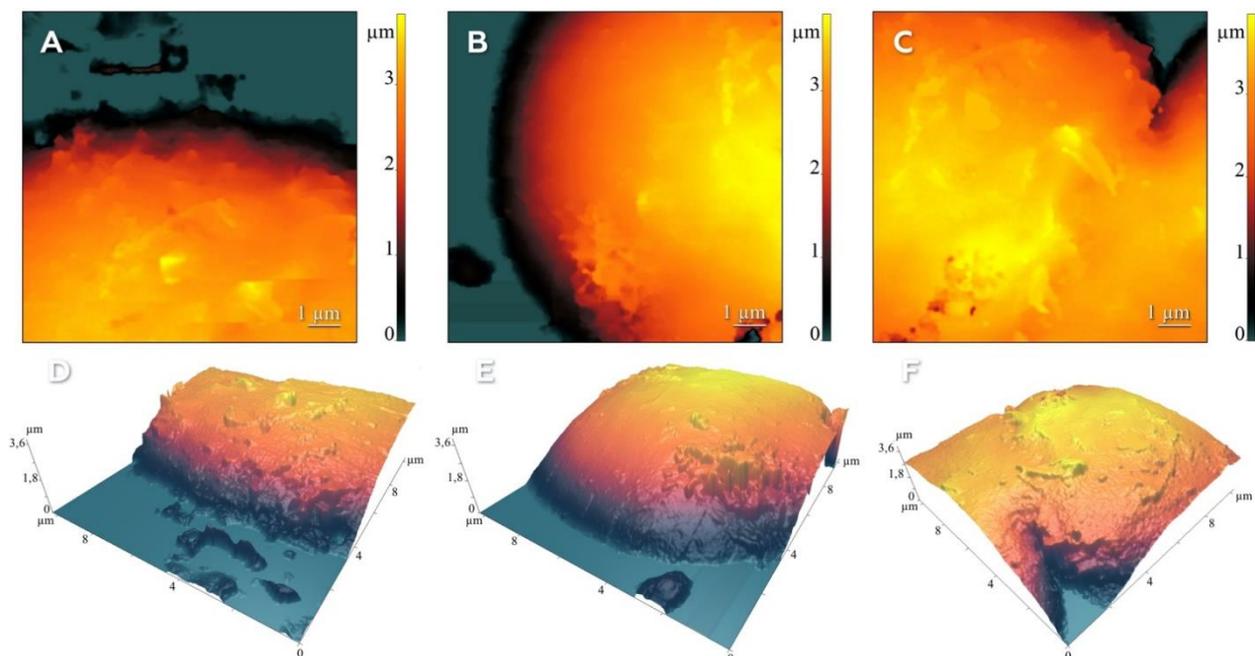


Рисунок 6. Сканирующая капиллярная микроскопия клеток карциномы человека. А, В, С – 2D вид, D, E, F – 3D топография сканируемых областей.

Приведен анализ изображений вируса клещевого энцефалита, полученные методами просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопии, изучены структурные особенности частиц, рассчитана упругость и шероховатость объектов, определен характер сорбции на разных подложках (графит и слюда). Исследованы вирусы гриппа А H1N1, H7N1, определен характер сорбции вирусных частиц на подложке из графита, а также с применением мембраны для фильтрации образца (Рисунок 7).

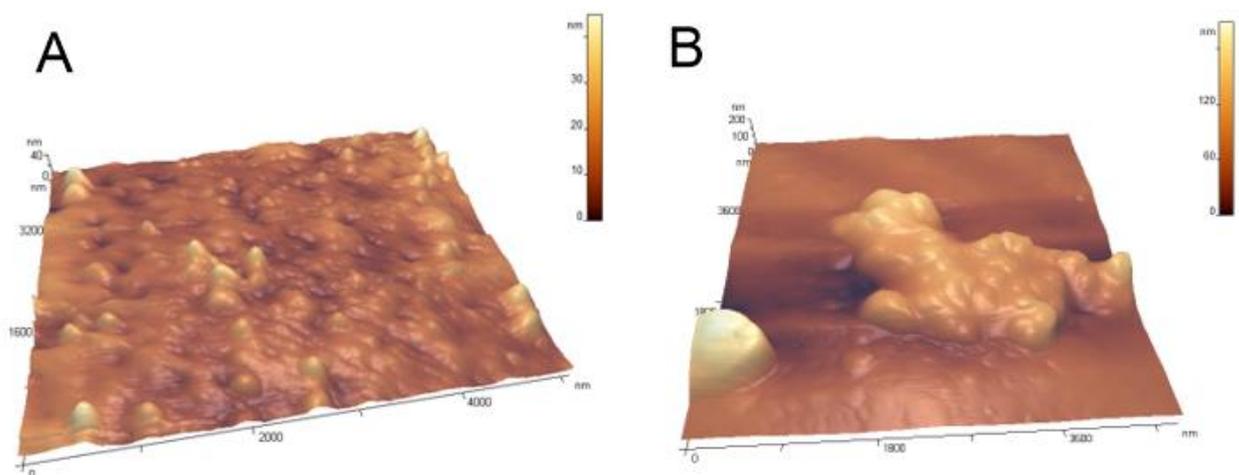


Рисунок 7. Атомно-силовая микроскопия изображений вирусов гриппа А, которые прошли через мембрану (А) и удерживаются мембраной (В). Максимальная высота на изображении А находится в пределах 30-40 нм, на изображении В около 180-200 нм.

Исследован характер адсорбции вирусных частиц на SERS-сенсоре в резонансном режиме АСМ (Рисунок 8). 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. При исследовании контрольной зоны на образце обнаруживаются лишь частицы серебряного напыления, адсорбции вируса болезни Ньюкастла (NDV) не произошло.

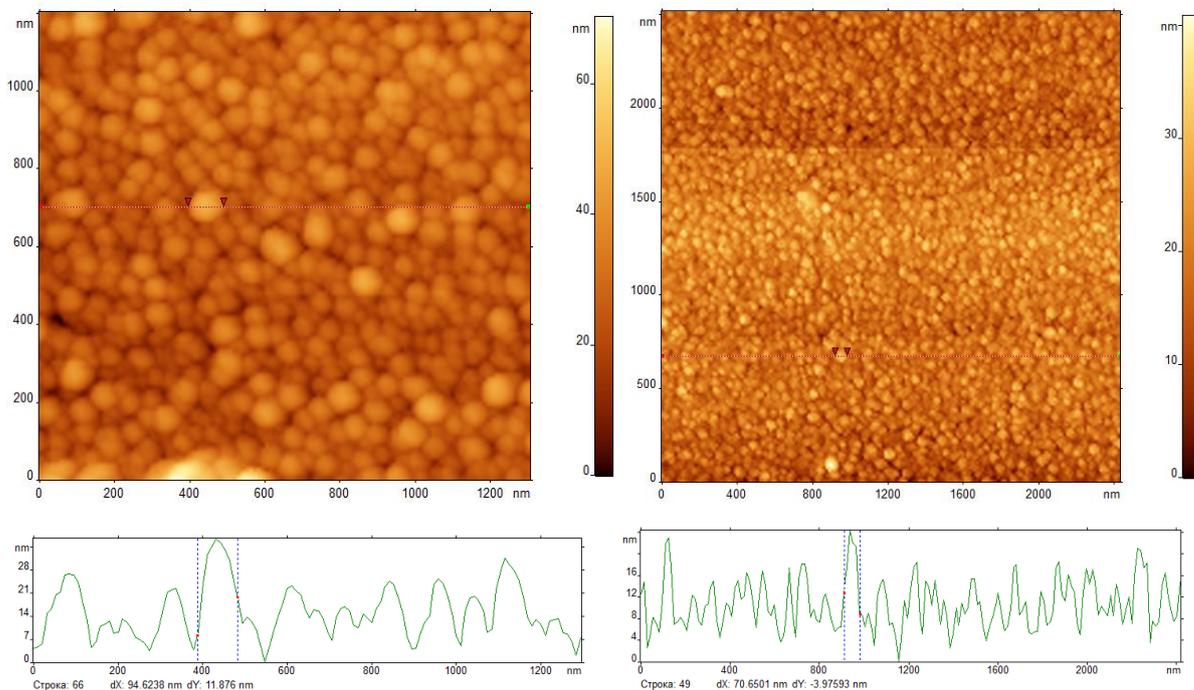


Рисунок 8. Вверху слева – опытная зона, вирусные частицы гриппа А равномерно распределились по поверхности сенсора. Вверху справа - контрольная зона (чистая подложка), зафиксировано равномерное распределение частиц серебра. Внизу представлено сечение вдоль выбранных линий.

Отдельный раздел главы посвящен исследованиям морфологических и структурных особенностей бактериальных клеток под воздействием биоцидных препаратов. В частности, рассмотрено влияние ОГМГ в различных концентрациях на бактериальные клетки: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria flavescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

Проведена оценка влияния дезинфектанта олигогексаметиленгуанидина (ОГМГ) на морфологические характеристики единичных клеток и формирование биопленки на поверхности подложки. ОГМГ – полимерный биоцид широкого спектра действия, подавляющий развитие бактерий и грибов, а также препятствующего образованию биопленок [2]. Исследованы подложки с различной концентрацией препарата, воздействующего на бактериальные и грибковые культуры.

По результатам измерений показано, что некоторые культуры подвержены структурным изменениям, а другие, не получая морфологических повреждений, меняют характер агрегации на подложке (Рисунок 9).

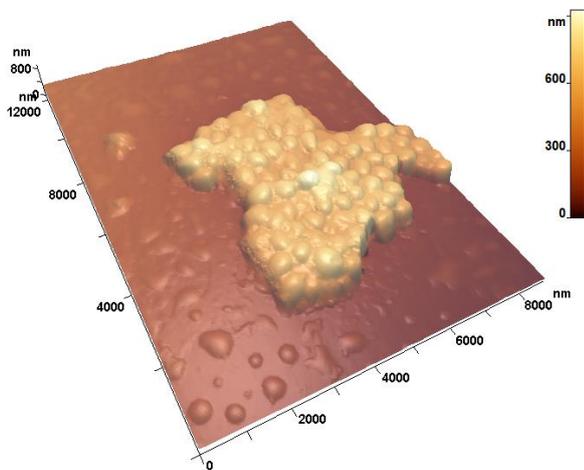


Рисунок 9. Образец *Staphylococcus aureus* под воздействием ОГМГ образует в основном большие плотные агрегации [3].

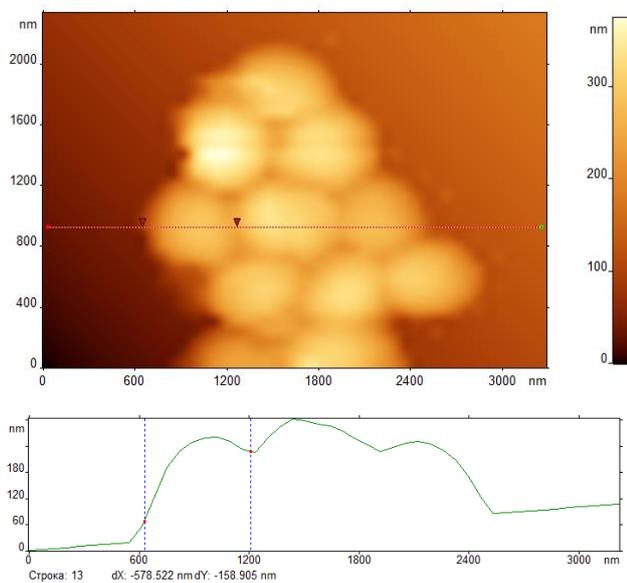


Рисунок 10. Образец *Staphylococcus epidermidis* 40. После воздействия ОГМГ образцы бактерий гладкие без видимых нарушений оболочек. Преимущественно встречаются плотными колониями. Длина частицы ~ 580 нм по данным сечения.

В последнем разделе главы приведены данные по использованию пьезокерамических биочипов в качестве биосенсоров. Для проверки активности антител к микроальбумину использовались мышинные моноклональные антитела к альбумину

человека. При проверке использовались конъюгаты антител и мышинные моноклональные антитела на альбумин, в данном случае антитела связываются через Fc фрагмент (рецептор). По результатам проведенного эксперимента методом ИФА выявлено, что наилучшее связывание осуществлялось антителами Н-С15 с конъюгатом антител козы против антител мыши.

С помощью биосенсора проводилось измерение связывания антител Н-С15 с конъюгатом антител козы против антител мыши [4]. Пьезокерамические диски с иммобилизованными антителами Н-С15 (в концентрации антител 50 мкг/мл) помещались в проточную систему. Сначала были измерены шумы в PBST буфере – измерялась зависимость амплитуды колебаний биочипа от частоты в области резонансного пика. Резонансный пик измерялся 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 [5]:

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

где A_i – напряжение на частоте f_i .

Ниже представлен график зависимости значений резонансной частоты от времени [6]. В контрольном измерении отклика биосенсора в буфере PBST за 1000 сек среднее значение резонансной частоты сместилось на 0,3 кГц (*Рисунок 11*). Точки на графике являются значениями частоты резонанса, а линией обозначено усредненное по 5 точкам значение.

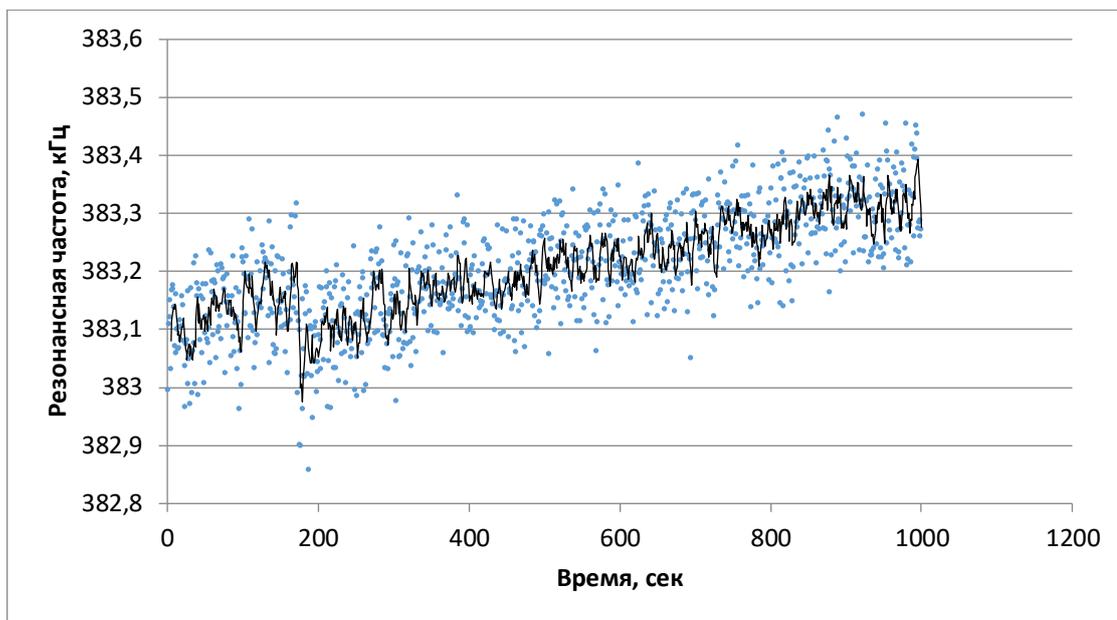


Рисунок 11. Контрольное измерение колебаний биочипа в буфере, сдвиг резонансной частоты составил 0,3 кГц.

По итогам проведенного теста ИФА на активность антител для дальнейших экспериментов использовался конъюгат антител козы против антител мыши (Иммунотех) и мышинные моноклональные антитела НС15 (Биалекса). Биочип поместили в ячейку на 50 сек. 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 12*).

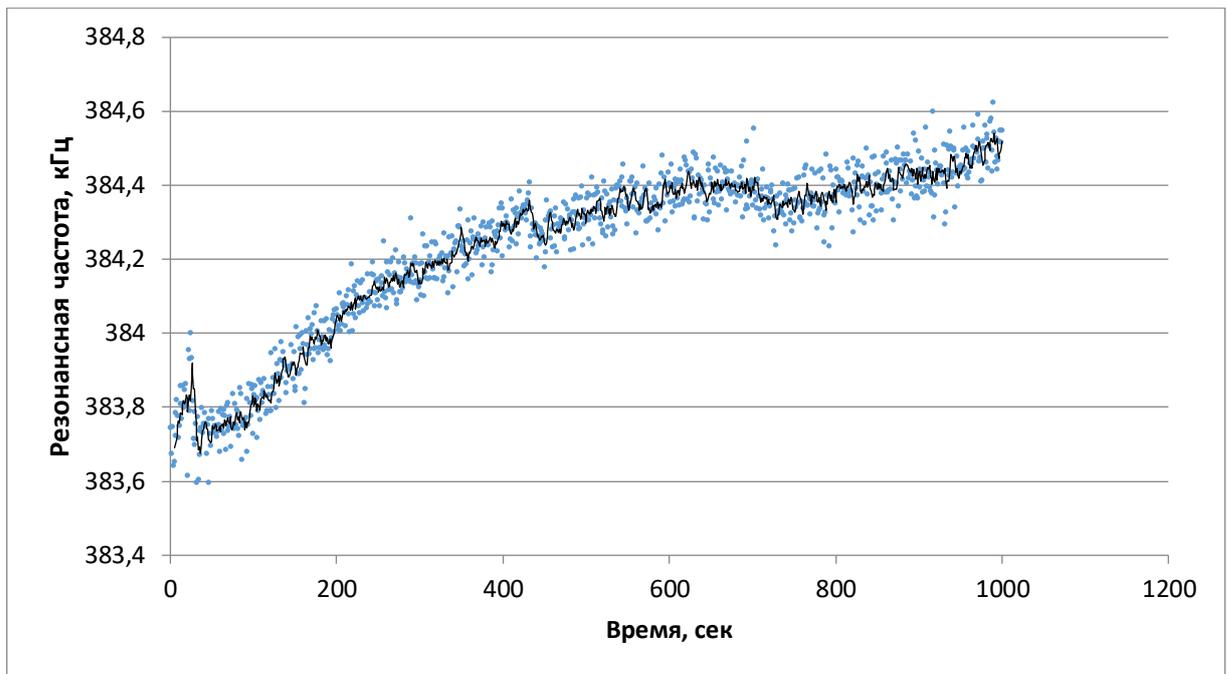


Рисунок 12. Кривая сорбции. Пьезокерамический диск (подложка золото+аминотиофенол+антитела Н-С15 к альбумину) помещен в проточную ячейку, в момент времени 50 сек. в объем буфера PBST 0,75 мл добавлено 0,25 мл конъюгата с буфером с соотношением 1:1000000. За 1000 сек. сдвиг по частоте составил 0,8 кГц

После проведенных измерений через 30 минут снова были измерены шумы системы (Рисунок 13). Шум в системе появляется из-за теплового дрейфа.

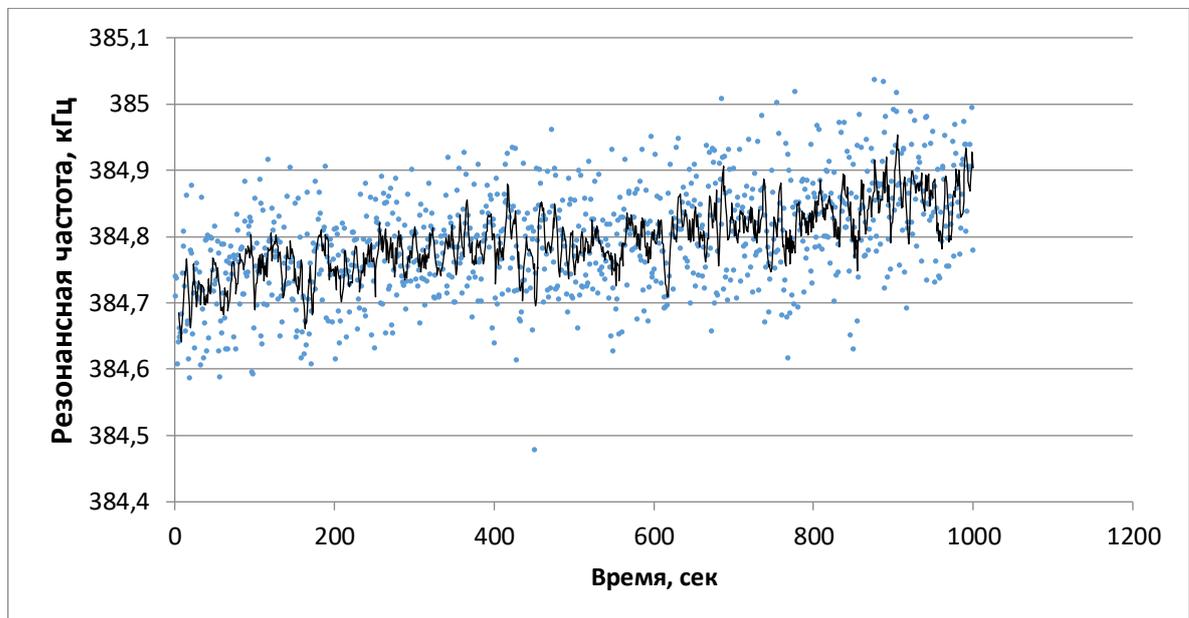


Рисунок 13. Измерение шумов в системе через 30 мин после эксперимента. Сдвиг резонансной частоты составил 0,3 кГц.

Также были проведены измерения изменений резонансной частоты для биочипов с концентрацией иммобилизованных антител Н-С15 на поверхности пьезокерамического диска 5 мкг/мл. При этом концентрация вводимых антител не изменялась. Сдвиг резонансной частоты составил 0,6 кГц. Таким образом, при концентрации иммобилизованных антител на сенсорном слое 5 мкг/мл удалось зафиксировать биоспецифическое связывание на поверхности биочипа.

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 меньшее значение, сопоставимое с шумом измерительной системы. Очевидно, что концентрация антител 5 мкг на мл недостаточная. Для увеличения чувствительности необходимая концентрация иммобилизованных антител составляет 50 мкг на 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 ИФА.

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.

Список литературы

1. Chen Y., Qian C., Liu C., et al. Nucleic acid amplification free biosensors for pathogen detection. Biosens. Bioelectron. 2020, 153, 112049, 1-17.
2. Vointseva I.I., Gembitskiy P.A. Polyguanidines - disinfectants and multifunctional additives in composite materials. Moscow, LKM-press, 2009, 303.
3. Яминский И., Ахметова А. Бактерии и вирусы в объективе зондовой микроскопии. Медицина и высокие технологии, 2021, 3, 72-74.

4. Яминский И. В., Ахметова А. И., Мешков Г. Б. Физические методы обнаружения вирусов и бактерий с использованием инструментов сканирующей зондовой микроскопии. Наноиндустрия. 2017. Т. 3, № 73. 56–59.
5. Яминский И., Ахметова А., Назаров И. Детектирование вируса гриппа А с применением пьезокерамических кантилеверов. Медицина и высокие технологии, 2017, №1. 5–9.
6. 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., Lukuanchuk 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.