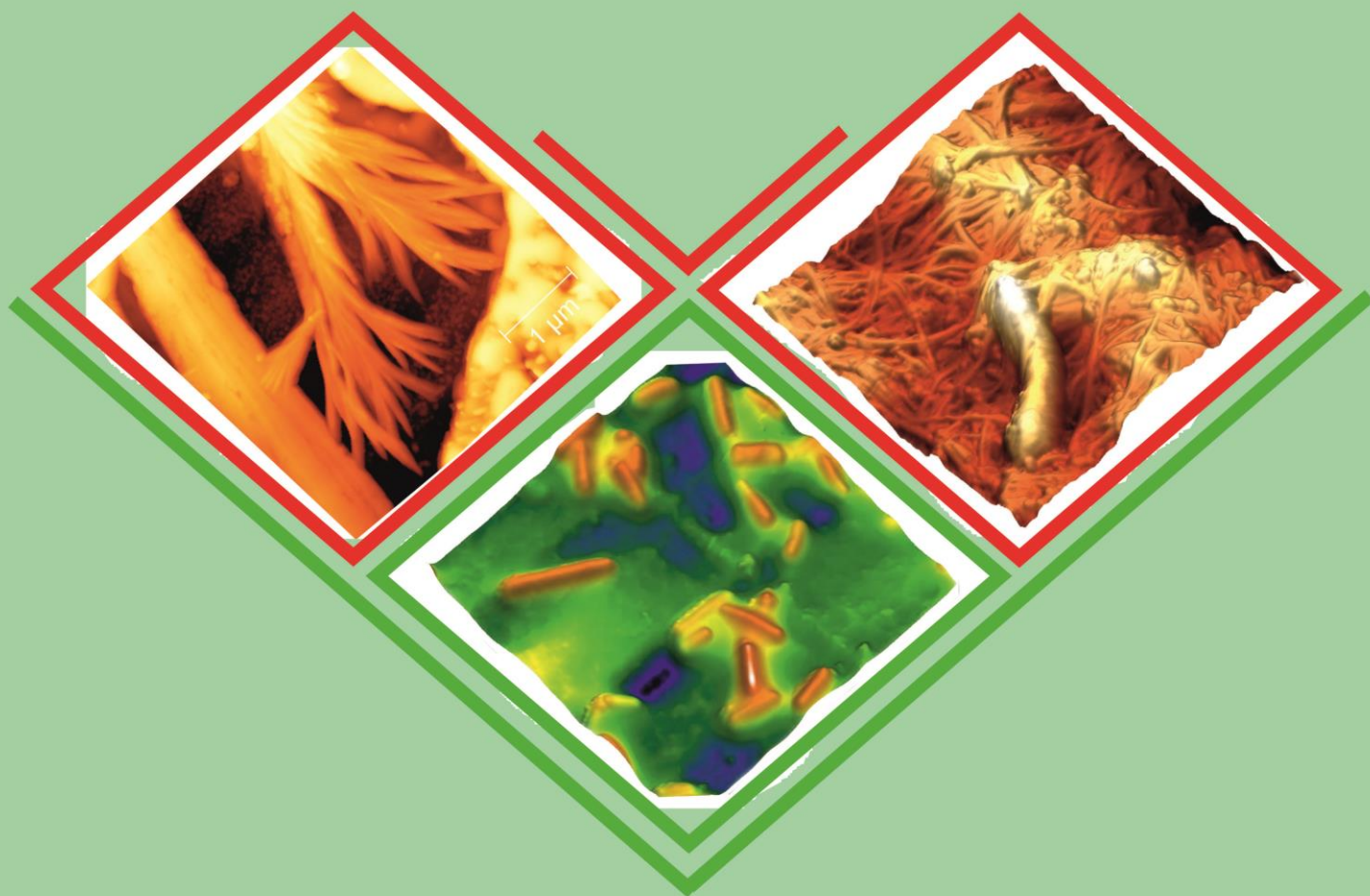




**В. В. Даньшина, Е. А. Рогачев**

# **ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ МЕТОДОМ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ В НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ**



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

---

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Омский государственный технический университет»

**В. В. Даньшина, Е. А. Рогачев**

**ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ  
МЕТОДОМ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ  
В НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ**

Учебное пособие

Омск  
Издательство ОмГТУ  
2019

УДК 606-022.532:53.086(075)

ББК 30.6я73

Д19

Рецензенты:

*А. А. Кузнецов*, д.т.н., профессор ОмГУПС;

*Н. А. Погорелова*, к.б.н., доцент ОмГАУ им. П. А. Столыпина

**Даньшина, В. В.**

Д19

Исследование материалов методом зондовой микроскопии в нанобиотехнологии : учеб. пособие / В. В. Даньшина, Е. А. Рогачев ; Минобрнауки России, ОмГТУ. – Омск : Изд-во ОмГТУ, 2019. – 104 с. : ил.

ISBN 978-5-8149-2943-3

В учебном пособии изложены основы и особенности применения зондовой микроскопии для исследований биологических объектов. Приведены сведения о живых объектах исследования, направления применения нанобиотехнологии и наномедицины.

Разработано в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования и предназначено для обучающихся по направлениям 28.03.02 «Наноинженерия», 22.03.01 «Материаловедение и технологии материалов», 19.03.01 «Биотехнология».

УДК 606-022.532:53.086(075)

ББК 30.6я73

*Печатается по решению редакционно-издательского совета  
Омского государственного технического университета*

ISBN 978-5-8149-2943-3

© ОмГТУ, 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ И НАНОМЕДИЦИНЕ.....	5
1.1. Особенности наноразмерных биологических объектов .....	5
1.2. Направления применения нанобиотехнологии .....	15
1.3. Основные направления развития наномедицины .....	39
2. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ В НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ.....	54
2.1. Общие принципы работы сканирующего зондового микроскопа .....	54
2.2. Режимы (моды) сканирования объектов .....	62
2.3. Особенности сканирования в жидкости .....	75
ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАДАНИЯ.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	100
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	101

## **ВВЕДЕНИЕ**

Исследование биологических объектов является актуальной задачей биологии, медицины, ветеринарии и других наук. Использование традиционных методов исследования, таких как оптическая микроскопия, химический анализ, приводит либо к неудовлетворительным результатам вследствие ограниченности методов, либо к разрушению образцов. Характерные размеры объектов исследования: клеток, вирусов, элементов биологической ткани – составляют порой несколько нанометров. Таким образом, для их исследования необходимо применять методы нанотехнологий.

Одним из перспективных методов исследования является метод сканирующей зондовой микроскопии. Относительно молодой метод (первый микроскоп, работающий в режиме туннельной микроскопии, был показан в 1983 г.), в силу своих конструктивных особенностей позволяет не только получать информацию о топографии поверхности, но и исследовать ряд физических свойств материалов, таких как распределение электрического потенциала, локальную проводимость материала, адгезионные свойства поверхности и др.

В учебном пособии рассмотрены теоретические основы сканирующей зондовой микроскопии – аналитического метода исследования физико-химических свойств наноразмерных биологических объектов. Показаны направления применения нанотехнологий.

Представлены различные по уровню сложности и способам выполнения задания, способствующие прочному усвоению теоретического материала.

Учебное пособие ориентировано на обеспечение качественного освоения практических навыков проведения теоретических и экспериментальных исследований биологических объектов на наномасштабе.

# 1. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ И НАНОМЕДИЦИНЕ

## 1.1. ОСОБЕННОСТИ НАНОРАЗМЕРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Важной составляющей приоритетных исследований в области нанотехнологий является развитие биомедицинского направления.

Разработанные наноустройства и наноструктуры стали широко применяться для всестороннего контроля, восстановления, защиты и совершенствования всех биосистем человека. Это направление деятельности получило название биомедицинские нанотехнологии (рис. 1).

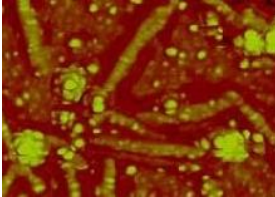
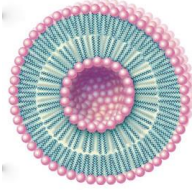

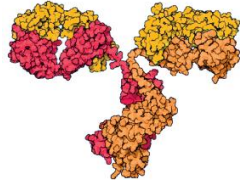

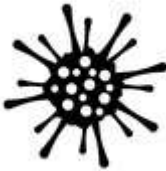

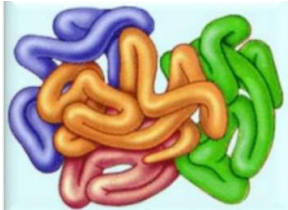

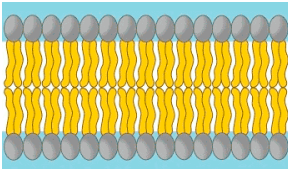



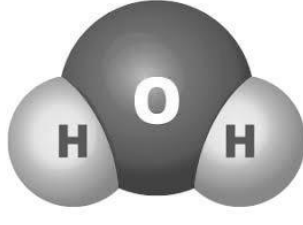
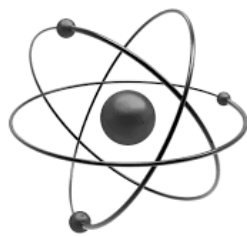
Рис. 1. Взаимосвязь биологии, медицины и нанотехнологий

Нанобиотехнология – это область науки на стыке биологии и нанотехнологии. Она включает в себя исследования и применение наноразмерных биологических объектов в промышленных масштабах для создания биотехнологических продуктов.

Наноразмерные биологические объекты человек использовал с древних времён (дрожжи, ферменты, наночастицы золота для окрашивания стёкол и др.), более того всё живое построено из наночастиц и наноструктур (табл. 1). Большинство биохимических процессов в живых организмах протекает на наноуровне. Приставка «нано-» только подчеркивает, что исследования осуществляются на молекулярном уровне, а не на клеточном.

## Искусственные и природные нанобъекты и наноструктуры

Искусственные нанобъекты и наноструктуры	Размер	Природные нанобъекты и наноструктуры	
Аналог отсутствует	1 мкм	Микроструктуры (митохондрии, вакуоль). Бактерии 3 мкм	
Аналог отсутствует	800 нм	Субмикроструктуры (хромосомы, рибосомы)	
Нанокompозит 	400 нм	Липосома 	Наноструктуры
Квантовая точка 	100 нм	Антитело 	
Нанотрубка  ø 1...50 нм		Вирус 	
Молекула фуллерена C <sub>60</sub> 	10 нм	Белок  Молекула ДНК  ø 2 нм Мембрана  2...5 нм	

Искусственные нанообъекты и наноструктуры	Размер	Природные нанообъекты и наноструктуры
Малоатомный кластер 	1 нм	Молекула воды 
Аналог отсутствует	0,1 нм	Атом 

Прежде чем исследовать живые объекты, необходимо изучить их особенности.

Неживую природу изучает физика и химия, живую природу – биология. В современном представлении биология – совокупность наук о живой природе. Биология устанавливает общие и частные закономерности, присущие жизни во всех ее проявлениях – обмен веществ, размножение, наследственность, приспособляемость, рост, подвижность и др.

Биология развивается в трех основных направлениях: традиционная биология, физико-химическая, эволюционная.

Традиционная биология изучает живую природу в ее естественном состоянии. Основной метод – наблюдение. Главная задача – классификация объектов живой природы. Например, К. Линней описал и классифицировал 1500 растений. Это направление не утратило и вряд ли утратит свою актуальность. Биология развивается: одни виды исчезают, другие изменяются, – и в будущем научные материалы будут накапливаться в результате непосредственного наблюдения за живой материей.



Физико-химическая биология изучает объекты живой природы с помощью физико-химических методов на молекулярном уровне. Её основоположниками являются российские биологи И. П. Павлов, И. И. Мечников, И. М. Сеченов. Она использует современные методы анализа и диагностики: метод рентгеноструктурного анализа, метод меченых атомов, спектральные методы (инфракрасная спектроскопия, УФ-спектроскопия, интерферометрия) и др. С её помощью расшифрована структура ДНК, расшифрован генетический код, осуществлен искусственный синтез гена одной из транспортных молекул, химический синтез ряда ферментов и т. д.

Эволюционная биология изучает развитие живой природы во времени. Чарльз Дарвин установил движущие силы эволюции, объяснил процесс развития. В XX в. теория Дарвина была расширена и получила название неodarвинизма. Это теория органической эволюции путем естественного отбора признаков, детерминированных генетически.

В XX в. биология стала лидером естествознания. Можно предположить, что XXI в. можно будет назвать веком биологии.

## **Структурные уровни организации живой материи.**

### **Основные отличия живого от неживого**

Биология как наука стала развиваться с XIX в. и продолжает развиваться до сих пор. Биологический уровень организации материи очень сложен. Он полностью не сводится к закономерностям физики и химии и имеет свои отличительные особенности. Биологический уровень предопределен отличием живого вещества от неживого.

Обобщенное определение сущности живого можно сформулировать следующим образом: жизнь есть форма существования сложных, открытых систем, способных к самоорганизации и самовоспроизведению. Еще более краткое определение жизни предложил американский физик Ф. Типлер в своей сенсационной книге «Физика бессмертия». «Мы не хотим, – пишет

он, — привязывать определение жизни к молекуле нуклеиновой кислоты, потому что можно вообразить себе существование жизни, которая к этому определению не подходит. Если к нам в космический корабль явится внеземное существо, химическую основу которого составляют не нуклеиновая кислота, то нам все равно захочется признать его живым». Жизнь, по мнению Типлера, представляет собой лишь информацию особого рода: «Я определяю жизнь как некую закодированную информацию, которая сохраняется естественным отбором». Но если это так, то жизнь — информация, которая будет вечной, бесконечной и бессмертной. И хотя с этим определением согласны далеко не все, его несомненная ценность состоит в попытке выделить из всех критериев жизни в качестве главного — способность живых организмов сохранять и передавать информацию.

Итак, что такое живое и чем оно отличается от неживого? Есть несколько фундаментальных отличий живого от неживого.

**По составу.** В состав живого обязательно входят высокоупорядоченные макромолекулярные органические соединения. Их называют биополимеры — белки и нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК). Они реакционно-способны, состоят преимущественно из пяти легких химических элементов (С, N, O, P, H). Молекулы неживого в большей массе своей инертны. Для неживого характерен весь спектр химических элементов.

**По структуре** живое отличается от неживого клеточным строением. Структурной единицей неживого является молекула, структурной единицей живого — клетка. Нет живых биомолекул, есть живая клетка. Все основные процессы, определяющие поведение живого организма, протекают в клетках. Величина клеток различна: от микрометра до более одного метра (у нервных клеток, имеющих отростки).

**По функциям.** Для живых тел характерно воспроизводство самих себя. Устойчивость и воспроизведение есть и в неживых системах. Но в живых телах имеет место процесс самовоспроизведения согласно заложен-

ной в них генетической программе. Не что-то воспроизводит их, а они сами себя. Это принципиальное отличие. Также живые тела отличаются от неживых другими атрибутами: наличием обмена веществ, способностью к росту и развитию, приспособленностью к среде и т. д. Обязательным свойством живого является деятельность, активность.

Однако строго научное разграничение живого и неживого невозможно. Имеются как бы переходные формы от неживого к живому. Вирусы не обладают ни одним из атрибутов живого. У них есть наследственный аппарат, но отсутствуют ферменты, необходимые для обмена веществ. Поэтому они могут расти и размножаться, лишь проникая в клетки организма-хозяина и используя его ферментные системы.

В зависимости от того, какой признак мы считаем важным, мы относим вирусы к живым системам или нет.

Системно-структурные уровни организации многообразных форм живого достаточно многочисленны. Критерием выделения основных уровней выступают специфические дискретные структуры и фундаментальные биологические взаимодействия. На основании таких критериев выделяют следующие уровни организации живого:

- 1) **молекулярно-генетический** – элементарной единицей является ген;
- 2) **онтогенетический** – связан с жизнедеятельностью отдельных биологических особей (организмов);
- 3) **популяционно-видовой** – появляется тогда, когда происходит объединение особей в популяции, а популяций в виды;
- 4) **биогеоценотический** – единицами являются биоценозы и биогеоценозы.

### **Единство и многообразие живых организмов на Земле**

Еще на заре развития человеческой культуры людей поражали целесообразность строения отдельных живых существ и тот порядок, который существует в живой природе в целом. В древнейших индийских, египет-

ских, китайских источниках можно встретить сочинения о взаимосвязи между растениями и животными, о единстве органического мира и его закономерном взаимодействии с природой.

### *Единство органического мира*

1. Структурное единство. Основная структурная единица всех организмов – клетка.

2. Биохимическое единство:

– общий химический состав – белки, жиры, углеводы, ферменты, гормоны и т. д. Например, сходство химического состава хлорофилла с гемоглобином (кровяные пигменты);

– близкие типы реакций, лежащие в основе биохимических процессов;

– общая роль белков и нуклеиновых кислот.

3. Общие законы, по которым живут и развиваются все виды животных и растений (закон естественного отбора, закон исторического развития организмов и т. д.).

Единство выражается во взаимосвязях и взаимодействии качественно развивающихся видов животных, растений и микроорганизмов. Эти взаимоотношения служат основой возникновения и развития сообществ, состоящих из разных видов.

### *Многообразие органического мира*

На Земле существуют огромное количество живых существ. Всё многообразие живых существ на Земле подчинено строгой иерархии: гены (вирусы, бактериофаги как формы преджизни) – клетки – ткани – органы – организмы – популяции – сообщества – экосистема (биоценоз) – биосфера.

Элементарной единицей в систематике живых организмов является вид. Существует до десяти миллионов видов живых существ. **Вид** – это генетически стабильная система, группа организмов, которые скрещива-

ются друг с другом с образованием плодового потомства и занимают определенную область географического пространства. Известно 500 000 видов растений и 1 500 000 видов животных. Многообразие не ограничивается числом различных видов. Виды, в свою очередь, состоят из молодых и взрослых индивидуумов, многие из самцов и самок, у большинства видов есть: разновидности, географические расы, экологические формы. Для них характерно определенное строение и образ жизни. Таким образом, вид не простое собрание одинаковых индивидуумов, а сложная система группировок, соподчиненных, тесно связанных друг с другом и тем самым поддерживающих существование друг друга.

## Классификация живых организмов

### I. Доклеточные формы жизни — вирусы (рис. 2) и фаги (рис. 3).

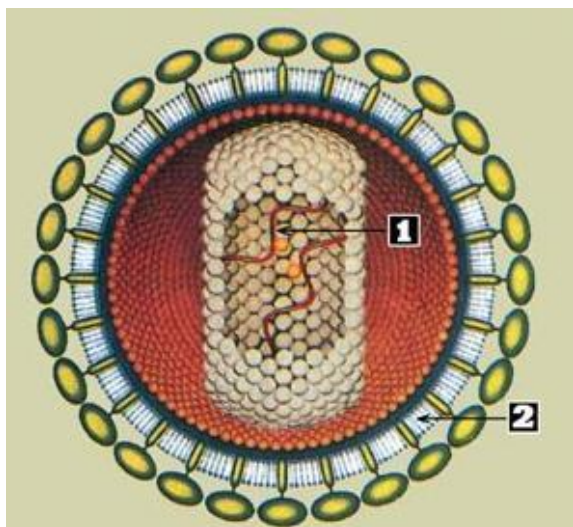


Рис. 2. Строение вируса:  
1 — молекула ДНК или РНК;  
2 — белковая оболочка

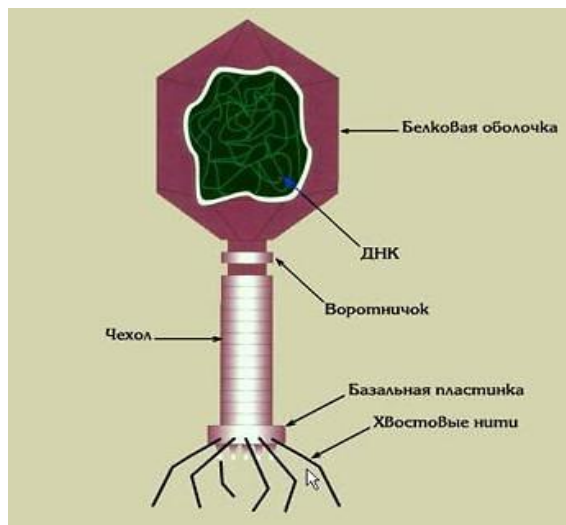


Рис. 3. Бактериофаг

**Вирусы** — субмикроскопические доклеточные формы жизни, способные проникать в живые клетки и воспроизводиться внутри них. Вирусы открыты Д. И. Ивановским в 1892 г. В настоящее время известно около 3000 видов вирусов. Они не способны сами синтезировать белок, поэтому получают необходимые для их жизнедеятельности вещества, проникая

в живую клетку и используя чужие органические вещества и энергию. У человека вирусы вызывают множество заболеваний, включая грипп и СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита, вызывается особым вирусом). Попадая в клетки крови и мозга, он встраивается в генный аппарат и парализует их защитные свойства. Зараженный вирусом СПИДа человек становится беззащитным перед любой инфекцией. До сих пор не разработаны даже теоретические подходы к решению такой задачи, как очистка генетического аппарата клеток человека от чужеродной вирусной информации.

**Бактериофа́ги**, или фа́ги, (от др.-греч. «пожираю») – вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис.

Лизис – растворение клеток и их систем, в том числе микроорганизмов, под влиянием различных агентов, например ферментов, бактериолизин, бактериофагов, антибиотиков.

## II. Клеточные формы жизни.

**1. Доядерные формы (прокариоты)** – просто устроенные одноклеточные организмы без ядра, к ним относятся бактерии (рис. 4) и сине-зеленые водоросли. Все клетки одинаковые.

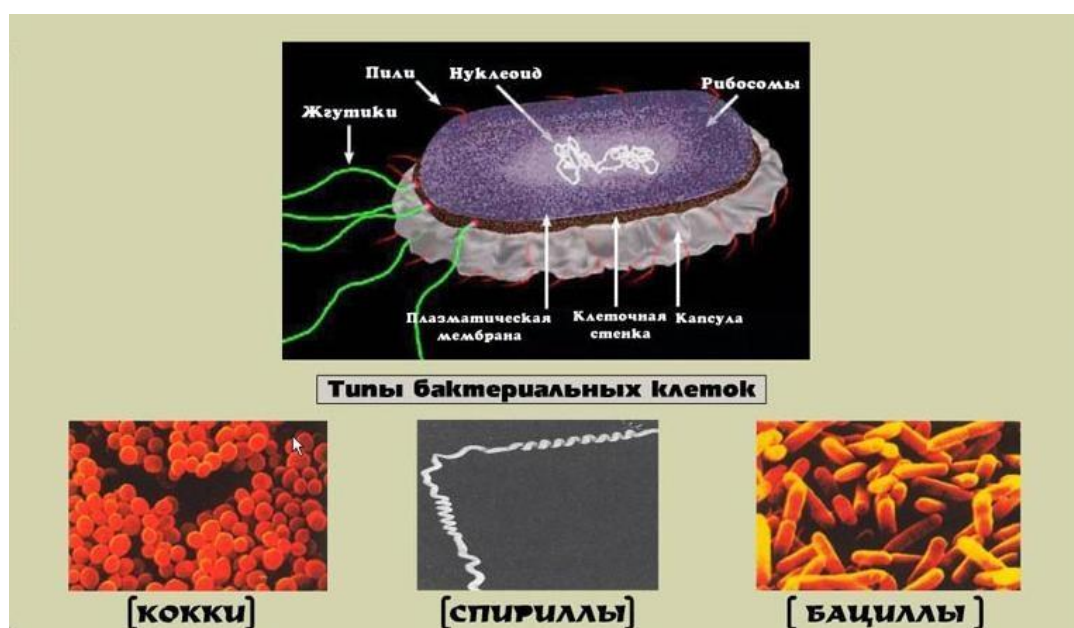


Рис. 4. Бактерии

**2. Ядерные формы (эукариоты)** – сложно устроенные, содержащие клеточное ядро с хромосомами и органоидами (рис. 5). Подразделяются на одноклеточные (амебы, инфузории), колониальные (вольвокс) и многоклеточные. У эукариот носитель наследственной информации – дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), окруженная ядерной оболочкой.

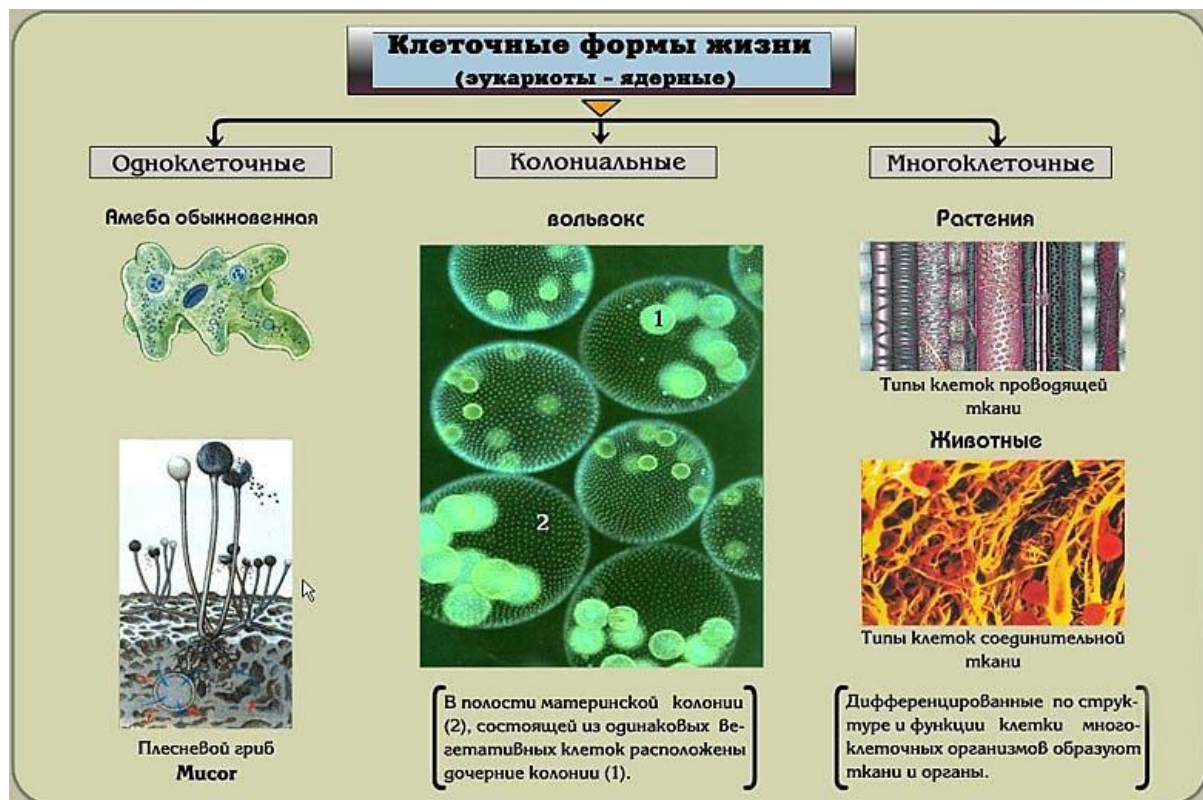


Рис. 5. Эукариоты

Многоклеточные организмы – хорошо организованная совокупность клеток. Основные группы многоклеточных организмов (эукариотов): грибы; слизевики; растения; животные. В эукариотических организмах клетки дифференцированы: различаются по форме и функциям.

Примерно 1 млрд лет назад произошло разделение живых существ (органического мира) на два царства – растения и животные. Они различаются: по структуре клеток, по способу питания, по способности к движению. Отнесение к одному из царств проводится по совокупности различий, а не по каждому признаку. Например, кораллы, моллюски, речная



губка (бодяга) всю жизнь остаются неподвижными, но по всем другим свойствам относятся к животным. Выделяют переходные типы, например насекомоядные растения по способу питания относятся к животным; эвглена зеленая питается как растение, двигается как животное.

Таким образом, многообразие есть форма устойчивости жизни.

## **1.2. НАПРАВЛЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ**

### **1. Охрана окружающей среды.**

#### ***А. Технологии переработки и утилизации отходов.***

*Очистка воздуха.* Для очистки газовых выбросов в атмосферу на промышленных предприятиях применяют биофильтры, заполненные насадкой, на которой закреплены специальные микроорганизмы. Вредные примеси сорбируются на насадке и затем потребляются и обезвреживаются микроорганизмами.

В шахтах и угольных пластах метанотрофные бактерии снижают концентрацию метана, что уменьшает риск взрыва.

*Очистка сточных вод.* Существуют микроорганизмы, для которых загрязнения, содержащиеся в сточных водах, являются питательными веществами. Сточные воды очищает «активный ил» – это биомасса, которая состоит из смеси микроорганизмов (ферментов или бактерий). Они перерабатывают или разлагают загрязнения. Хотя при этом требуется перемешивать жидкость и непрерывно аэрировать её воздухом, такой способ позволяет перерабатывать большие объёмы стоков с самыми разнообразными загрязнениями – от хозяйственно-бытовых до промышленных. После использования ила его необходимо ликвидировать.

Способы ликвидации: захоронение в почве, захоронение в море, сжигание.

**Б. Совершенствование методов тестирования и *мониторинга*, средств детектирования и борьбы** с химическим и биологическим оружием.



Биологическое оружие – это патогенные микроорганизмы или их споры, вирусы, бактериальные токсины, заражающие людей и животных, а также средства их доставки (ракеты, артиллерийские снаряды, миномётные мины, авиационные бомбы, автоматические дрейфующие аэростаты), предназначенные для массового поражения живой силы и населения противника, сельскохозяйственных животных, посевов сельскохозяйственных культур, заражения продовольствия и источников воды, а также порчи некоторых видов военного снаряжения и военных материалов. Является оружием массового поражения и запрещено согласно Женевскому протоколу 1925 г.

Специально отобранные для боевого применения биологические агенты: патогенные микроорганизмы (чумы, сибирской язвы, бруцеллеза и др.); вирусы (натуральной оспы, геморрагических лихорадок и др.); риккетсии (сыпного тифа и др.). Производство их наладить легко, например, на основе фармацевтической промышленности.

Способы применения биологического оружия: с воздухом (распыление), с пищей, водой, через кожу (укусы насекомых).

Мероприятия по защите живых организмов:

1. Мониторинг.

В России создан мониторинговый центр, который занимается сбором и анализом информации о биологических угрозах, опасных вирусах, бактериях и возникающих эпидемиях на территории страны и в сопредельных государствах.

2. Контроль экспорта и импорта.

Разрешение на экспорт (импорт) выдается лишь в том случае, если имеются основания полагать, что экспортируемые материалы не могут быть использованы в производстве химического или биологического оружия.

3. Использование индивидуальных средств защиты.

– защитные перчатки, которые не пропускают токсичные вещества;

– специальные кремы, которые уменьшают токсичность патогенов, попавших на кожу солдата;

– защитный костюм для солдат, в котором используется материал, интегрированный с порошком FAST ACT (First Applied Sorbent Treatment Against Chemical Threats), который обезвреживает токсичные химикаты. Порошок состоит из активных наночастиц, которые связывают и деактивируют около 24 известных токсичных химических соединений, использующихся в химических атаках. Порошок может использоваться при температурах ниже нуля, а также в различных средах. В отличие от кремов он может быть эффективен и в распыленном состоянии (а защитные кремы должны быть влажными), и в растворе;

– фуллерены, которые в соединении с антителами используют для защиты от спор *Bacillus anthracis* – бактерии, наиболее распространенной в качестве военного бактериологического агента. Результаты клинических испытаний препарата антракса показали, что он убивает саму бактерию и ее споры до того, как концентрация патогенов в организме приведет к его смерти. При этом с момента заражения организма антраксом прошло 24 ч;

– чип определения биологической опасности размерами с почтовую марку. Устройство может определить присутствие нескольких видов различного бактериологического оружия. На его базе фирма CombiMatrix выпустила детектор HANAA, который можно использовать в полевых условиях. Прибор помещается в ладони, питается от батареек и весит около одного килограмма. Его принцип действия основан на репликации ДНК образца с помощью полимеразной цепной реакции. Когда же искомой ДНК становится достаточно для определения, прибор ее обрабатывает с помощью флуоресцентных меток и соотносит с одним из запрограммированных типов патогенной ДНК. Весь процесс обработки четырех различных образцов занимает 30 минут. С помощью нанотехнологий была создана кремниевая микрокамера, в которой происходит процесс нагрева-

охлаждения ДНК. Как утверждают разработчики прибора, он может опознать патоген при концентрации 10 бактерий в одной пробе, которая представляет собой капсулу диаметром 5 мм и длиной 2 см.

## **2. Материаловедение.**

### ***А. Выщелачивание руды.***

Микроорганизмы широко применяют для извлечения металлов из отходов горнодобывающей промышленности или побочных руд, которые слишком бедны для того, чтобы их переработка обычными методами была экономически выгодна.

В Красноярском крае, например, работают восемь микробиологических ферментеров, позволяющих добывать золото из пород с низким содержанием этого металла. В США 15 % меди извлекается таким способом.

**Б. Биосинтез** – промышленное получение органических соединений (антибиотиков, гормонов, витаминов, аминокислот и других необходимых людям веществ) с помощью микроорганизмов.

Микроорганизмы интенсивно синтезируют **кормовой белок**. Такой белок отличается от растений высоким содержанием белков (до 60 % сухой массы) и других легкоусваиваемых углеводов, витаминов и микроэлементов.

Промышленное производство можно организовать на ограниченной площади и получать большое количество кормовых концентратов в любое время года, причем микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельского хозяйства и промышленности.

Микроорганизмы способны очень быстро наращивать белковую массу. Например, растения сои массой 500 кг в фазе созревания семян способны в сутки синтезировать 40 кг белков, бык такой же массы – 0,5–1,5 кг, а дрожжевые клетки массой 500 кг – до 1,5 т белков.

В качестве источников кормового белка наиболее часто используются различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, белковые коагуляты травянистых растений.

### **3. Сельское хозяйство.**

#### **А. Удобрения.**

*Биологический азот.* Микроорганизмы широко применяются для получения биологических удобрений. Азотофиксирующие бактерии на корнях растений семейства бобовых вырабатывают биологический азот.

Основной источник азота в почве – биологическая азотификсация, т. е. связывание атмосферного азота и перевод его микроорганизмами в усвояемые растениями формы. Микроорганизмы могут жить в почве сами по себе, а могут находиться в симбиозе («содружестве») с некоторыми растениями, в основном с бобовыми – клевером, горохом, фасолью, люцерной и др. Бактерии «поселяются» на корнях этих растений – в особых клубеньках; часто их так и называют – клубеньковые бактерии. В этих микроорганизмах содержится сложный фермент нитрогеназа, способный восстановить азот до аммиака. Затем с помощью других ферментных систем аммиак превращается в другие соединения азота, которые усваиваются растениями. Свободно живущие бактерии связывают до 50 кг азота в год в расчете на 1 га, а клубеньковые – еще 150 кг, а в особо благоприятных условиях – до 500 кг!

Использование биологических удобрений вместо минеральных позволит не только повысить урожайность большинства сельскохозяйственных культур на 15–35 % (что подтверждено практикой) и сделать их стабильными, но и в достатке насыщать истощённую почву как азотными, так и фосфорными, калийными удобрениями, не неся при этом больших финансовых затрат. Кроме того, продукция, выращенная при использовании бактериальных удобрений, обладает высоким экологическим качеством, обогащается витаминами, микроэлементами, содержит больше белка, в 2–2,5 раза снижает содержание нитратов. Они нетоксичны, безопасны для человека, животных, птиц, насекомых, рыб.

*Органические удобрения.* Состоят из веществ животного и растительного происхождения, которые, разлагаясь, образуют минеральные вещества. Биоразложение – химическое изменение и разрушение субстанции на простейшие вещества с помощью микроорганизмов.

В процессе аэробной биологической ферментации органических компонентов, служащих одновременно и разрыхлителем, участвует микробно-бактериальный конгломерат: мезофильные, метанотрофные, кислотообразующие, термофильные и другие бактерии. При саморазогревании субстрата происходит смена микрофлоры от мезофильных до термофильных образований. В биохимическом процессе биоферментации под воздействием микробиологического сообщества происходит переход трудноусваиваемых форм питательных веществ растений из органических отходов в легкоусваиваемые формы конечного органического комплексного удобрения. Так как органические удобрения являются естественным элементом природной цепочки, то они не содержат никакого вреда для почвы, чего нельзя сказать о химически изготовленных минеральных подкормках.

Нанотехнологии вносят большой вклад в повышение урожайности сельскохозяйственных культур и продуктивности животных.

Например, нанокапсулы с микроэлементами, добавленные в удобрения, повышают их эффективность. Нанодобавки улучшают корма в животноводстве.

Применение нанопрепаратов стероидного ряда, совмещенных с бактериородопсином, показало существенное (в среднем 1,5–2 раза) увеличение урожайности практически всех продовольственных (картофель, зерновые, овощные, плодово-ягодные) и технических (хлопок, лен) культур, повышение их устойчивости к неблагоприятным погодным условиям. Например, в опытах на различных видах животных показано резкое по-

вышение их сопротивляемости стрессам и инфекциям (падеж снижается в 2 раза относительно контрольных групп животных) и повышение продуктивности по всем показателям в 1,5–3 раза.

### ***Б. Селекция растений и животных.***

Для получения наиболее продуктивных форм микроорганизмов (штаммов) широко применяются методы селекции. Путем отбора выделяются расы микроорганизмов, наиболее активно синтезирующие тот или иной используемый человеком продукт. Микроорганизмам свойственна наследственная изменчивость (мутации). Путем отбора мутаций и создаются наиболее активные расы и штаммы.

Для получения высокопродуктивных штаммов микроорганизмов в последнее время особенно широко используется метод экспериментального получения мутаций путем действия лучей рентгена и некоторых химических соединений. Таким способом удается повысить наследственную изменчивость микроорганизмов в десятки и сотни раз, благодаря чему облегчается и ускоряется процесс отбора высокопродуктивных штаммов. Особенно больших успехов достигла фармацевтическая промышленность, в частности производство антибиотиков. Отечественные ученые (С. И. Алиханян и др.) получили многочисленные рентгеномутации, которые дают в десятки раз более высокий выход антибиотиков, чем исходные культуры микроорганизмов.

Селекция находит широкое применение и в отношении микроорганизмов, используемых в промышленности. Например, дрожжевые грибки, вызывающие брожение в тесте, также обладают разными свойствами. На основе селекции выделяются наиболее продуктивные штаммы, способствующие повышению качества хлеба.

Наконец, нужно иметь в виду, что мутации происходят и у болезнетворных микроорганизмов, вызывающих заболевания человека. Иногда

они приводят к повышению вредоносного действия (вирулентности) микроба, что может иметь тяжелые последствия для человека.

Методы селекции:

1. Искусственный метагенез.

С помощью рентгеновских лучей, ультрафиолета, химических соединений и других мутагенных факторов повышается в сотни раз мутационный процесс с целью получения нужных мутаций.

2. Искусственный отбор.

Осуществляется отбор рас микроорганизмов, наиболее активно синтезирующих необходимые человеку соединения.

3. Генетическая инженерия.

**Генетическая инженерия** – целенаправленное изменение и конструирование наследственного материала (ДНК) живых организмов.

Молекулы ДНК, создаваемые методами генетической инженерии, называют **рекомбинантными**.

После того как в начале 70-х гг. XX в. был разработан метод получения рекомбинантных ДНК, чужеродные гены стали вводить в клетки бактерий, растений и животных. Такие организмы получили название **трансгенных**.

Основные этапы генной инженерии:

1) необходимый ген выделяют из естественных источников или синтезируют химическим путем;

2) подбирают вектор (молекулу ДНК, переносящую необходимый ген в клетку);

3) вектор и переносимый ген объединяют (рис. 6) в единую структуру (рекомбинантную молекулу ДНК);

4) единую структуру, содержащую вектор и ген, вводят в клетку организма-хозяина или в его яйцеклетку.

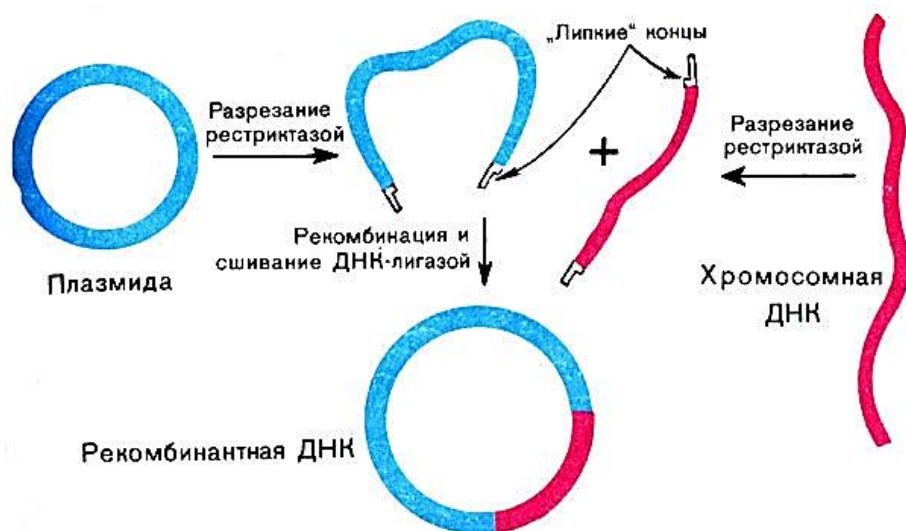


Рис. 6. Создание рекомбинантной (гибридной) ДНК

### *Способы введения ДНК в клетку организма-хозяина*

1. Микроинъекция.
2. Упаковка в липосомы. Полость липосом заполняют векторами. Липосомы проникают в бислой липидов клеточной мембраны, растворяются в нем, а их содержимое (векторы) оказывается в цитоплазме клетки.
3. Трансфекция. Векторы обрабатывают ионами кальция. Образующиеся наноконплексы ионов и векторы окружаются отделяющимися от клеточной мембраны фрагментами. Упакованные в мембраны наноконплексы вектора и ионов кальция проникают в виде микропузырьков в цитоплазму клетки. Метод применяют для внедрения векторов в эукариотические клетки.
4. Электропорация. При воздействии на клетки импульсами высокого напряжения (200–350 В, длительность 54 мс) можно увеличить проницаемость клеточных мембран. Через образующиеся на короткое время в мембране микропоры векторы проникают из окружающей среды (раствора) в цитоплазму клетки.
5. Бомбардирование микрочастицами. Это один из самых эффективных методов в генной инженерии растений. Для внедрения используют незрелые зародыши семян. Их подвергают бомбардированию частицами



золота или вольфрама (диаметр около 600 нм), на которые нанесено покрытие из векторов. Этими частицами заряжают «генные пушки», после выстрелов из которых частицы проникают в растительные клетки.

В технологии рекомбинантных ДНК предусмотрено использование следующих методов:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов на очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью и основанная на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;
- клонирование ДНК: воспроизводство живого (амплификация *in vitro*) с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;
- введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

Технология рекомбинантных ДНК сделала возможным использование нетрадиционного подхода «белок – ген», получившего название **«обратная генетика»**.

При таком подходе из клетки выделяют белок, клонируют ген этого белка, модифицируют его, создавая мутантный ген, кодирующий измененную форму белка. Полученный ген вводят в клетку.

Если он экспрессируется, несущая его клетка и ее потомки будут синтезировать измененный белок. Таким образом, можно исправлять дефектные гены и лечить наследственные заболевания.

Методы генной инженерии позволяют провести генетическую паспортизацию, диагностировать генетические заболевания, создавать ДНК-вакцины, проводить генотерапию различных заболеваний.

Неблагоприятная экологическая обстановка и целый ряд других подобных причин приводят к тому, что все больше детей рождается с серьезными наследственными дефектами. В настоящее время известно 4000 наследственных заболеваний, для большинства из которых не найдено эффективных способов лечения.

Генные инженеры уже внесли свой вклад в решение этой проблемы, разработав диагностические препараты, позволяющие обнаруживать генетические аномалии в период беременности, что дает возможность предотвратить рождение больного ребенка. Однако более 1 % всех новорожденных имеют генетические заболевания, которые приводят к физическим и умственным нарушениям, а также к ранней смерти.

Буквально с момента создания генной инженерии ученые задались целью разработать методы исправления генетических повреждений путем введения в организм «здоровых» генов. В 1989 г. в Национальных Институтах Здоровья США впервые была предпринята попытка применить в клинической практике генотерапию для лечения опасного заболевания «тяжелый комбинированный иммунодефицит» (ТКИД). В настоящее время генотерапия ТКИД проходит завершающую стадию клинических испытаний.

Наиболее обнадеживающие результаты ожидают в тех случаях, когда заболевание обусловлено дефектом одного гена. В этом случае полагают, что необходимо вводить нормальный ген в соматические клетки прицельно в то место на хромосоме, где находится дефектный ген. При гомологичной рекомбинации введенный ген заместит дефектный. Такой однократной процедуры в ряде случаев будет достаточно, чтобы излечить болезнь. Однако на практике очень трудно проконтролировать судьбу

введенной в клетки ДНК, и на одно правильное встраивание в геном приходится более 1000 случайных. Разрабатывается и другой подход, когда введенный ген не заменяет дефектный, а компенсирует его функцию, встраиваясь в хромосому в другом месте.

Примерами применения генной инженерии являются: получение генетически модифицированных сортов культурных растений, обладающих новыми полезными свойствами; создание бактерий и грибов, продуцирующих гормоны, антибиотики, витамины, ферменты и другие вещества для нужд фармацевтической и пищевой промышленности; создание трансгенных животных в качестве живых фабрик для производства биомедицинских препаратов, а также новых пород экспериментальных мышей (нокауты) для научных исследований функционирования определенных генов.

Многие наследственные заболевания связаны с появлением в ДНК хромосомы измененного («ненормального») гена. Функционирование такого гена приносит организму только вред. Для таких случаев учеными разработан оригинальный способ лечения, получивший название **генного таргетинга** или генного «нокаута». Он заключается в полном подавлении (выключении) функции определенного гена. Для этой цели используется уникальная нанобиотехнология, обеспечивающая замену нормального гена в зародышевой клетке на «сломанную» копию. В «сломанную» копию гена исследователи включают специальную вставку из нуклеотидов. Только такой вставкой и отличается «сломанная» копия от нормального гена. Вставка сдвигает рамку считывания наследственной информации, которую содержит «сломанная» копия. Из-за этого белок, который кодируется этим геном, не синтезируется (т. е. ген не функционирует), а заболевание, следовательно, не проявляется. В настоящее время уже сотни болезней человека поддаются излечению с помощью генной терапии и генного таргетинга.

В области нанобиотехнологий создание генно-инженерных химерных белков, ионных каналов и биологических моторов с принципиально новыми свойствами ложится в основу современных биосенсоров, систем доставки лекарств и т. п.

#### **4. Пищевая промышленность.**

**Пищевая биотехнология** – современное и перспективное направление в пищевой промышленности, в основу которого положены биотехнологические процессы для получения пищевых продуктов и различных форм пищи.

Направления нанобиотехнологий в области пищевой промышленности:

**А. Снижение количества жира** в продуктах с помощью добавления наноструктурированных ингредиентов. По виду и вкусу такие продукты, по мнению разработчиков, не будут отличаться от «жирных». В их составе не используются нерастворимые вещества, и вред для человека можно считать минимальным, например майонез или мороженое, которые состоят из эмульсии с нанокapлями воды внутри.

**Б. Создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов:**

- моделирование аналогов запахов,
- применение стабилизаторов,
- изменение свойств продуктов (ароматизаторы и красители),
- синтез белка микроорганизмами.

#### **В. Новые микробные производства.**

В химических производствах классические виды брожения дополняются новыми технологиями производства биопродукта с помощью микроорганизмов. Из грибов получают каротиноиды и стероиды. Когда выяснилось, что бактерия *Corynebacterium glutamicum* из сахара и соли аммония с большим выходом синтезирует глутаминовую кислоту, были выделены бактерии и разработаны методы, с помощью которых можно в больших

масштабах производить многие аминокислоты, нуклеотиды и реактивы для биохимических исследований.

### **Г. Биокатализаторы или ферменты.**

Фермент – наноразмерная молекула белка, которая выступает катализатором в химической реакции.

Определенные ферменты можно выделить из организма, который их производит, или изготовить искусственным путем, а затем применять в различных производственных процессах, включая производство пищевых продуктов.

Тремя основными источниками натуральных ферментов являются растения, животные и микроорганизмы. Микроорганизмы используются более широко, чем растения и животные, поскольку их производство, как правило, дешевле, а их ферментный состав обычно легче прогнозировать и контролировать. Кроме того, легче организовать поставку сырья. Ферменты, производимые грибами (амилазы, диактазы и т. д.), изготавливаются путем стимуляции ферментации субстрата (например, отрубей или пшеницы) микроорганизмами.

В настоящее время ферменты широко применяются в производстве пищевых продуктов для улучшения текстуры, внешнего вида, питательной ценности и аромата продуктов питания.

Преимущества ферментов: биоразлагаемость и высокая специфичность, благодаря которой уменьшается количество побочных реакций и побочных продуктов и, следовательно, повышается качество продукции и снижается вероятность ее загрязнения.

**Д. Новые пищевые добавки**, в том числе ферменты и эмульгаторы (продуцируемые микроорганизмами аминокислоты, органические кислоты, полимеры и др.):

- **лимонная кислота**, которую раньше получали из плодов цитрусовых. В настоящее время ее получают путем брожения. Возбудителем брожения является гриб *Аспергиллус нигер*, основное сырье – черная патока.

Брожение происходит в растворе с содержанием 15 % сахара в аэробных условиях при температуре около 30 °С. Лимонная кислота используется в кондитерской промышленности, производстве безалкогольных напитков, сиропов, в кулинарии и медицине;

- **фермент химозин**, используемый в сыроварении. До внедрения биотехнологических методик этот фермент приходилось извлекать из желудков телят, ягнят или козлят, а сегодня он синтезируется бактериями, в геноме которых встроен соответствующий ген;

- органические и неорганические **нанодобавки**, используемые для изменения цвета, аромата, удаления неприятных запахов и даже для защиты от микробов;

- **нанокапсулы**, содержащие питательные вещества (микроэлементы, такие как железо, цинк, фолиевая кислота или витамин А, который может предотвратить или решить проблему неполноценного питания).

В 2011 г. в Амстердаме было создано программируемое вино (Nano Wine) [1]. По вкусу это обычное «Мерло», однако с помощью нагрева в микроволновой печи до определенной температуры его легко можно превратить в «Каберне», «Пино Нуар», «Мальбек» и др. (рис. 7). Это «вино» содержит огромное количество нанокапсул, которые раскрываются при разных условиях обработки и придают напитку требуемый цвет, вкус и аромат;



Рис. 7. NanoWine. Внешний вид и «инструкция»

- **нанобиодатчики** – это устройства, которые включают:

- а) живой организм или продукт, получаемый от живых систем (например, фермент или антитело);

- б) преобразователь для осуществления индикации, подачи сигнала или другой формы подтверждения присутствия определенного вещества в окружающей среде.

В биодатчиках, например, могут использовать флуоресцирующие или магнитные наночастицы. Данные наночастицы выборочно прикрепляются к определенным болезнетворным микроорганизмам в пище, после чего для обнаружения присутствия даже малейших следов этих микроорганизмов используются приборы, чувствительные к инфракрасному или магнитному излучению.

Нанодатчики применяются для мониторинга и контроля технологических процессов:

- для **стабилизации параметров производственных процессов** (температура, давление и т. д.) нанодатчики, вероятно, заменят традиционные датчики, используемые в производстве продуктов питания и напитков, или станут их дополнением;

- для **обнаружения болезнетворных микроорганизмов** нанодатчики можно размещать внутри оборудования для производства и распределения продуктов питания (и в конечном итоге в упаковке для продуктов).

Разрабатываются нанодатчики с наночастицами, которые светятся различными цветами в зависимости от присутствия того или иного болезнетворного микроорганизма. Работники, снабженные ручными инфракрасными или магнитными датчиками, смогут обнаружить присутствие болезнетворных организмов и даже определить их количество;

- для **мониторинга свежести**. Нанодатчики смогут контролировать состояние продуктов питания при транспортировке или хранении и сообщать о признаках порчи или загрязнения владельцам или потребителям

продуктов питания. Например, наночастицы, входящие в состав упаковки, реагируют на изменения молекулярного состава начинающего скисать молока, что вызывает изменение цвета упаковки.

## **5. Энергетическая промышленность.**

Нанобиотехнологии позволяют получить новые виды топлива, открыть способы его получения, хранения, использования. На сегодняшний день наиболее перспективными разработками являются технологии получения биотоплива (водорода, этанола и биодизеля) с помощью микроорганизмов благодаря использованию отходов различного происхождения в качестве питательной среды. При этом решаются как энергетические, так и экологические проблемы.

Преимущества получения биотоплива с помощью микроорганизмов:

- незначительные энергетические затраты;
- возможность создания установок оптимальной мощности;
- сырье – любые органические отходы;
- одновременное решение экологических проблем.

Для производства топлива используется система фотобиореакторов, названная «топливной фермой» (рис. 8). Она не требует постоянного притока свежей воды и занимает небольшое пространство. В процессе фотосинтеза сине-зеленые бактерии непрерывно вырабатывают и выделяют биотопливо в окружающую их жидкую среду. Сепаратор регулярно отделяет биотопливо от воды и других веществ, которые возвращаются обратно в систему биореакторов. «Топливная ферма» обладает высокими экономическими и экологическими характеристиками по сравнению с другими биотехнологиями производства биотоплива [2].

Суть производства биотоплива с помощью сине-зеленых водорослей (цианобактерий) состоит в том, что в молекулу ДНК этих микроорганизмов ученые встроили ген, контролирующий образование большого коли-



чества этилового спирта (этанола). Затем в ДНК цианобактерий встроили второй ген, ограничивающий естественную тенденцию этих водорослей к максимальному росту и размножению. Под действием второго гена сине-зеленые водоросли размножаются всего несколько дней. Затем они переключаются на синтез этилового спирта, используемого в качестве биотоплива. Этот метод позволил добиться максимального выхода этилового спирта при минимальной биомассе водорослей.

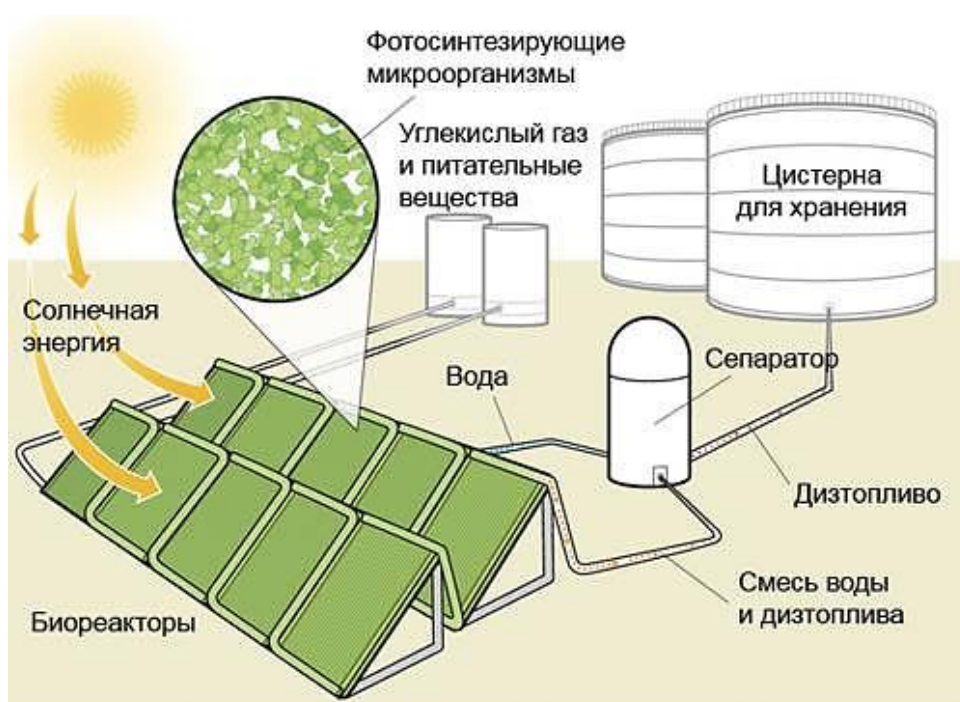


Рис. 8. Схема «топливной фермы»

Разработаны первые штаммы бактерий, которые могут переварить биомассу и синтезировать из нее все три вида транспортного топлива. Более того, микробы могут сделать это без помощи добавок ферментов.

Ранее самым дорогим процессом в производстве биотоплива было разрушение длинной цепочки целлюлозы на сахара, что достигалось ферментацией. Ферменты обходились не дешево, и они были расходной частью, которую нужно постоянно закупать, поэтому они были неконкурентоспособны с традиционными видами топлива.

Примерно такой процесс происходит при производстве топлива на «заводе», размещенном внутри бактерии (рис. 9). Бактерии производят альтернативное топливо, а именно прекурсоры для бензина и дизельного топлива [3].

Бактерии перерабатывают любую органику с заданной глубиной расщепления целлюлозы и сахаров.

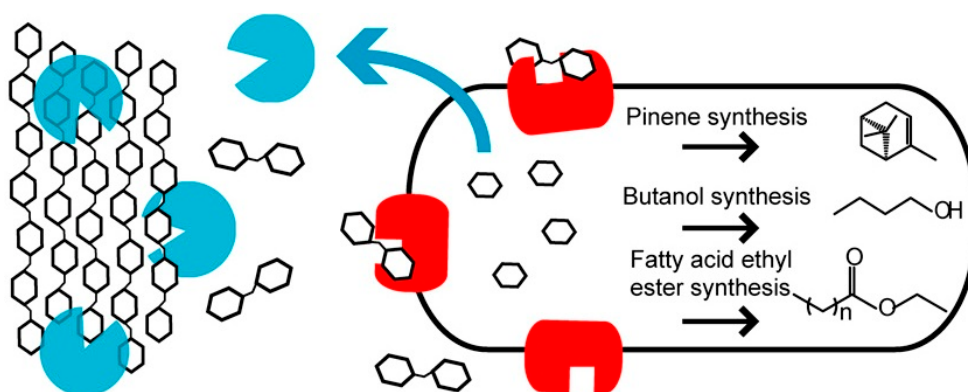


Рис. 9. «Топливная ферма» внутри бактерии, производящая пинон, бутанол, этиловый эфир жирной кислоты

## 6. Биоэлектроника.

Современные биоэлектронные устройства (биосенсоры, биотопливные элементы, биочипы и т. п.) созданы на основе нанокompозитных материалов. Они могут использоваться для непрерывного мониторинга состояния организма, для направленного воздействия на органы и ткани, а также для точечной доставки лекарственных препаратов.

**Биосенсор** – аналитический прибор, в котором для определения химических соединений используются реакции этих соединений, катализируемые ферментами, иммунохимические реакции или реакции, проходящие в органеллах, клетках или тканях [6]. В биосенсорах биологический компонент сочетается с физико-химическим преобразователем.

В состав биосенсора входят:

- биоселективный элемент (биологический материал, например ткани, микроорганизмы, органеллы, клеточные рецепторы, ферменты, анти-

тела, нуклеиновые кислоты и т. д.), материал биологического происхождения (биомимик). Чувствительный элемент может быть создан с помощью биоинженерии;

- преобразователь (оптический, пьезоэлектрический, электрохимический и др.), который работает на физико-химических принципах. Он преобразует сигнал, появляющийся в результате взаимодействия аналита с биоселективным элементом, в другой сигнал, который проще измерить;

- связанная электроника, которая отвечает в первую очередь за отображение результатов в удобном для пользователя виде.

Биосенсоры состоят из двух компонентов: системы распознавания биохимической природы (рецептора) и физико-химического преобразователя (трансдьюсера).

На первом этапе действия биосенсора происходит «узнавание» биоэлементом специфического для него вещества из многокомпонентной смеси.

На второй стадии происходит преобразование информации о протекании биохимической реакции в форму электрохимического сигнала.

На последней стадии электрический сигнал от трансдьюсера преобразуется в пригодную для обработки форму.

Биосенсоры могут быть использованы:

- для измерения пищевой ценности, свежести и безопасности продуктов питания;
- экспресс-анализа крови непосредственно у кровати больного;
- обнаружения и измерения степени загрязнения окружающей среды;
- обнаружения (т. е. детекции) и определения количества взрывчатых веществ, токсинов и возможного биологического оружия.

**Биотопливный элемент (БТЭ)** – устройство, которое непосредственно преобразует энергию химических связей субстрата в электричество пу-

тем биокаталитического окисления органических или неорганических веществ [4].

Одним из важнейших достоинств биотопливных элементов является то, что они представляют собой экологически чистые источники электрической энергии.

Основой БТЭ является биокатализатор (рис. 10), в качестве которого могут выступать либо ферменты, либо целые клетки микроорганизмов. Одними из перспективных биокатализаторов являются бактерии *Gluconobacter oxydans* subsp. *Industrius*. Благодаря мембранной локализации основных ферментов клеточного метаболизма – дегидрогеназ, осуществляющих неполное окисление углеродных субстратов, обеспечивается легкий доступ медиатора и субстрата к активным центрам ферментов.

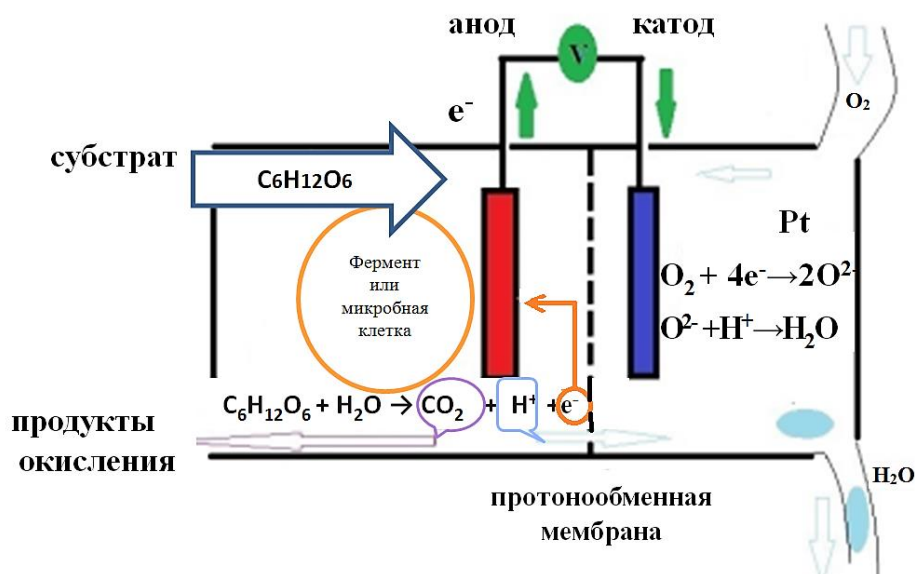


Рис. 10. Биологический топливный элемент

Одной из актуальных задач, направленных на увеличение долговременной работы и энергетических характеристик БТЭ, является иммобилизация биокатализатора на поверхности анода. Разнообразие субстратов, которые могут быть окислены микроорганизмами, позволяет использовать в качестве топлива достаточно широкий спектр веществ, а иммобилизация биоматериала на поверхности анода является необходимым условием при

разработке биоанодов многократного применения, что позволит создать на их основе биотопливные элементы непрерывного (проточного) типа.

Применение биосистем в конструкциях топливных элементов увеличивает их коэффициент полезного действия. В такой системе микроорганизмы на основе ряда субстратов (углеводы, метан, спирты) непрерывно генерируют водород, который далее окисляется в элементе «водород – кислород» с образованием электроэнергии.

**Биочип** – электронное устройство, содержащее биологические молекулы. Биочип представляет собой пластинку-носитель, на которой нанесены биомолекулы для одновременного проведения большого числа анализов в одном образце. Главным элементом любого биочипа служит матрица из сотен и тысяч микроячеек, каждая из которых содержит так называемые молекулярные зонды – молекулы, способные специфично связываться только со строго определенными биологическими молекулами.

Зондами могут служить олигонуклеотиды, участки геномной ДНК, РНК, антитела, олигосахариды, различные низкомолекулярные соединения и др.

Каждая ячейка биочипа служит своего рода отдельной «нанопробиркой», где иммобилизованный зонд распознает в анализируемом образце только свою мишень. Таким образом, удается проводить параллельное распознавание сразу множества мишеней, например генов, ответственных за лекарственную устойчивость возбудителя болезни. В биочипе (рис. 11) ячейки с иммобилизованными зондами располагаются упорядоченными рядами, причем каждая ячейка содержит уникальный зонд [7].

В зависимости от типа биочипа диаметр ячеек варьирует от 50 до 300 мкм, а их число зависит от сложности анализируемой мишени(ей) и задач эксперимента и составляет от нескольких десятков до нескольких тысяч. Молекулы исследуемого образца помечают флуоресцентной меткой, поэтому при облучении светом определенной длины волны ячейки,

где произошло связывание зондов с молекулами-мишенями, будут светиться (две крайние ячейки). В основе принципа работы всех типов биочипов с иммобилизованной ДНК лежит точное соответствие между комплементарными ДНК по правилу Уотсона – Крика: А-Т, G-С. Если соответствие между нуклеотидами иммобилизованной и гибридизуемой ДНК точно удовлетворяет условиям комплементарности, то образующиеся дуплексы будут термодинамически наиболее устойчивы. В результате при конечных температурах их будет больше, чем несовершенных дуплексов с нарушением условий комплементарности, и, соответственно, совершенным дуплексам будет отвечать более сильный сигнал флюоресценции. В выявлении и сопоставлении наиболее ярко светящихся ячеек и заключается работа прибора – анализатора биочипов.

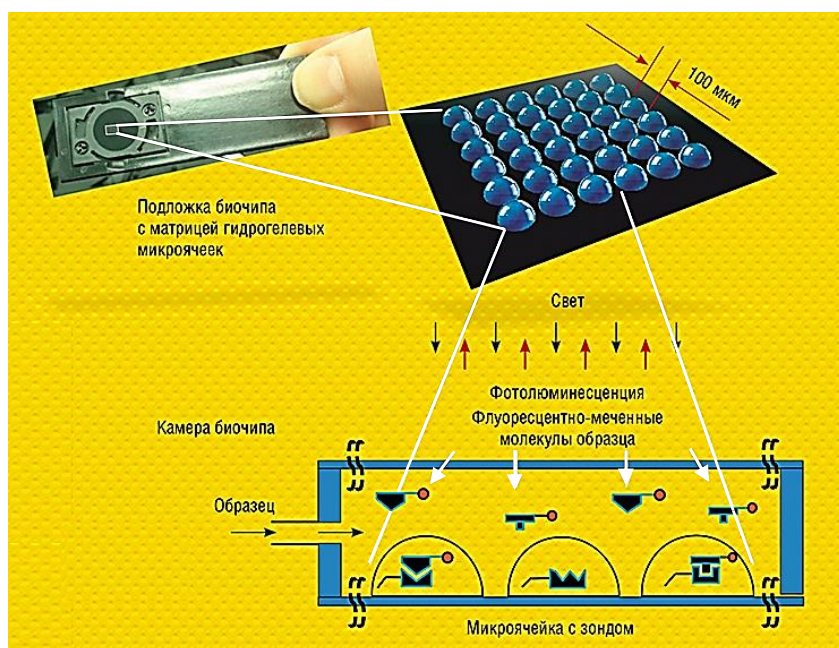


Рис. 11. Схема распознавания молекул в биочипе

Биологические микрочипы широко используются для исследовательских целей, а также для молекулярно-генетических исследований, диагностики различных заболеваний человека, экспресс-диагностики высокопатогенных вирусов, а также в ветеринарии, сельском хозяйстве, криминалистике, токсикологии, охране окружающей среды.

**Бионика (биомиметика)** – создание устройств, приборов, механизмов или технологий, идея и основные элементы которых заимствуются из живой природы.

Особенностью биомиметики [5] является копирование удивительных функций живых организмов и применение их при создании технологий и вещей. Различают следующие направления биомиметики:

- 1) биологическую биомиметику, изучающую процессы, происходящие в биологических системах;
- 2) теоретическую биомиметику, которая строит математические модели этих процессов;
- 3) техническую биомиметику, применяющую модели теоретической биомиметики для решения инженерных задач.

Использование биологических макромолекул в этой области обусловлено их упорядоченной биологической структурой. Двойная спираль ДНК или спирально уложенные белки вирусного капсида могут быть использованы как строительные леса, задающие определенное пространственное расположение, например, наноразмерных частиц металлов. Другим подходом применения упорядоченной структуры ДНК является ее использование как материала для наносистем (ДНК-конструирование).

При разработке новейших материалов «копируют» лучшие характеристики живых организмов:

- клейкая лента повторного использования, в основу идеи которой легла способность ящерицы геккона держаться и свободно передвигаться по вертикальным и наклонным поверхностям;
- пленка с пониженными отражающими свойствами, практически не реагирующая на свет, была создана на основе строения глаза моли;
- краска для кораблей, разработанная на основе особенности чешуи тунца, позволяющей сохранять низкие показатели сопротивления воды на высоких скоростях;



– покрытие спортивного плавательного костюма, фюзеляжа самолета Airbus A340 (немецкая авиакомпания Lufthansa), строение которых повторяет кожу акулы. Круговая структура верхнего слоя акульей кожи, которую называют «либретто», снижает образование турбулентности и ослабляет сопротивляемость потоку.

Однако в последние годы растет внимание к еще одной особенности живых существ – к способности экономить энергию при осуществлении жизненных процессов (и пока этими технологиями владеют только они). Например, раковина морского ушка настолько прочна, что ей не причинит никакого вреда даже переехавшая через нее машина, поскольку это природная керамика, сочетающая в себе прочность к воздействиям и эластичность. Секрет кроется в многочисленных нанослоях структуры из карбоната кальция и белка, чередующихся между собой. Что удивляет еще больше, так это способность морского ушка с легкостью вырабатывать этот высокопрочный материал, который по прочности намного превосходит продукты промышленности при нормальных показаниях температуры и давления.

### **1.3. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ НАНОМЕДИЦИНЫ**

Развитие биологии и медицины характеризовалось постепенным переходом от визуальных методов исследования к молекулярным и атомным. Внедрение методов нанобиотехнологий в практическую медицину привело к обособлению в ней такого направления как «наномедицина». Наномедицина включает диагностику и лечение заболеваний человека на молекулярном уровне.

#### **1. Мониторинг и диагностика.**

##### ***А. Методы и средства массового мониторинга населения.***

Проблема диагностики вирусных инфекций сохраняет актуальность, несмотря на огромное разнообразие уже разработанных методов.



Основные задачи, требующие безотлагательного решения в области инфекционных заболеваний:

- ускорение процедуры диагностики;
- повышение точности определения возбудителя вирусного заболевания, особенно при исследовании образца с многими видами вирусов;
- определение возбудителя при его крайне низком содержании в образце;
- проведение не только качественного, но и количественного анализа образца.

В решении этих задач достаточно перспективным представляется использование атомно-силовой микроскопии. Этот метод позволяет за небольшое время получить изображение поверхности образца с разрешением в несколько нанометров.

Атомно-силовой микроскоп дает возможность избирательно определять иммуноглобулины (антитела белковой природы) без дополнительных стадий обработки. Это обусловлено различиями формы и размеров молекул иммуноглобулинов. Подобным образом можно определять также белки оболочки вируса, которые выступают в роли антигенов.

### ***Б. Нановизуализация (нанометки, приборы для визуализации).***

В медицинских и биологических исследованиях, как прикладных, так и фундаментальных, существует необходимость визуализации каких-либо событий внутри клетки на молекулярном уровне. Например, в области фармакокинетики лекарственных препаратов важно отследить пути распространения лекарства в организме после его введения. Для этого можно «посадить» на молекулы фармпрепаратов какие-то маленькие метки, которые бы постоянно сигнализировали о месте их нахождения и происхождении с ними и при этом были бы совершенно безвредными для биологического объекта.

В качестве меток предложено использовать монокристаллы на основе различных редкоземельных элементов, например ортофосфатов и полифосфатов, которые обладают способностью люминесцировать в ответ на внешнее облучение.

### **В. Молекулярная диагностика.**

Молекулярно-генетическая диагностика – метод обследования организма, позволяющий точно и быстро выявить вирусы и инфекции, мутации генов, вызывающих патологию, оценить риски наследственных и иных заболеваний. Важнейшим достоинством молекулярно-генетической диагностики является минимальная степень медицинского вмешательства, поскольку исследование проводят *invitro*. Метод успешно применяют даже для диагностики заболеваний у эмбрионов, а также у ослабленных и тяжелобольных пациентов. Самый распространенный материал для исследования – кровь из вены, однако возможно выделение ДНК/РНК из других жидкостей и тканей: слюны, соскоба слизистой рта, выделений из половых органов, околоплодной жидкости, волос, ногтей и т. д. Молекулярная диагностика – значительный шаг к персонализированной медицине, она позволяет учитывать все особенности конкретного пациента при обследовании и терапии, например:

- выявление существующих патологий. Она позволяет обнаружить заболевание, которое не может быть определено обычными методами даже на ранней стадии, когда внешних проявлений нет;

- исследование аллергических реакций. Молекулярная диагностика успешно применяется для определения аллергии: в отличие от традиционных методов она более точна и при этом безопасна для пациента, так как отсутствует непосредственный контакт с аллергеном;

- индивидуальная оценка рисков развития наследственных заболеваний. Молекулярная диагностика помогает выявить у взрослых и детей опасность в будущем подвергнуться различным патологиям. Нужно отме-

тить, что есть болезни, которые вызваны исключительно мутацией гена (моногенные), и те, которые обусловлены в том числе генетическими особенностями (мультифакторные). Информация о первых позволяет, к примеру, оценить риски передачи наследственных заболеваний от родителей к ребенку. Знание о предрасположенности к мультифакторной патологии необходимо еще и для профилактики болезней с помощью изменения образа жизни.

Молекулярная диагностика применяется:

- в перинатальной медицине. Диагностика позволяет установить генетические причины бесплодия, невынашивания беременности, дать информацию о состоянии здоровья и генетических предрасположенностях будущего человека ещё в состоянии эмбриона, например позволяет распознать синдромы Дауна, Эдвардса, Патау, Тернера, Клайнфельтера;

- фармакогенетике. Диагностика объясняет, почему на некоторых действуют одни препараты, а на других – иные: все дело в генетических особенностях пациентов. Возможность определения эффективности веществ имеет особое значение при лечении тяжелых заболеваний, например онкологических;

- спортивной медицине. Например, родители малышей могут узнать о том, какой вид занятий принесет ребенку наибольшую пользу для здоровья или позволит достичь спортивных результатов.

### ***Г. Наноэндоскопия.***

Капсульная эндоскопия – процедура исследования пациента с помощью эндоскопической видеокапсулы, т. е. встроенной в капсулу видеокамеры, совмещённой с передатчиком видеосигнала. В процессе прохождения желудочно-кишечного тракта капсула делает в течение нескольких часов несколько десятков тысяч снимков, которые передаются на антенны, размещённые на теле пациента, и записываются в память приёмного устройства. Питание может осуществляться либо от встроенной батарей-

ки, либо беспроводным способом от внешнего источника. С помощью капсульной эндоскопии появилась возможность получения изображений ранее недоступных для эндоскопии участков тонкой кишки.

Преимущества метода перед традиционной эндоскопией:

- возможность осмотреть тонкую кишку на всем протяжении;
- отсутствие боли и дискомфорта;
- отсутствие вредного воздействия на организм человека;
- капсула является одноразовой, что исключает возможность инфицирования пациента.

Недостатки метода:

- невозможно взятие материала для гистологических исследований (биопсии), что часто является необходимым и широко применяется при традиционной эндоскопии;
- возможна задержка видеокапсулы в желудочно-кишечном тракте пациента (что происходит, по разным оценкам, в 0,5–21 % случаев от общего количества видеокапсульных процедур). В этой ситуации капсула извлекается из пациента или с помощью эндоскопа, или с помощью полостной хирургической операции. Наиболее длительное время задержки видеокапсулы, описанное в литературе, – 4 года 5 месяцев и 21 день.

## **2. Фармакология.**

### ***А. Создание принципиально новых лекарств.***

Идея применения наночастиц для повышения эффективности воздействия фармакологических средств диагностики и терапии основана на том факте, что вещества в наноформе имеют свойства, отличные от свойств веществ в макродисперсной форме. В частности, высокая удельная поверхность наноматериалов приводит к тому, что поверхностные явления (адсорбция/десорбция, адгезия) начинают играть преобладающую роль в процессах их взаимодействия с макромолекулами и биологическими объектами. Следствием этого является то, что даже невысокие концен-

трации наночастиц, не оказывающие значительного токсического эффекта, могут производить значительное воздействие на живые организмы. Лекарственные вещества в виде наночастиц имеют не до конца изученные свойства, влияющие на их фармакокинетику, т. е. на всасывание, распределение в тканях, биотрансформацию и выведение из организма. Систематическое изучение закономерностей действия лекарственных веществ в наноформе позволит определить как их терапевтический потенциал, так и возможные риски для здоровья человека.

### ***Б. Наноструктурирование традиционных лекарств.***

Клиническую эффективность фармакотерапии распространенных заболеваний человека можно повысить за счет создания принципиально новых лекарственных форм (ЛФ), хорошо известных и всесторонне изученных и апробированных лекарств. Одно из развитых современных направлений – это создание лекарств на основе наночастиц. Лекарства нового поколения принято называть терапевтическими системами. От традиционных ЛФ они отличаются пролонгированным действием, контролируемым высвобождением действующих веществ и их целевым транспортом к органам и тканям-мишеням. При длительной циркуляции наноносителей в кровяном русле содержащееся в них лекарственное вещество защищается от инактивации, а его действие пролонгируется. Помимо внутриклеточного и целенаправленного транспорта, важным преимуществом наноносителей является способность транспортировать их содержимое внутрь клеток в неактивном состоянии с последующим разрушением в лизосомах и выделением действующих веществ.

Применение нанотехнологий в фармакологии оказалось весьма плодотворным и привело к созданию препаратов, обладающих новыми свойствами на основе давно и хорошо известных лекарственных веществ. В зависимости от агрегатного состояния и морфологических особенностей наночастицы делятся на нанокапсулы, нанокристаллы, наносферы и полимерные мицеллы.

### **3. Терапия.**

#### ***А. Персонафицированное лечение.***

Персонафицированная медицина – это медицинское сопровождение жизни каждого человека с применением персонафицированных методов раннего прогнозирования и профилактики заболевания, его диагностики с выявлением патологических состояний на самых ранних стадиях, а при необходимости – с применением персонафицированных фармакотерапевтических и высокотехнологичных малоинвазивных методов лечения.

#### ***Б. Адресная доставка лекарств (инкапсуляция, функциональные носители).***

Адресная доставка наночастиц осуществляется двумя способами, получившими названия пассивного и активного нацеливания. Пассивное нацеливание основано на самопроизвольном накоплении наночастиц в очагах воспаления и тканях опухолей. Это возможно благодаря явлению «повышенной проницаемости сосудов». Стенка кровеносных капилляров в опухолях изменена так, что между ее клетками возникают поры. Через них свободно проходят наночастицы, направляясь затем к клеткам опухоли. Из-за недоразвития лимфатических сосудов и недостаточного оттока межклеточной жидкости наночастицы накапливаются в опухолевой ткани.

Активное нацеливание (управляемый транспорт) осуществляется путём нанесения на поверхность наночастиц соответствующего лиганда, выполняющего функцию «молекулярного адреса». Таким «адресом» могут быть антитела или их фрагменты, пептиды, углеводы. Лекарственное вещество может быть помещено внутрь наночастицы или присоединено к ее поверхности посредством химических связей или адсорбции.

Среди большого разнообразия наночастиц лишь некоторые могут быть использованы в медицине. Какими же свойствами должны обладать наночастицы – носители лекарственных препаратов?

Среди таких свойств следует особо выделить:

- отсутствие токсичности;
- способность к переносу достаточного количества лекарственного препарата;
- освобождение лекарства в клетке-мишени в оптимальной дозе;
- незаметность для клеток иммунной системы.

Этими свойствами более всего отличаются липосомы, полимерные мицеллы, дендримеры, неорганические наночастицы и углеродные материалы.

С целью переноса лекарств могут быть использованы также неорганические наночастицы. При этом высвобождение лекарственного вещества может контролироваться термическим воздействием или изменением магнитного поля. В качестве возможных переносчиков лекарственных препаратов рассматриваются также углеродные наноматериалы: фуллерены и нанотрубки.

Возможности использования фуллеренов в медицинских целях связаны, прежде всего, с такими свойствами их молекул, как:

- небольшие размеры (диаметр сферической молекулы C<sub>60</sub> равен 0,714 нм);
- способность проходить через липидные мембраны клеток;
- трехмерность и наличие полости внутри молекулы;
- высокая реакционная способность;
- низкая токсичность.

Внутри молекул фуллеренов достаточно места для того, чтобы там могли разместиться один-два или даже более атомов других элементов, в том числе и металлов. Получающиеся таким образом соединения называют эндофуллеренами.

Для доставки веществ в клетку ученые прибегают к самым разным способам, в том числе узкоспецифичным, которые предназначены для строго определенных соединений и типов клеток, что усложняет задачу ученым.

Исследователи Гарвардского университета (США) под руководством профессора Х. Парка в 2006 г. предложили создать универсальный метод для доставки веществ во все типы клеток. Они обнаружили, что клетки, выращенные на подложке, усеянной вертикально расположенными нанотрубками, не получают никаких повреждений и ведут себя в целом нормально. В течение нескольких часов клетки, медленно опускаясь под собственной тяжестью, протыкаются нанотрубками без всяких для себя последствий. После такой «операции» клетки активно растут, развиваются и делятся.

Следовательно, ученые легко и просто получают прямой физический доступ к внутреннему пространству проткнутой нанотрубками клетки. Это значит, что в такие клетки можно доставлять нужные молекулы без ограничений, свойственных другим методам, широко практикуемым сегодня.

Это происходит следующим образом: для начала вводимая в клетку молекула (или молекулы) сравнительно слабо связывается с поверхностью нанотрубки. После того как клетка сажается на подложку из таких нанотрубок и протыкается ими, молекулы оказываются внутри клетки.

Если изменять длину нанотрубок, то можно доставлять вещество строго в нужную часть (органойд) клетки. Коллектив Х. Парка уже продемонстрировал универсальность этого метода, внедрив молекулы РНК, ДНК и белков в клетки разных типов. Сам по себе массив нанотрубок не слишком сложен в изготовлении. Более того, к нанотрубкам можно прикреплять разные молекулы, внедряя в клетку сразу большое количество веществ.

### ***В. Контролируемое высвобождение лекарств из носителей.***

Создаются лекарственные формы, способные контролировать скорость высвобождения лекарственных средств, обеспечивать постоянное всасывание лекарственных веществ и поддерживать стабильную концентрацию в плазме крови в течение длительного периода времени, пролон-



гировать терапевтический эффект и предупреждать развитие концентрационно зависимых нежелательных эффектов.

Для контролируемого высвобождения лекарственного препарата возможно применение термо- или pH-чувствительных липосом, имеющих довольно прочную мембрану при нормальных (физиологических) условиях. Однако при понижении pH среды или повышении температуры, которые свойственны определенным патологическим процессам или создаются искусственно, проницаемость мембран увеличивается.

#### **4. Восстановительная медицина.**

##### ***А. Тканевая инженерия.***

Важной задачей тканевой инженерии является конструирование трехмерных матриц, способствующих образованию тканей. Матрикс должен выступать в качестве каркаса, а также стимула для размножения стволовых клеток и последующего их превращения в специализированные клетки новой ткани. Ткань может быть выращена на матриксах, которые после имплантации в организм хозяина по мере роста новой ткани полностью растворяются. При этом на месте дефекта остается только новая ткань. Возможно также имплантировать «биокомпозит», состоящий из матрикса и уже частично сформированной новой ткани.

Свойства «идеального» матрикса:

1. Матрикс должен иметь структуру, копирующую структуру ткани организма-хозяина и обеспечивающую рост ткани в пространстве.

2. Матрикс должен обладать сетью больших пор, обеспечивающих доставку питательных веществ ко всем клеткам. Желательно, чтобы матриксы стимулировали образование кровеносных сосудов внутри пор.

3. Матриксы должны иметь определенную структуру поверхности: текстура пор нанометрического масштаба или шероховатость поверхности влияют на функциональную активность прикрепляющихся к ней клеток.

4. Необходимое свойство идеальных матриксов – способность к биоразрушению. Продукты распада материала матрикса должны быстро выводиться из организма.

5. Оптимальные каркасы активируют клетки ткани к самовосстановлению (в материал матрикса можно включать биологически активные соединения, позволяющие увеличивать рост клеток, и лекарственные препараты).

6. Механические свойства матрикса должны соответствовать механическим свойствам ткани организма-хозяина.

Матриксы получают из биологических тканей, удаляя из них клетки и сохраняя трехмерную структуру межклеточного вещества. Матриксы можно изготавливать из неорганических и органических материалов, используя, например, керамику, гидроксиапатиты, полимеры, кораллы, коллаген, желатин и др.

При использовании неразрушаемых матриксов нередко возникают осложнения, связанные с длительным присутствием чужеродного материала в организме. Поэтому ученые сосредоточили свои усилия на разработке матриксов из биоразрушающихся полимеров. Одними из первых стали использоваться биоразрушающиеся матриксы, создаваемые на основе полимеров молочной и гликолевой кислот. Из них уже создан ряд тканеинженерных конструкций кожи, кости, хряща, сухожилий, мышц и др.

Клеточные матриксы из нановолокон уже используются для регенерации хрящевой, костной и нервной тканей, кожи, стенок кровяных сосудов. Для обеспечения лучшей биологической совместимости при их создании зачастую применяют природные полимеры: коллаген, белок шелка, целлюлозу, а также их смеси. Чтобы улучшить механические свойства волокон, матриксы формируют одновременно из биологических и синтетических полимеров. В клеточные матриксы могут включать также неорганические компоненты. При пересадке костной ткани для этого используют карбонат и фосфат кальция.

## **Б. Введение имплантов (костные импланты, биodeградирующие материалы, «умные» материалы).**

Импланты – это специально создаваемые конструкции, которые вживляются в организм человека в роли заменителей отсутствующих или поврежденных органов. Они изготавливаются из биоматериалов – особых материалов, «уживающихся» с клетками и тканями организма.

К биоматериалам предъявляются следующие требования:

- высокая совместимость с живым организмом;
- высокие механические характеристики, часто специальные для каждого случая: жесткость, растяжимость или нерастяжимость, эластичность, общая прочность, износостойкость и др.

Среди современных металлических биоматериалов лидирующее положение занимает титан и создаваемые на его основе сплавы. Этот металл используется для изготовления протезов тазобедренных, коленных, челюстных суставов, пластин и спиц для костного сращения, винтов для фиксации позвоночника.

Для повышения механических свойств имплантов титановые сплавы стали заменять чистым наноструктурированным титаном. В наноструктурированном состоянии (размер зерна менее 100 нм) механические характеристики титана (упругость, прочность и твердость) достигают свойств легированных титановых сплавов. Механическая прочность имплантов, изготовленных из наноструктурированного титана, увеличивается в 2–3 раза по сравнению с исходным чистым титаном.

Таким образом, из наноструктурированного титана можно изготавливать более тонкие и, соответственно, менее травматичные импланты, сохраняющие требуемые механические свойства.

Наноструктурированный титан, к сожалению, значительно отличается по своим свойствам от любых тканей организма, включая и костную ткань. Для повышения биосовместимости титановых имплантов была

предложена специальная обработка (модификация) поверхности имплантатов. Вначале поверхности импланта придают пористость и шероховатость. Затем на нее наносят покрытие, приближенное по свойствам к костной ткани человека.

Основу такого покрытия составляют коллаген животного происхождения и синтетический наноструктурированный гидроксиапатит. Кроме этих компонентов в композиционный препарат могут быть введены биологически активные вещества, которые позволяют увеличивать рост клеток и вызывают адгезию. Они обеспечивают нормальное функционирование костной ткани и ее быстрое заживление в случае травмы.

### ***В. Введения имплантируемых устройств (имплантируемые сенсоры, имплантируемые приборы).***

Имплантация устройств доставки лекарственных препаратов является очень перспективным направлением медицины, так как она в сложных условиях часто позволяет не только гарантировать введение требуемых лекарств в конкретный орган или место, но и обеспечить заданный режим и количество выделяемого препарата. Наиболее простым вариантом является имплантация в нужном месте полимерной матрицы, содержащей необходимые вещества, которые постепенно с некоторой скоростью выделяются в окружающие ткани организма. В качестве уже известных примеров можно привести имплантируемые препараты типа Norplant (противозачаточное средство фирмы Wyeth Laboratories), Gliadel (химиотерапевтическое средство фирмы Guilford Pharmaceuticals, используемое при раковых поражениях мозга) и Viadur (гормональный препарат фирмы Bayer, применяемый при лечении рака простаты).

### **5. Нанороботы для диагностики в терапии и хирургии.**

Клинические роботы предназначены для решения трех главных задач: диагностики заболеваний, терапевтического и хирургического лечения.

Роботизированная хирургия – одно из самых перспективных направлений в современной медицине. Использование робота во время операции позволяет существенно снизить погрешности человеческого фактора, гарантирует точность движений. Будущее за медицинскими нанороботами, которые будут лечить людей на уровне клеток внутри организма.

Прикладные достижения нанобиотехнологий наиболее востребованы в медицине, имеющей основной целью увеличение продолжительности и повышение качества жизни. Для этого с помощью нанотехнологий ученые усовершенствуют методы диагностики заболеваний, а методы наномедицины позволяют использовать различные наночастицы для адресной доставки лекарств и фрагментов ДНК в нуждающиеся клетки.

### **Контрольные вопросы**

1. Определение нанобиотехнологии. Соотношение природных нанобъектов и наноструктур с искусственными.
2. Направления развития биологии.
3. Отличия живого объекта от неживого.
4. Системно-структурные уровни организации живого.
5. Единство и многообразие органического мира.
6. Классификация живых организмов.
7. Свойства живого объекта.
8. Состав живого. Уникальные свойства углерода.
9. Влияние наноразмерных частиц на биологические объекты.
10. Контроль за состоянием поверхностей и манипуляции с ними.
11. Классификация биотехнологий.
12. Направление применения нанобиотехнологии: контроль за состоянием окружающей среды.
13. Направление применения нанобиотехнологии: материаловедение.

14. Направление применения нанобиотехнологии: сельское хозяйство.
15. Направление применения нанобиотехнологии: пищевая промышленность.
16. Направление применения нанобиотехнологии: энергетика.
17. Направление применения нанобиотехнологии: биоэлектроника.
18. Генная инженерия: определение, история развития.
19. Теоретические основы генной инженерии. Методики клонирования.
20. Применение генной инженерии: «обратная генетика», генотерапия.
21. Применение генной инженерии: производство продуктов питания, генетическое программирование животных и растений, производство лекарств.
22. Проблемы и риски генной инженерии.

## 2. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ В НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

### 2.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ СКАНИРУЮЩЕГО ЗОНДОВОГО МИКРОСКОПА

В основе работы сканирующего зондового микроскопа лежит взаимодействие атомов поверхности материала с индентором зонда (рис. 12).

В зависимости от характера этого взаимодействия, а также природы силы взаимодействия в микроскопе реализуется широкий спектр различных методик. На сегодняшний день их реализовано более 40.

Основными методами сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) являются:

- атомно-силовая микроскопия (АСМ);
- сканирующая туннельная микроскопия (СТМ);
- сканирующая функциональная микроскопия (СФМ);
- электросиловая микроскопия (ЭСМ);
- магнитно-силовая микроскопия (МСМ).

Разберем основные узлы, из которых состоит атомно-силовой микроскоп. Условно конструкционные элементы атомно-силового микроскопа можно разделить на три части: механическую, оптическую и электронную систему обратной связи и корректировки сигнала.

#### *Механические элементы атомно-силового микроскопа*

Основным сенсорным элементом атомно-силового микроскопа является кантилевер (левер, консоль, зондовый датчик). Вся информация об исследуемой поверхности получается именно благодаря отклонениям кантилевера, которые регистрируются оптической системой атомно-силового микроскопа. По сути консоль – это пружина с малой жесткостью ( $k$ ). В зависимо-

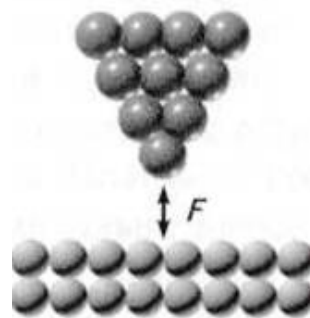


Рис. 12. Взаимодействие атомов зонда и образца

сти от материала, из которого кантилевер изготавливается, жесткость может быть выше (кремниевые кантилеверы  $\text{SiO}_2$ ,  $k$  варьируется от 0,1 до 400 Н/м) или ниже (нитрид-кремниевые кантилеверы  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ,  $k$  варьируется от 0,01 до 0,73 Н/м).

Общая схема атомно-силового микроскопа представлена на рис. 13.

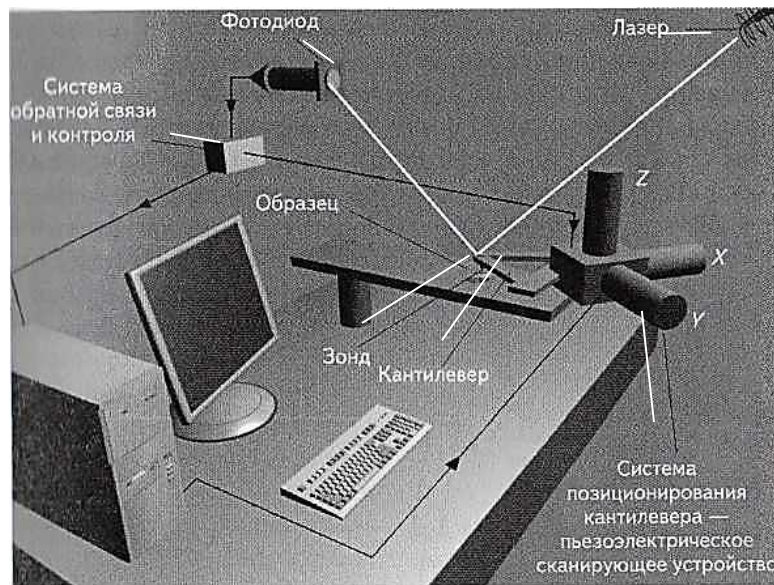


Рис. 13. Общая схема устройства атомно-силового микроскопа

Форма кантилеверов также бывает разной. Они бывают V-образной (триангулярные) или I-образной формы (рис. 14). Для биологических исследований выбирают нитрид-кремниевые кантилеверы. Форма кантилевера выбирается в зависимости от поставленных задач, но при прочих равных условиях в случае исследования клеток предпочтение отдается V-образным кантилеверам, поскольку степень надежности у них выше. Хотя нужно отметить, что при равной длине у триангулярных кантилеверов их жесткость, а следовательно, и резонансная частота выше.



Рис. 14. Виды кантилеверов



На конце кантилевера закрепляется зонд, который имеет, как правило, пирамидальную форму (хотя сейчас выпускаются зонды округлой формы, зонды с выращенной на конце острой иглой, функционализированные зонды и т. д.). При сканировании объекта зонд скользит по поверхности образца. Характер силового взаимодействия между зондом и образцом достаточно сложен, поскольку определяется свойствами зонда, образца и среды, в которой проводится сканирование. В случае исследования биологических объектов на воздухе основной вклад в силовое взаимодействие зонда и образца дают: силы отталкивания, вызванные механическим контактом крайних атомов зонда и образца, силы Ван-дер-Ваальса, а также капиллярные (присасывающие) силы, связанные с наличием пленки воды и органического адсорбата на поверхности образца. Кроме того, и со стороны зонда при воздействии на достаточно мягкий образец и со стороны образца на зонд действует сила упругой деформации. При движении зонда над поверхностью их взаимодействие обеспечивается в том числе силой трения. Однако большинство исследований биологических и медицинских препаратов проводится в жидкости, где нивелируются капиллярные силы, но присоединяются силы вязкого сопротивления среды, которые зависят от типа жидкости, в которой проводятся исследования.

При изменении силы взаимодействия зонда и образца кантилевер, на котором закреплен зонд, отклоняется (изгибается), и этот изгиб регистрируется с помощью оптической системы (рис. 15). Соотношение между силой, воздействующей на зонд со стороны образца, и отклонением кантилевера, описывается законом Гука:

$$F = -kx, \quad (1)$$

где  $F$  – сила, Н;  $k$  – константа упругости кантилевера, Н/м;  $x$  – отклонение кантилевера.

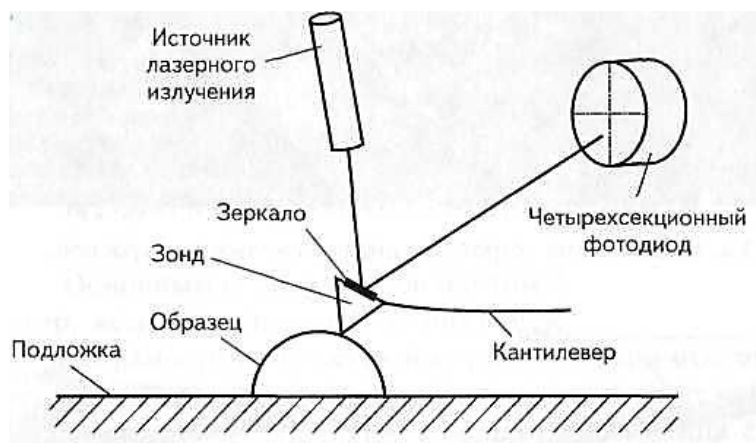


Рис. 15. Схема изгиба кантилевера и регистрации взаимодействия зонда и образца с помощью оптической системы

Однако при сканировании происходит смещение зонда не только по нормали к поверхности, но и в латеральной плоскости. Все смещения регистрируются четырехсекционным фотодиодом.

К механической части атомно-силового микроскопа относятся также система точного позиционирования. Для перемещения зонда, закрепленного на кантилевере, используются пьезокерамические двигатели, которые перемещают зонд с точностью до ангстрема. Пьезокерамические материалы изменяют свои размеры под действием приложенного к ним электрического напряжения. Так, например, пьезокерамический цилиндр при приложении напряжения вдоль оси удлиняется и становится тоньше. Это свойство и используется для перемещения зонда по одной координате, а для перемещения по трем координатам используется комбинация из трех взаимно перпендикулярных балок (трипод) (рис. 16).

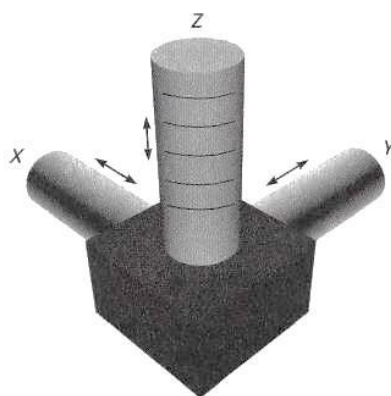


Рис. 16. Схема устройства триподного сканера

Однако в настоящее время большее распространение получили трубчатые сканеры. Изгибы одиночной трубки приводят к перемещению зонда по осям  $X$  и  $Y$ , а укорачивание или удлинение – по оси  $Z$ , т. е., как и в случае применения трипода, перемещение осуществляется в трех взаимно перпендикулярных направлениях. Конструкции современных манипуляторов обеспечивают диапазон механического перемещения зонда до 150—200 мкм по осям  $X$  и  $Y$  и до 12 мкм по оси  $Z$ , т. е. в диапазон сканирования закладывается возможность исследования как клеток, так и тканей и межклеточных контактов. Недостатком триподов является достаточно сильная асимметрия, но в отличие от трубчатого сканера он предоставляет больший диапазон сканирования по оси  $Z$ , поэтому для биологии, где высота клеток часто является ограничивающим фактором, лучше подходят именно триподные конструкции пьезоэлементов. Хотя у пьезокерамики имеются недостатки (крип и гистерезис), именно этот тип сканирующих элементов обуславливает высокую точность позиционирования и перемещения зонда или образца. Пьезоэлемент может перемещать зонд (сканирование зондом), а может перемещать поверхность, на которую нанесен образец (сканирование образцом). Для биологических и медицинских исследований не является принципиальным вопросом, какой элемент является неподвижным, а какой – движущимся, но в любом случае требуется наличие хорошей системы виброизоляции.

#### *Оптическая система атомно-силового микроскопа*

Оптическая система состоит из источника когерентного излучения (лазера), луч которого фокусируется на кончике кантилевера. Луч отражается от поверхности кантилевера, выступающего в качестве зеркала, и попадает в центр четырехсекционного фотодиода. При изгибе кантилевера луч на фотодиоде смещается, что приводит к появлению тока рассогласования, который регистрируется дифференциальным усилителем и анали-

зируется в системе обратной связи (рис. 17). При смещении кантилевера в нормальном направлении или при его кручении возникает разница в сигналах соответствующих участков фотодиода: верхние сегменты / нижние сегменты (при изгибе в направлении нормали) или правые сегменты / левые сегменты (при боковом кручении).

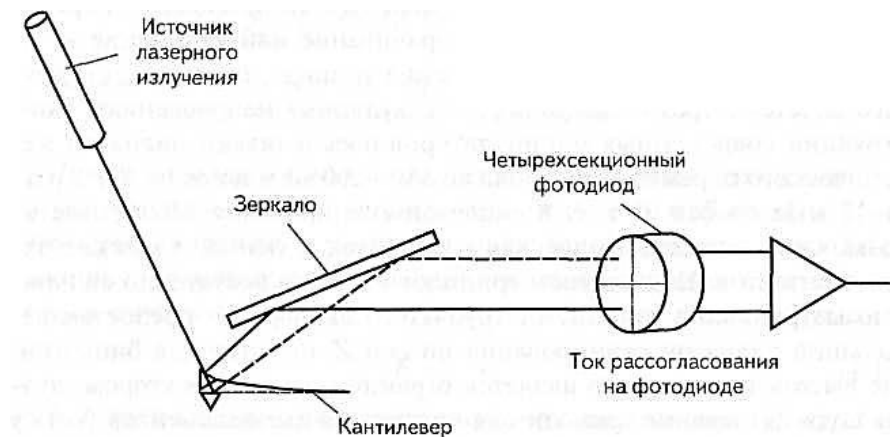


Рис. 17. Схема формирования тока рассогласования на фотодиоде

Первый сигнал несет информацию о балансе сил притяжения и отталкивания, а второй – о латеральных силах взаимодействия зонда и образца. В начале работы производится центровка лазера на фотодиоде, которая достигается регулировкой взаиморасположения пера, зеркала и фотодиода.

### *Электронная система обратной связи и корректировки сигнала*

Цепь обратной связи в совокупности с зондом, сенсором и пьезоэлектрическим двигателем образуют механизм для позиционирования зонда, с помощью которого зонд удерживается на фиксированном расстоянии от поверхности. При большем приближении зонда к поверхности сенсорный сигнал возрастает. Компаратор сравнивает его с опорным напряжением и вырабатывает корректирующий сигнал, используемый в качестве управляющего для пьезодвигателя, который отводит зонд от образца. Изначально при настройке отражение лазера центрируется в определенной точке фотодиода. Ток рассогласования на фотодиоде (рис. 17)

при изгибе кантилевера показывает, что требуется запуск системы коррекции. Система коррекции подает сигнал на пьезоэлемент до тех пор, пока изгиб кантилевера (а следовательно, и сигнал на фотодиоде) не вернется к исходному уровню (рис. 18).

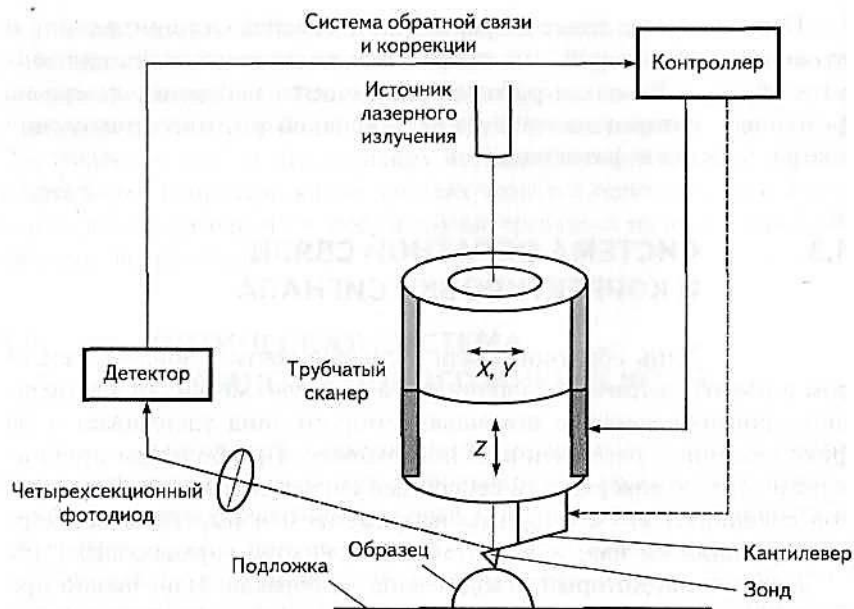


Рис. 18. Схематическое изображение работы системы обратной связи

Для поддержания какого-либо параметра (положение или частота колебания кантилевера), равного некоторому заданному значению, требуется введение трех компонент: пропорциональной, интегральной и дифференциальной. Пропорциональная компонента обеспечивает отклик системы на резкие изменения сигнала рассогласования. При корректной работе этой составляющей прописываются самые мелкие детали поверхности. Интегральная компонента контролирует отклик системы в области низких частот, т. е. обрабатывает крупные детали поверхности и компенсирует наклон образца. Дифференциальная составляющая является стабилизирующим параметром, который нивелирует осцилляции при высоких скоростях сканирования и при исследовании сложного рельефа поверхности.

При настройке атомно-силового микроскопа важно правильно задать характеристики, обеспечивающие своевременную коррекцию сигнала.

Как правило, чем выше пропорциональная и интегральная компоненты, тем лучше функционирует цепь обратной связи и тем точнее прописываются черты сканируемой поверхности. Однако если они превысят некоторый критический уровень, это приведет к появлению самовозбуждения. Появление шума в случае сканирования живых клеток (особенно с малой ригидностью мембран) приводит к их разрушению (рис. 19).



*Рис. 19.* Разрушение клетки при сканировании в результате самовозбуждения системы

При низких значениях пропорциональной и интегральной компонент система обратной связи не успевает корректировать сигнал, а значит точность отображения топографии исследуемой поверхности будет низкой. При сканировании живых клеток иногда прибегают к этому приему, чтобы снизить воздействие зонда на поверхность исследуемой клетки. В этом случае интегральная компонента должна быть ниже некоторого критического уровня, в противном случае зонд выйдет из обратной связи. Кроме того, снижение интегральной компоненты не дает возможности получения полноценного изображения клетки (рис. 20).

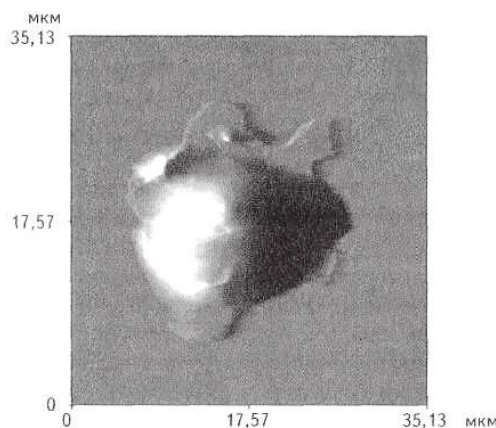


Рис. 20. Снижение интегральной компоненты приводит к неудовлетворительному качеству изображения клетки

Таким образом, отлаженная работа механической, оптической и составляющей систем атомно-силового микроскопа обеспечивает получение изображения любого биологического объекта с высоким пространственным разрешением.

## 2.2. РЕЖИМЫ (МОДЫ) СКАНИРОВАНИЯ ОБЪЕКТОВ

Существуют контактные, колебательные (резонансные) режимы сканирования (рис. 21) и режим фазового контраста.

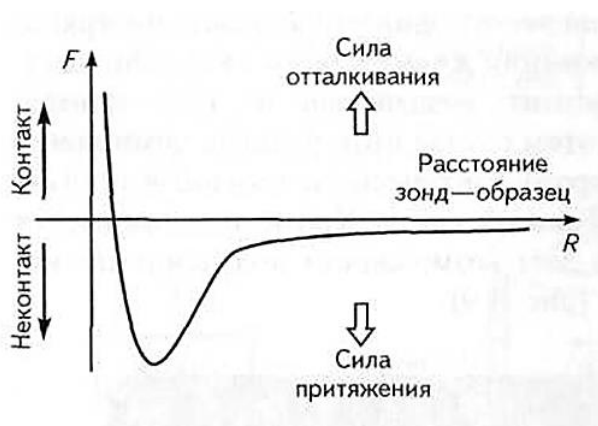


Рис. 21. Зависимость силы  $F$  взаимодействия зонда и образца от расстояния  $R$  между ними

И тот и другой методы широко используются при необходимости получения и анализа изображения в биомедицинских исследованиях. Выбор режима производится исходя из поставленных практических задач.

### *Контактный режим сканирования*

Сущность работы микроскопа в контактном режиме заключается в непосредственном касании зонда поверхности, в результате чего траектория вертикального перемещения образца относительно зонда в процессе сканирования какого-либо участка совпадает с рельефом поверхности. Сумма всех сил, действующих на зонд со стороны образца, уравнивается упругой силой изогнутого кантилевера. В случае сканирования образца в контактном режиме система обратной связи и корректировки сигнала поддерживает на первоначально заданном уровне величину изгиба кантилевера. При изменении топографии поверхности изгиб кантилевера увеличится, что приведет к возникновению тока рассогласования на фотодиоде и, как следствие, возникновению напряжения в петле обратной связи. Это напряжение, подаваемое на пьезоэлемент, с одной стороны, вызовет корректировку положения зонда, а с другой стороны, оно будет пропорционально высотному рельефу поверхности образца. Таким образом, сигнал в системе обратной связи напрямую отображает топографию исследуемой поверхности. Этот сигнал и используется для построения изображения. Еще одним вариантом получения изображения поверхности является использование режима переменной силы, но постоянного расстояния. В нем сканирование происходит при поддержании постоянной высоты между основанием зондового датчика и поверхностью, а для построения изображения используется сигнал изгиба кантилевера, который пропорционален силе, действующей на зонд со стороны поверхности. Таким образом, изображение, получаемое в режиме постоянной высоты, отражает пространственное распределение сил взаимодействия зонда с поверхностью. Недостатки контактного режима являются следствием самого главного условия метода: непосредственный контакт зонда и образца. Это может привести к быстрому износу или повреждению зонда. Но поскольку биологический образец гораздо более мягкий, он повреждается быст-



рее, что не позволяет получить объективную картину состояния биологического объекта. Очевидно, что при сканировании в контактном режиме биологических объектов необходимо выбирать кантилеверы с наименьшими коэффициентами жесткости.

Какие бы ограничения не накладывал контактный метод сканирования, в некоторых случаях он оказывается незаменим. Например, главный недостаток атомно-силовой микроскопии по сравнению с электронной микроскопией заключается в том, что атомно-силовой микроскоп позволяет получать изображение только поверхности клетки, а не ее внутренней структуры. Однако, если настроить прибор таким образом, что будет обеспечено сильное прижатие зонда к поверхности, в контактном режиме сканирования достаточно легко можно «прописать» цитоскелет исследуемой клетки и оценить его механическую прочность. Такая методика успешно применена к исследованию макрофагов и фибробластов.

Еще одним вариантом использования контактного режима сканирования является исследование фрикционных свойств поверхности. Для этого применяется режим регистрации латеральных сил (Lateral Force Measurement, LFM). В режиме LFM исследуются силы трения между поверхностью образца и зондом. Если в АСМ-сенсоре изображение поверхности формируется путем регистрации разностного сигнала между верхним и нижним секторами фотодетектора – отклонение по нормали к поверхности (top – bottom, T – B), то в LFM-сенсоре для получения карты распределения латеральных сил выделяется разностный сигнал левого и правого секторов фотодетектора (left – right, L – R). В процессе сканирования на зонд действует сила трения (F) со стороны поверхности:

$$F = \mu N, \quad (2)$$

где  $\mu$  – локальный коэффициент трения; N – сила реакции, действующая на зонд со стороны образца.

Кантилевер испытывает деформацию кручения в вертикальной плоскости, что приводит к току рассогласования на левом и правом секторах четырехсекционного фотодиода (рис. 22).

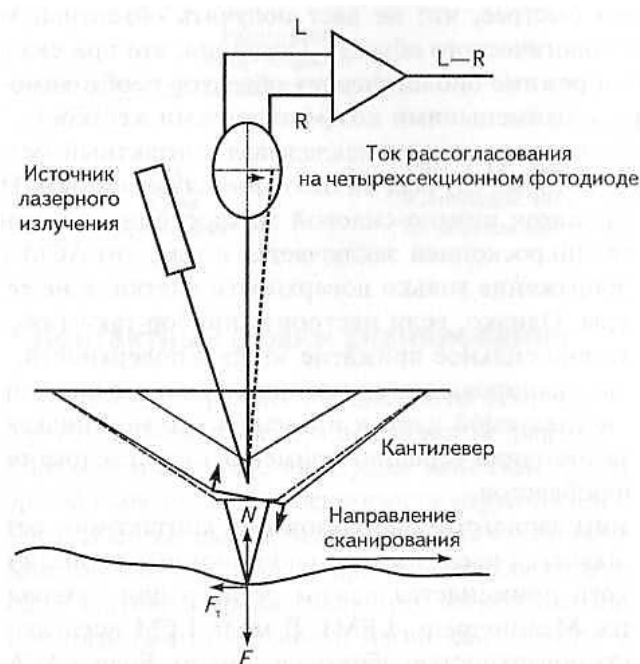
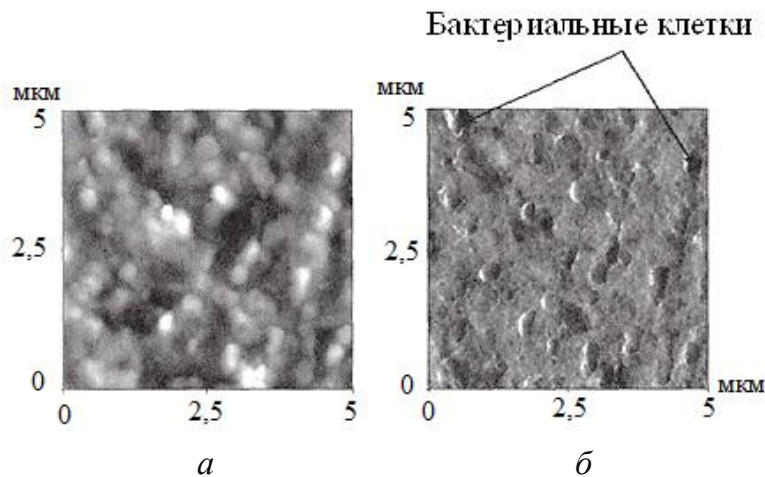


Рис. 22. Схематическое изображение работы режима регистрации латеральных сил

Чем больше коэффициент трения между зондом и участком поверхности, по которому движется зонд, тем больше изгиб кантилевера и тем больше разностный сигнал  $L - R$ . Таким образом, участки с большим коэффициентом трения на СЗМ-изображении выглядят более светлыми, а с меньшим – темными.

В некоторых случаях силы трения между зондом и образцом могут исказить топографический сигнал и приводить к образованию на АСМ-изображении артефактов. Для нивелирования этого нежелательного эффекта необходимо включать регистрацию LFM-сигнала как в прямом, так и в обратном направлении сканирования. Если контраст прямого и обратного изображений будет инверсным по отношению друг к другу, значит LFM-изображение отражает истинные локальные вариации фрикционных свойств поверхности. В биологических экспериментах благодаря приме-

нению режима латеральных сил удастся получить дополнительную информацию, неочевидную при использовании только топографической моды. Например, на рис. 23 показано, как благодаря применению LFM удалось выявить бактериальные клетки на шероховатой поверхности буккального эпителиоцита человека.



*Рис. 23.* Идентификация бактерий на поверхности буккального эпителиоцита:  
*а* – изображение поверхности буккального эпителиоцита, полученное в контактном режиме отображения топографии; *б* – изображение, полученное в LFM-режиме

Еще одним полезным методом изучения поверхности в АСМ является режим исследования микротвердости образца в нанометровом масштабе – режим *Z*-модуляции. В этом режиме на ось *Z* пьезопривода (сканера), кроме постоянного напряжения, обеспечивающего перемещение зонда по вертикали и отслеживание топографии, подается переменная составляющая с частотой около 5 кГц, т. е. значительно меньшей собственной резонансной частоты кантилевера. Вследствие этого зонд совершает колебания по вертикали с небольшой амплитудой (зонд как бы тестирует поверхность на податливость).

На зонд действует переменная сила, пропорциональная упругости материала образца, приводящая к отклонению кантилевера из равновесного положения и к возникновению переменной составляющей разностного сигнала на фотодиоде в вертикальном направлении (по нормали к поверх-

ности). Эта переменная составляющая определяется, детектируется и подается в канал Z-модуляции для формирования изображения карты микротвердости поверхности. Если поверхность образца мягкая, зонд проникает в нее без затруднений. В этом случае движение пьезокерамики по оси Z кантилевера будет иметь примерно одинаковую амплитуду, так что разностный сигнал на фотодиоде окажется мал (рис. 24, а). При сканировании поверхности твердого образца зонд будет испытывать сопротивление при внедрении в образец, и кантилевер при этом будет сильно изгибаться, что приведет к увеличению разностного сигнала на фотодиоде (рис. 24, б). Таким образом, изменение твердости поверхности вызовет изменение амплитуды.

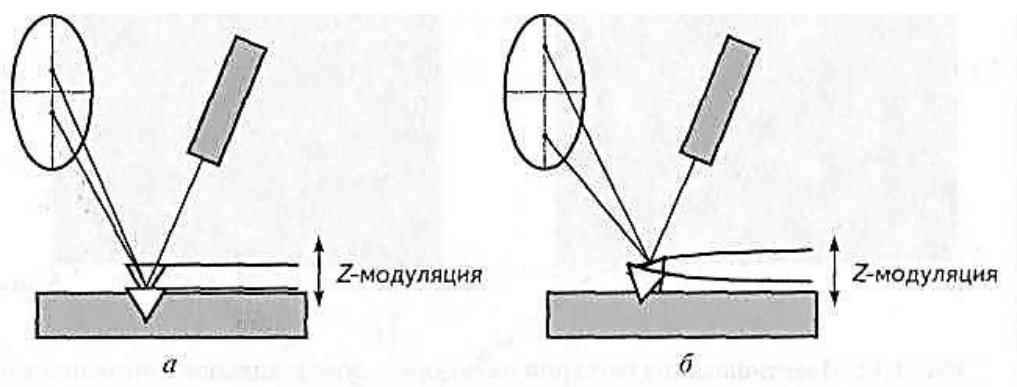


Рис. 24. Изменение положения кантилевера в режиме Z-модуляции:

а – проникновение в мягкий образец;

б – отклонение в случае твердого образца

Высокой амплитуде будет соответствовать более твердая поверхность (светлые участки), а низкой амплитуде – более мягкая поверхность (темные участки). Следовательно, по карте микротвердости можно различить локальный контраст, обусловленный разным прочностным составом образца (рис. 25).

В качестве примера использования режима Z-модуляции приведем исследование распределения доменной плотности и разной текстуры в липидном бислое (рис. 26). Режим Z-модуляции позволяет картировать бо-

лее мягкие (податливые) участки поверхности и более плотные (упругие) участки, не имеющие соответствия топографическому изображению.

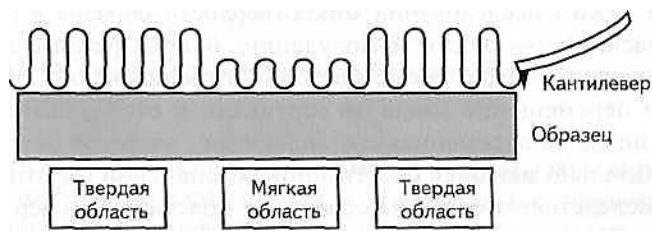


Рис. 25. Схема изменения амплитуды колебания кантилевера в зависимости от микротвердости поверхности образца

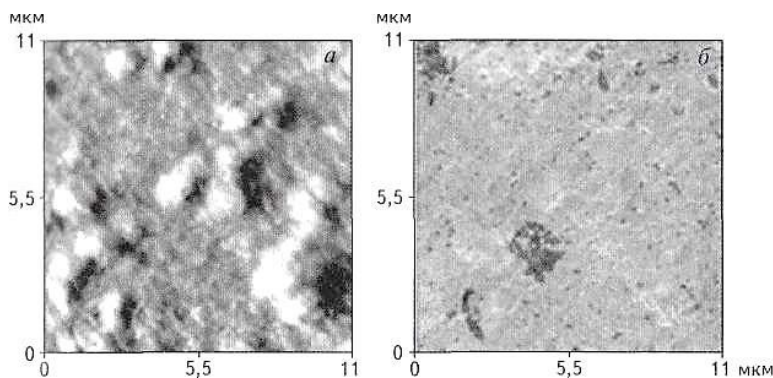


Рис. 26. Фрагмент мембраны эпителиальной клетки человека:  
а – стандартный рельеф поверхности, полученный из канала отображения топографии; б – режим микротвердости, полученный из канала Z-модуляции.

### *Колебательный (резонансный) режим сканирования*

В колебательном режиме сканирования кантилевер приводят в резонансные колебания, и взаимодействие с поверхностью вызывает изменение амплитуды, частоты или фазы резонансных колебаний. Для измерения силового взаимодействия зонда и образца в системе прерывистого контакта используется резонансная схема.

На пьезокерамику накладывается переменное напряжение, которое вызывает изменение ее размеров. Частоту этого дополнительного переменного напряжения выбирают равной собственной частоте колебаний кантилевера или немного больше (обычно она находится в пределах 150–250 кГц с амплитудой 10–50 нм). В свободном состоянии зонда (вдали от образца) частота и амплитуда колебаний кантилевера поддерживаются на постоян-

ном уровне. При приближении консоли к поверхности между зондом и образцом возникает дополнительный градиент сил, который приводит к сдвигу резонансной частоты кантилевера. Направление сдвига резонансной частоты будет зависеть от того, какие силы притяжения или отталкивания будут превалировать у поверхности образца (рис. 27, 28).

Градиент сил притяжения создает дополнительное напряжение на кантилевере, удерживающее его у поверхности. Это вызывает изгиб кантилевера по направлению к образцу (рис. 27, а) и сдвигает резонансную частоту кантилевера влево (рис. 27, б).

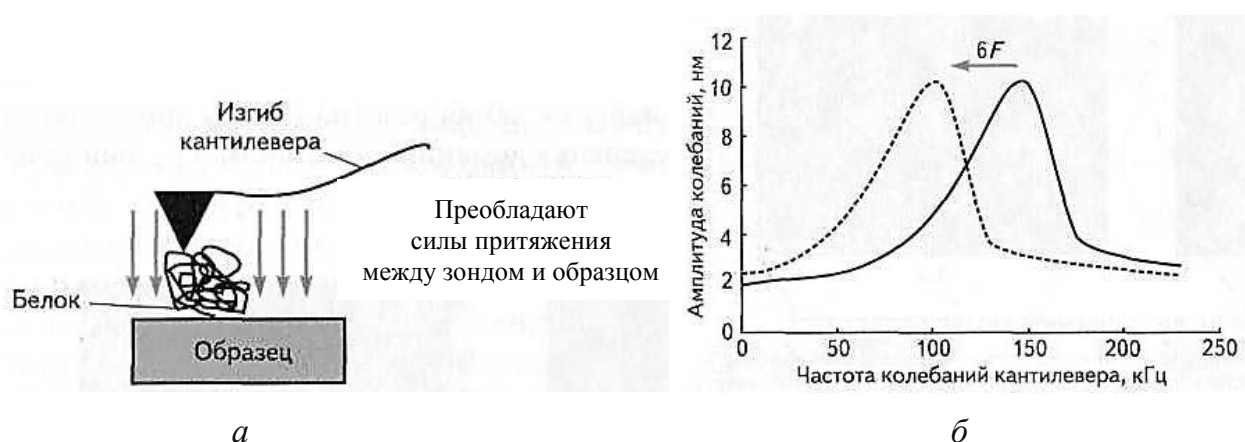


Рис. 27. Градиент сил притяжения

Градиент сил отталкивания (рис. 28) «отбрасывает» кантилевер от исследуемой поверхности. Это вызывает изгиб кантилевера по направлению от образца (рис. 28, а) и снижение резонансной частоты кантилевера со смещением вправо (рис. 28, б).

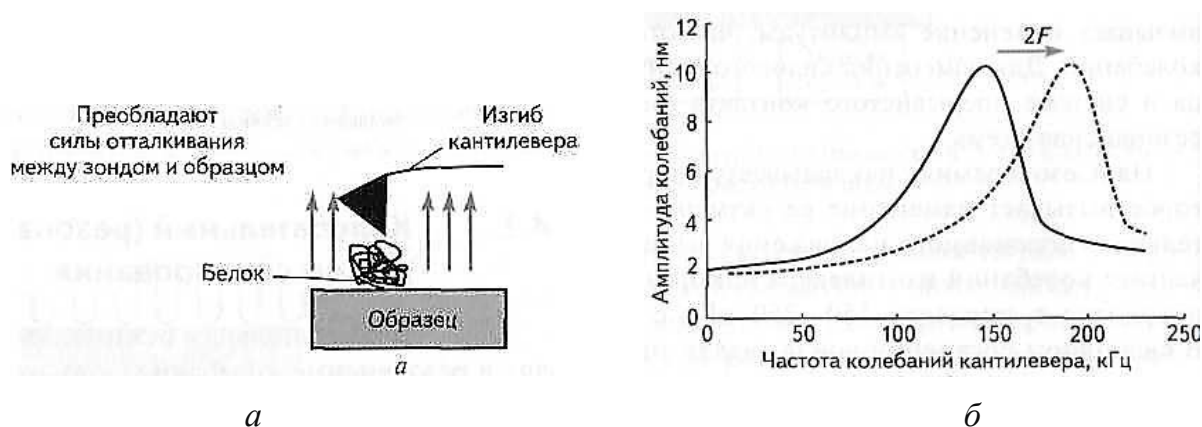


Рис. 28. Градиент сил отталкивания

Так как частота вынуждающих колебаний кантилевера поддерживается постоянной, то при приближении зонда к поверхности амплитуда колебаний свободного конца кантилевера уменьшается. Дополнительный вклад в демпфирование амплитуды вносят неупругие процессы при соударениях зонда и образца. Затухающая амплитуда колебаний регистрируется с помощью оптической системы и может быть определена по появлению тока рассогласования между верхними (top, T) и нижними (bottom, B) квадрантами четырехсекционного фотодиода (рис. 29).

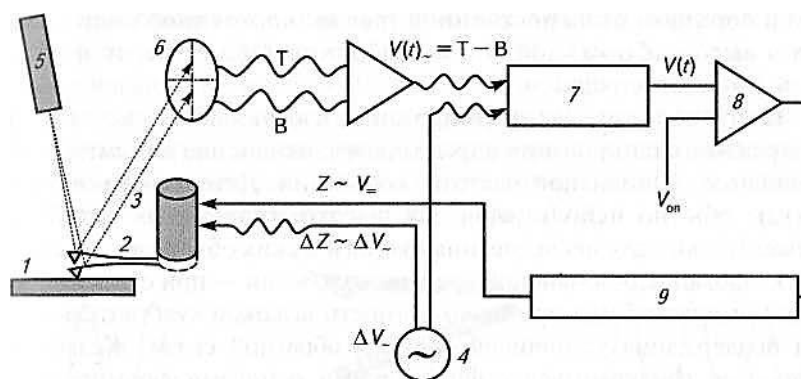


Рис. 29. Схема работы атомно-силового микроскопа в режиме прерывистого контакта:

- 1 – зонд; 2 – кантилевер; 3 – пьезоэлемент (сканер); 4 – источник переменного напряжения, создающий вынужденные колебания системы;
- 5 – источник лазерного излучения; 6 – четырехсекционный фотодиод;
- 7 – синхронный детектор; 8 – компаратор, сравнивающий полученный сигнал с опорным; 9 – цепь обратной связи

Далее с помощью синхронного детектора выделяется постоянный сигнал  $V(t)$ , пропорциональный амплитуде колебаний кантилевера при сканировании, согласованный с синхронным сигналом от генератора напряжений, подающимся на пьезокерамику, с тем, чтобы раскачивать кантилевер с его резонансной частотой. Компаратор сравнивает текущий сигнал в цепи с изначально заданным  $V_{on}$  и при его отклонении вырабатывает корректирующий сигнал  $V_{корр}$ . Взаимодействие зонда с образцом поддерживается постоянным за счет приближения и отвода зонда от по-



верхности системой обратной связи. Обратная связь отрабатывает изменение положения зонда, управляя пьезоприводом таким образом, чтобы сила между зондом и образцом была постоянной (режим постоянной силы). Сигнал о высоте  $Z$  в каждой точке изображения ( $x$ ,  $y$ ) берется из канала  $Z$ -пьезопривода.

Таким образом, для формирования изображения в колебательном режиме сканирования определяются: изменение амплитуды или изменение резонансной частоты колебаний. Детектирование амплитуды обычно используется для высокоамплитудных колебаний (нежелательно для исследования биологических объектов), тогда как детектирование резонансной частоты колебаний при относительно малой амплитуде или при необходимости высокой чувствительности – для поддержания устойчивой системы обратной связи. Более подробно физические основы формирования колебательных процессов в режиме прерывистого контакта и методы математической оценки возникающих колебаний описаны в книге В. Л. Миронова [8] и в электронном пособии И. В. Яминского [9].

Поскольку в колебательном режиме сканирования контакт зонда и образца минимизируется, можно использовать зонды с большим коэффициентом упругости. Однако в практике биологических исследований, как правило, слишком «жесткие» зонды не используются ни для контактных, ни для резонансных режимов сканирования. Поскольку колебательный режим сканирования позволяет существенно уменьшить воздействие зонда на образец, этот режим идеален для исследования биологических и медицинских объектов, которые обладают такими «нежелательными» для атомно-силовой микроскопии свойствами, как чрезмерная мягкость и «липкость». Колебательный режим следует выбирать и в случае сканирования образцов с высокой твердостью, например материалов для изготовления имплантов, поскольку в данном случае снижается риск затупления и поломки зонда.



### *Режим фазового контраста*

Одной из разновидностей резонансного режима сканирования является режим фазового контраста, который учитывает величину сдвига фаз. Если отдельные участки поверхности имеют различные свойства (упругие, адсорбционные и т. д.), то изображение будет иметь дополнительный контраст, зависящий от природы материала образца на различных участках. Он проявляется в изменении фазы колебаний зонда. При контакте с более плотным и жестким образцом происходит значительное демпфирование амплитуды колебаний зонда, но изменение фазы колебаний не происходит. В случае контакта с мягким (податливым) образцом, у которого выше адсорбционные свойства, снижается не только амплитуда колебаний зонда, но и возникает сдвиг фазы (рис. 30).

При контакте зонда с жесткой поверхностью амплитуда колебаний кантилевера уменьшается, но фаза остается неизменной (рис. 30, а); при сканировании поверхности с высокими адсорбционными свойствами происходит не только уменьшение амплитуды вынужденных колебаний кантилевера, но и сдвиг фазы (рис. 30, б).

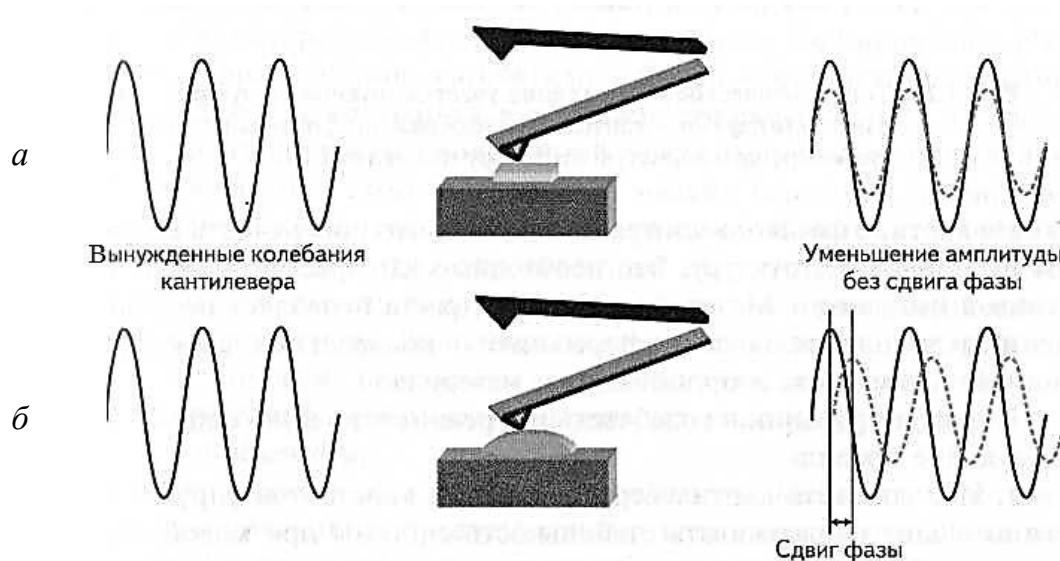


Рис. 30. Сдвиг фаз при сканировании образцов с жесткой поверхностью (а) и с поверхностью с высокой адсорбцией (б)

Поскольку детектирование фазы колебаний происходит одновременно с получением топографии поверхности, то из сравнения амплитудного и фазового изображений можно получить информацию о фазовом составе образца. Например, на рис. 31 представлены изображение поверхности титанового зубного импланта и изображение, снятое в режиме фазового контраста.

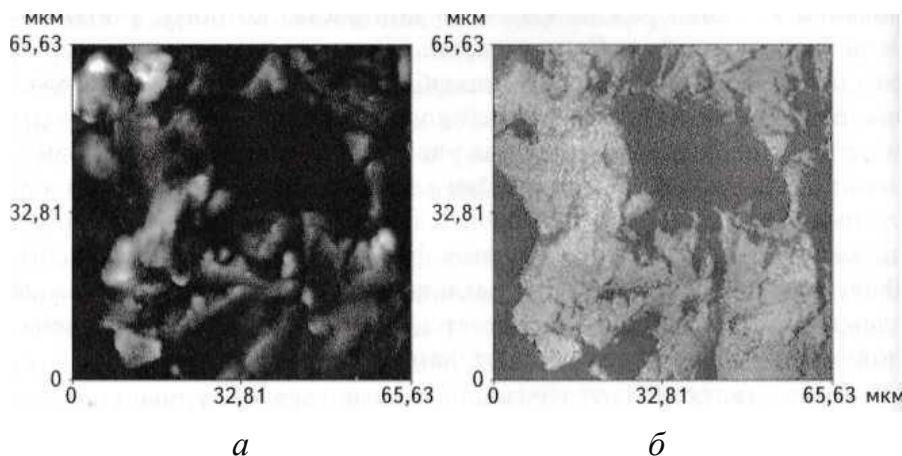


Рис. 31. Топографическое изображение участка титанового зубного импланта (а); фазово-контрастное изображение, позволившее идентифицировать пористую структуру импланта (б)

На картине фазового контраста заметно, что поверхность титана имеет пористую структуру. Это необходимо для врастания костной ткани в имплант. Метод фазового контраста позволяет получать ценную дополнительную информацию о контрастных свойствах многих, в том числе и органических, материалов.

При сканировании в колебательных режимах полезно соблюдать следующие правила.

1. Использовать кантилеверы с высокой константой упругости, что позволит поддерживать стабильность системы при малой возбуждающей амплитуде.

2. Подводимое к системе напряжение не должно сильно увеличивать амплитуду колебаний зонда – в идеале амплитуда колебаний должна поддерживаться на уровне 10 нм.

3. Частота вынуждающих колебаний должна быть приблизительно на 100 Гц выше, чем резонансная частота кантилевера. Это гарантирует своевременный отклик системы на затухание амплитуды колебаний при приближении зонда к поверхности.

4. Диапазон сканирования должен быть небольшим для возможного уменьшения перепада высот на всей области сканирования. Кроме того, уменьшение диапазона сканирования предоставляет возможность снижать скорость движения зонда по поверхности, что делает систему более стабильной и позволяет идентифицировать даже минимальные детали на поверхности анализируемого объекта.

### *Формирование АСМ-изображений*

При сканировании зонд пошагово движется по исследуемой поверхности. Информация, полученная от такого прохода, хранится в виде двумерной матрицы (массива), которая может быть трансформирована как в 2D-, так и в 3D-изображение. Конечно, для биологических исследований удобнее использовать 3D-изображения. Физический смысл чисел матрицы определяется той величиной, которая оцифровывалась в процессе сканирования. Например, это величина изгиба кантилевера в контактном режиме или амплитуда колебаний в резонансном режиме и т. д. Далее производится перевод полученной матрицы в вид, удобный для восприятия. Для этого полученный массив переводят в ранги от минимального до максимального значения. Каждому значению ставится в соответствие определенный цвет радужной (видимой) шкалы, т. е. высота каждой точки передается определенным цветом (или яркостью). Дополнительные преимущества дают моделирование боковой, точечной и других способов подсветки, поворот получаемого изображения на разные углы и другие варианты работы с объектом.

Программное обеспечение, разрабатываемое для атомно-силовых микроскопов, предусматривает возможность последующей коррекции получаемых изображений (например, вычитание среднего наклона поверхности, медианную фильтрацию, усреднение, повышение контрастности за счет боковой подсветки и т. д.). Кроме того, использование 3D-изображений, полученных методом АСМ, позволяет определять линейные параметры (длину, ширину, высоту) биологических объектов с высокой точностью. Подробно варианты обработки изображений можно изучить по книгам В. Л. Миронова [8] и С. Н. Плескова [10].

### **2.3. ОСОБЕННОСТИ СКАНИРОВАНИЯ В ЖИДКОСТИ**

Одним из основных физических преимуществ метода атомно-силовой микроскопии является то, что она не имеет ограничений по средам, в которых можно исследовать образцы. Объекты рассматривают и в вакууме, и в воздушной среде, и в жидкости. Поскольку основным условием изучения нативной структуры белков, других органических молекул и тем более клеток является пребывание в физиологических растворах, то атомно-силовая микроскопия является практически единственным методом, который при сохранении высокой степени пространственного разрешения предоставляет такую возможность. Взаимодействие между зондом и образцом в воздушной среде определяется в основном следующими близкодействующими силами.

1. Основной вклад во взаимодействие зонда и образца вносят вандер-ваальсовы силы трех типов:

- постоянное диполь-дипольное притяжение;
- силы притяжения в системе «постоянный диполь – индуцированный диполь»;
- взаимодействие между мгновенным диполем и индуцированным диполем, которое называется также дисперсионным притяжением или лондоновскими силами;

2. Большое влияние на взаимодействие оказывают свойства сканируемой поверхности. В частности, если и поверхность, и зонд неполярны, то между ними возникают силы гидрофобного взаимодействия, которые уменьшаются с увеличением расстояния «зонд – образец».

3. Биологические поверхности, как и многие другие, на воздухе покрыты тонкой пленкой, адсорбированной на поверхности воды. Это обуславливает возникновение менисковых или капиллярных «удерживающих» сил.

4. В случае, если и зонд, и поверхность заряжены, между ними могут возникать истинные ионные взаимодействия.

Характер и силу взаимодействий между зондом и образцом можно изменять, а поскольку изменять биологический образец нецелесообразно, то изменяют геометрию и химический состав зонда. Например, можно менять угол при вершине зонда, изменять его длину, формировать дополнительные покрытия и т. д.

При сканировании в жидкости, особенно в солевых растворах, характер взаимодействия зонда и образца существенно изменяется, в частности полностью снимается влияние капиллярных сил, а выбор резонансных режимов сканирования минимизирует действие латеральных сил. С этой точки зрения воздействие на биологический образец является более щадящим.

На первый план выходят водородные связи, возникающие между атомом водорода и любым электроотрицательным атомом. В случае исследования биологических объектов в качестве электроотрицательных элементов фигурируют в основном кислород, азот и сера.

Поскольку для поддержания нативности структуры сканирование обычно проводится в растворах (в простейшем случае в 0,9 % NaCl), большое значение приобретают силы ионного взаимодействия.

Влияние на гидродинамическую систему оказывают вязкое смачивание и компрессия. Вязкое смачивание увеличивает эффективную массу

зонда, что отражается на характере резонансных колебаний: частота колебаний уменьшается, а резонансный пик уширяется. Все это отрицательно сказывается на добротности резонансного контура  $Q$ , который рассчитывается из соотношения

$$Q = \frac{\omega_0}{\Delta\Omega}, \quad (3)$$

где  $Q$  – добротность резонансного контура;  $\omega_0$  – резонансная частота;  $\Delta\Omega$  – ширина резонансного пика.

Поскольку  $\omega_0$  в жидкости значительно уменьшается, а  $\Delta\Omega$ , напротив, возрастает, то очевидно, что добротность резонансного контура, которая отвечает за чувствительность системы и скорость ответа обратной связи, существенно снижается. Действительно, если для сканирования в воздушной среде  $Q$  составляет порядка 100, то в жидкости  $Q$  падает до 2–3. Критичное снижение добротности резонансного контура приводит к тому, что система обратной связи не успевает обрабатывать сигнал и проводить своевременную коррекцию колебаний. Результатом такого запаздывания может являться разрушение клеток или других биологических образцов. При дальнейшем снижении  $Q$  повреждается и зонд.

Возникновение компрессионных/отталкивающих сил обусловлено другим явлением. Как правило, радиус закругления вершины зонда при исследовании живых клеток должен быть достаточно большим. При движении зонда к поверхности клетки он начинает сжимать жидкость на локальном участке поверхности между зондом и клеткой, однако жидкости плохо сжимаемы, поэтому на зонд начинают действовать отталкивающие силы (рис. 32, 33).

Погружение зонда в жидкость должно быть достаточно медленным, чтобы снизить силу компрессии (сжатия) жидкости между поверхностью зонда и поверхностью образца (рис. 32). При нарастании компрессии сила

отталкивания со стороны жидкости также возрастает, внося коррективы во взаимодействие зонда и образца.

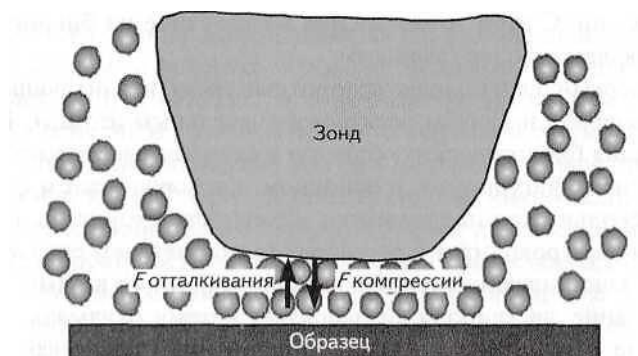


Рис. 32. Результат сжатия жидкости в месте контакта зонда и образца



Рис. 33. Кривая силы, демонстрирующая резкое возрастание вязкости жидкости при приближении зонда к образцу

Дополнительные проблемы создают резонансные режимы сканирования, поскольку колебания зонда вызывают появление нежелательных акустических волн между зондом и поверхностью биологического объекта. Дело в том, что упругая клетка отражает волны, которые приходят на нее из-за колебаний кантилевера, в то же время зонд, приближаясь к поверхности клетки, изменяет амплитудно-частотные характеристики колебаний кантилевера. Поэтому волны, отраженные от клетки, и волны, образующиеся от колебаний кантилевера на новой частоте, накладываются друг на друга. Это порождает новые нежелательные возбуждения в регистрирующей системе, снижающие чувствительность при приближении к образцу.

Поскольку наблюдения за биологическими объектами ведутся в условиях, обеспечивающих максимальную сохранность белков или клеток, то температура в термостатируемой ячейке, особенно при длительных наблюдениях, поддерживается на уровне 37 °С. Но подъем температуры вызывает появление температурных флуктуаций, которые вносят дополнительный шум в систему, рассогласовывая основной сигнал.

Неровности биологических поверхностей вызывают асимметрию жидкости, которая отражается на взаимодействии в системе «зонд – жидкость – биологический объект» и может вызвать появление артефактов. Определенную коррекцию вносит и размер молекул жидкости. Например, резонансная частота кантилевера значительно смещается, если наблюдение происходит не в воде, а в водно-спиртовом растворе.

Обычно с целью сохранности биологических проб их исследование в жидкости проводится с использованием колебательных режимов сканирования. Но в то же время сканирование в жидкости сопряжено с появлением дополнительных трудностей. В частности, возникают нежелательные дополнительные вибрации, которые вносят возмущения в стационарные колебания кантилевера. Жидкость оказывает сопротивление колебаниям кантилевера, так как это гораздо более вязкая среда, чем воздух. Колебательная система становится более чувствительной к внешним воздействиям из-за резкого снижения добротности резонансного контура  $Q$ .

При исследовании в воздушной среде выбираются кантилеверы, имеющие при колебаниях узкий (острый) резонансный пик. Это повышает  $Q$ , следствием чего является увеличение чувствительности системы и уменьшение силы взаимодействия с образцом. Однако в жидкости из-за значительного увеличения вязкости среды и сопротивления колебаниям кантилевера чувствительность системы существенно снижается, а колебания кантилевера становятся нестабильными. Одним из вариантов преодо-



ления этой проблемы является добавление в систему обратной связи дополнительного Q-контроллера, который отслеживает сдвиг фазы вынужденных колебаний кантилевера, усиливает сигнал расхождения фаз и подает корректирующее напряжение на осциллятор для возвращения фазы колебаний пьезоэлемента к исходному уровню. Конструкция Q-контроллера предусматривает, что первоначальная коррекция фазы колебаний происходит, когда зонд не взаимодействует с поверхностью. При сканировании в рабочем режиме сдвиг фаз с одновременным уменьшением амплитуды колебаний наблюдается вблизи поверхности образца, сигнал считается полезным и не корректируется в системе обратной связи. Осцилляция кантилевера в жидкости обычно порождает появление в колебательном спектре дополнительных (ложных) пиков, которые иногда столь выражены, что маскируют истинный резонансный пик. В этом случае применение Q-контроллера помогает дифференцировать спектр и выбрать истинный резонансный пик. Однако Q-контроллер применяется только в том случае, если детектируется амплитуда колебаний. Если в качестве опорного сигнала выбирается изменение частоты колебаний, то применяется другое контролирующее устройство – узкополосный детектор, использующий высокостабильную параметрическую петлю обратной связи. В нем изменение частоты осцилляции детектируется как изменение фазы осцилляции, а далее узкополосный детектор работает как стандартный Q-контроллер.

Таким образом, даже работая в жидкости, можно получать изображения биологических объектов с высоким разрешением. Для сохранения качества получаемого сигнала необходимо значительно снижать амплитуду колебаний кантилевера (она должна быть меньше 1 нм) и уменьшать уровень шума сенсорного элемента (основной вклад в него вносят температурные флуктуации). Значит коррекцию добротности можно проводить не только внося конструктивные поправки в систему обратной связи, но

и изменяя механические узлы системы, например, варьируя форму и размеры кантилеверов или выбирая кварцевые сенсоры с большей массой, чем эффективная масса жидкости.

Еще одна проблема, возникающая при сканировании в жидкости, связана с тем, что при колебаниях кантилевера в жидкости индуцируются колебания самой жидкости (акустические колебания). Эти волны интерферируют с собственным колебанием кантилевера, вызывая появление дополнительных резонансных пиков, снижающих общую чувствительность системы. Поэтому и сама конструкция жидкостной ячейки должна быть такой, чтобы свести к минимуму возможность «наведенных» колебаний жидкости. При сканировании в жидкости в резонансных режимах биологических объектов не меньшую значимость приобретает и значительный перепад высот. Сканирование в этом случае, например, при переходе из области распластанной цитоплазмы в область ядра сопровождается появлением неустойчивости колебаний или даже приводит к полному затуханию осцилляции. Это может привести к разрушению биологического образца. Для предотвращения этого явления частоту вынужденных колебаний немного сдвигают относительно резонансной частоты кантилевера, что приводит к своевременному отклику системы обратной связи на резкий перепад высот, но в то же время качество изображения падает и некоторые самые мелкие детали оказываются неотображенными.

Однако, несмотря на все трудности и проблемы, которые вызывает наблюдение за биологическими объектами в жидкости, метод быстро перешел в разряд стандартных, и на сегодняшний момент практически нет биологических или медицинских образцов, для которых было бы введено строгое ограничение на наблюдение в физиологичной среде. В настоящее время разрешены проблемы, связанные даже с высокоскоростными наблюдениями за живыми объектами методом атомно-силовой микроскопии. Актуаль-

ной задачей являются такие видоизменения методики, которые позволили бы рассматривать локальные изменения зарядов на поверхности в ходе метаболизма и при воздействии внешних факторов. Тем не менее интересным направлением является изучение гидрофильно-гидрофобных взаимодействий в биологических образцах.

### **Контрольные вопросы**

1. Факторы выбора режимов сканирования.
2. Причины использования пьезоэлементов в сканерах зондовых микроскопов.
3. Роль обратной связи в СЗМ, факторы выбора параметров обратной связи для своевременной коррекции сигнала.
4. Факторы, влияющие на выбор кантилевера зондового микроскопа.
5. Достоинства и недостатки сканирования в жидкости.
6. Основные этапы пробоподготовки.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАДАНИЯ

В соответствии с учебным планом во время изучения дисциплин «Биомедицинские нанотехнологии» и «Зондовая микроскопия» у обучающихся предусмотрено проведение практических занятий и выполнение в течение семестра домашнего задания. Практические задания способствуют приобретению навыков исследования наноразмерных биологических объектов и прочному усвоению теоретического материала.

1. Исследовать морфологические параметры дрожжей штамма (по вариантам) методом атомно-силовой микроскопии на зондовом микроскопе NTEGRA. Обработать экспериментальные результаты. Для этого открыть отсканированное СЗМ-изображение \_\_\_\_\_ в программе Gwyddion:

- провести обработку изображения:
  - вычесть плоскость 1-го порядка;
  - убрать горизонтальные царапины;
- рассчитать количество целых и поврежденных клеток на участке  $30 \times 30$  мкм.

Для анализа полученных изображений провести количественную характеристику СЗМ-изображений. Полученные результаты сопоставить с литературными данными. Сделать вывод о состоянии объекта исследования.

2. Наглядно представить размер и массу наночастиц помогают пропорции. Наночастица диаметром 10 нм во столько же раз меньше  $X$ , во сколько  $X$  меньше Земли (диаметр Земли – 12 700 км). Найдите диаметр  $X$ . Предложите свои варианты объектов  $X$  из повседневной жизни.

3. Наноалмаз диаметром 5 нм весит  $2.3 \cdot 10^{-19}$  г. Он во столько же раз легче  $Y$ , во сколько  $Y$  легче Земли (масса Земли –  $5.97 \cdot 10^{24}$  кг). Найдите массу  $Y$ . Предложите свои варианты объектов  $Y$  из повседневной жизни.

4. Россия – страна с самой большой территорией, ее площадь оценивается в 17,1 млн км<sup>2</sup>. Чему равна масса графена такой же площади? Если весь этот графен получен из графитового куба, чему равна сторона куба? Необходимые справочные данные найдите самостоятельно.

5. Наночастицы золота (плотность 19.3 г/см<sup>3</sup>) имеют форму шара с диаметром 4 нм. Рассчитайте удельную поверхность наночастиц (отношение площади поверхности к массе, м<sup>2</sup>/г).

6. Наночастицы родия (плотность 12.4 г/см<sup>3</sup>) имеют форму куба со стороной 20 нм. Рассчитайте удельную поверхность наночастиц (отношение площади поверхности к массе, м<sup>2</sup>/г).

7. Исследовать морфологические параметры дрожжей штамма (по вариантам) методом атомно-силовой микроскопии на зондовом микроскопе NTEGRA. Обработать экспериментальные результаты. Для этого необходимо открыть отсканированное СЗМ-изображение \_\_\_\_\_ в программе Gwyddion:

- 1) определить средний диаметр клеток;
- 2) определить по сечению вдоль линии среднюю высоту клеток, максимальную и минимальную высоту клеток;
- 3) определить вдоль линии наибольший и наименьший диаметры клеток.

Для анализа полученных изображений провести количественную характеристику СЗМ-изображений. Полученные размеры клеток сопоставить с литературными данными. Сделать вывод о состоянии объекта исследования.

8. В молекуле фуллерена C<sub>76</sub> каждый атом углерода связан с тремя другими атомами и имеет валентность IV. Сколько двойных и одинарных связей имеется в молекуле C<sub>76</sub>? Ответ обоснуйте.

9. В нанотехнологиях используются объекты, у которых хотя бы один из размеров находится в диапазоне 1–100 нм. Считая, что кристалл процессора плоский и имеет размер  $1,5 \times 1,5$  см, а на нем вплотную друг к другу размещены квадратные транзисторы, найдите, какое максимально возможное число их можно разместить с помощью нанотехнологий. Современный процессор такого же размера содержит  $1.125 \cdot 10^9$  транзисторов. Во сколько раз необходимо увеличить число транзисторов в процессоре?

10. Вычислите

$$b - \frac{\frac{(d-a)^a}{c^a} - e^a}{1 - b^a},$$

если известно, что  $a$  – порядковый номер углерода в таблице Менделеева;

$b$  – относительная атомная масса углерода;

$c$  – относительная атомная масса радиоуглерода;

$d$  – количество атомов углерода в наименьшем из теоретически возможных фуллеренов;

$e$  – количество пятиугольников в фуллерене  $C_{60}$ .

Как связан полученный результат с нанотехнологией?

11. Исследовать морфологические параметры дрожжей штамма (по вариантам) методом атомно-силовой микроскопии на зондовом микроскопе NTEGRA. Обработать экспериментальные результаты. Для этого необходимо открыть отсканированное СЗМ-изображение \_\_\_\_\_ в программе Gwyddion:

- отсканированное СЗМ-изображение представить трехмерным (3D) и сделать описание поверхности клеток;
- используя градиент цвета, определить количество уровней, которые занимают клетки. Показать клетки верхнего уровня, проанализировать соотношение числа клеток по уровням.

Для анализа полученных изображений провести количественную характеристику СЗМ-изображений. По 3D-визуализации проанализировать особенности рельефа поверхности и сравнить их с литературными данными (если такие есть). Какие формы дрожжей характерны для вашего образца? Чем определяются форма и размеры клеток?

12. Напылённая на подложку тонкая нанопленка золота при нагревании плавится и распадается на капли, которые при последующем охлаждении застывают в виде сферических нанокластеров.

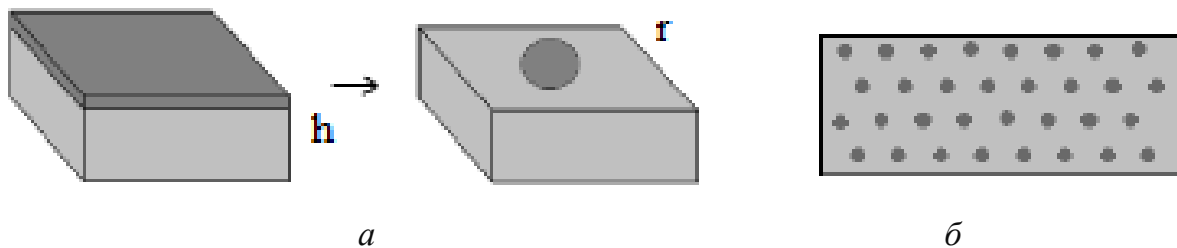


Рис. 1

- Сколько капель ( $N$ ) образуется на квадратной подложке размером 100 мкм, если на  $1 \text{ нм}^2$  приходится  $1.25 \cdot 10^{-4}$  капель (с)?
- Каково расстояние между центрами кластеров, если они расположены друг относительно друга как на рис 1, б.
- Найдите радиус полученных кластеров  $r$  (нм), если толщина исходной пленки равна 32 нм.

13. Углеродную нанотрубку (УНТ) можно задать одной парой шестиугольников на расчерченном листе графена: для этого необходимо через их центры (рис. 2, точки О и Х, взаимное расположение которых в «скошенной» системе координат задается двумя натуральными числами  $n$  и  $m$ ) прочертить перпендикулярно отрезку ОХ линии разреза, вырезать по ним полоску графена и затем соединить ее края.

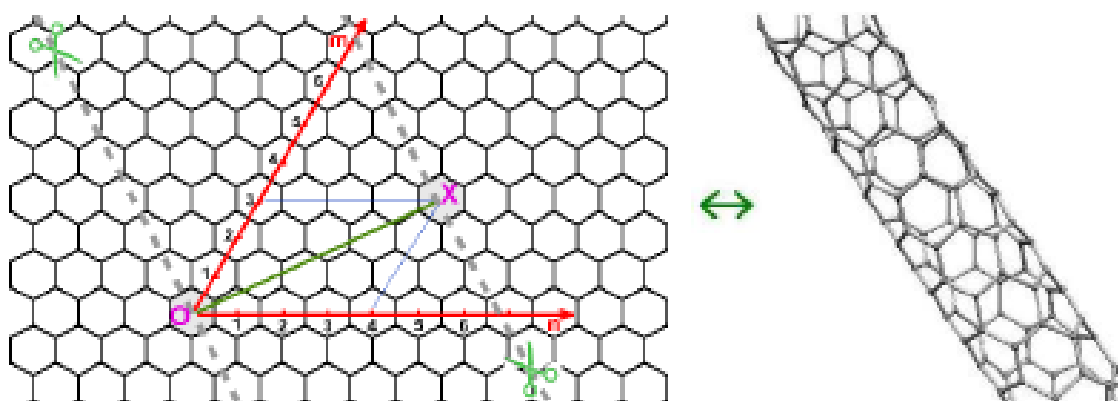
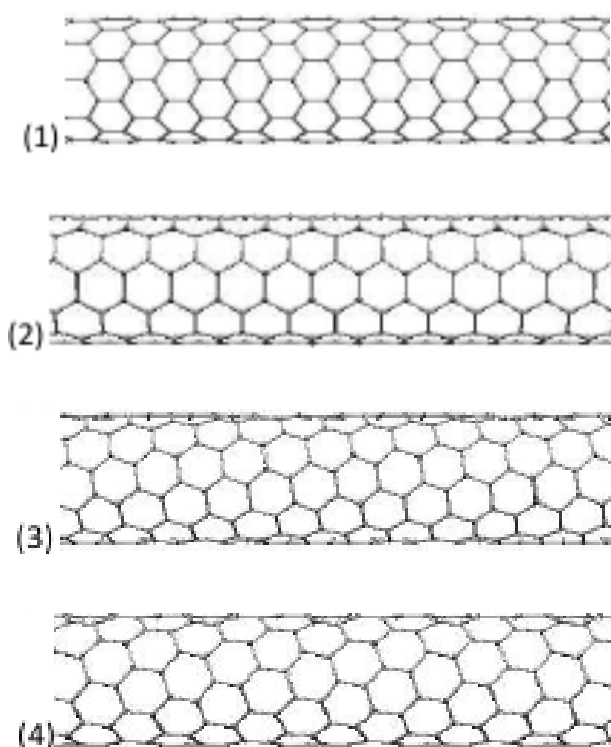


Рис. 2

Ниже приведен пример для «выкройки» трубки с  $n = 4$  и  $m = 3$ .



- Сопоставить изображенным на рис. 2 моделям УНТ пары координат  $n$ ,  $m$  из следующих возможных вариантов: (8, 2), (2, 8), (5, 5), (10, 0), (4, 7) и (7, 4).
- Одинаковые или разные УНТ задаются парами координат (10, 0) и (0, 10), а также (4, 7) и (7, 4)? Если разные, то поясните, чем они отличаются.

Для решения задачи необходимо из расчерченного листа графена сделать модель УНТ, как указано на рис. 2.

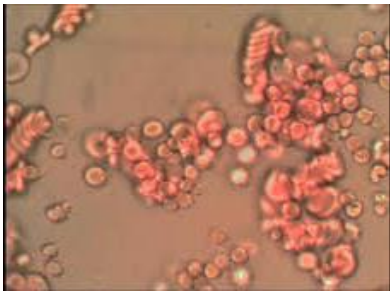
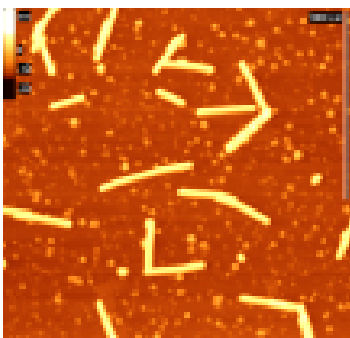


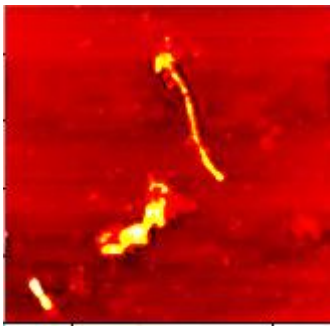
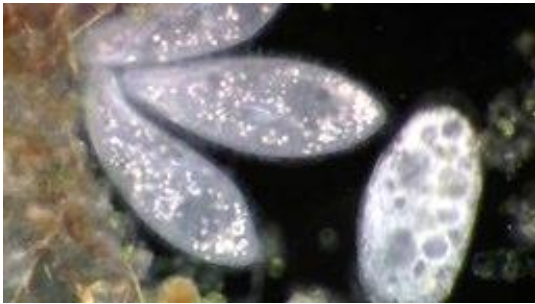
14. Исследовать морфологические параметры дрожжей штамма (по вариантам) методом атомно-силовой микроскопии на зондовом микроскопе NTEGRA. Обработать экспериментальные результаты. Для этого необходимо открыть отсканированное СЗМ-изображение \_\_\_\_\_ в программе Gwyddion:

- определить порядковые величины:
  - максимальную высоту пика,
  - максимальную глубину впадины,
  - площадь поверхности;
- по «статистическим функциям» определить распределение высоты клеток.

Для анализа полученных изображений провести количественную характеристику СЗМ-изображений. Полученные размеры высоты клеток сопоставить с литературными данными. Сделать вывод о состоянии объекта исследования.

15. Установить соответствие между названием микроорганизмов и их изображением под микроскопом.

1		а) кисломолочные бактерии
2		б) дрожжеподобные грибы

3		в) вирус табачной мозаики
4		—

16. Установить, к какому надцарству относятся микроорганизмы.

1) прокариоты	а) вирусы
2) эукариоты	б) бактерии
—	в) амёба

17. Сопоставить понятия и их определения.

1. Самовоспроизведение	а) обязательный обмен энергией, веществом или информацией с окружающей средой
2. Открытость	б) свойство молекулы не совмещаться в пространстве со своим зеркальным отражением
3. Гомеостаз	в) способность живого организма, (клетки) к образованию себе подобного
4. Хиральность	г) способность открытой системы сохранять постоянство своего внутреннего состояния
5. Асимметрия молекул	—

18. Расположить составляющие биологической системы в порядке усложнения: мышечная ткань; лейцин (аминокислота); углерод; мембрана; вирус; белки (протеины).

19. Выбрать из ниже представленных элементы, входящие в системно-иерархическую организацию клетки: органеллы, ядро, растения, рибосомы, ткани, эукариоты, органы, цитоплазма, грибы, организмы.

20. Установить соответствие между свойством живых организмов и его примером.

1. Самовоспроизведение	а) обмен веществ и энергии
2. Открытость	б) правозакрученная двойная спираль ДНК
3. Развитие	в) образование половых клеток
4. Хиральность	г) гомеостаз
	д) онтогенез
	е) левовращающиеся аминокислоты в составе белков
	ж) фотосинтез
	з) вегетативное размножение растений
	и) филогенез
	к) дыхание

21. Одним из уникальных свойств углерода, определяющим его место в составе живых систем, является... (продолжите предложение одной из фраз, приведенной ниже):

1) ...широкая распространенность в земных условиях. 2) ...его место в Периодической системе элементов Менделеева, связанное с зарядом атома. 3) ...способность образовывать многообразные линейные и разветвленные структуры. 4) ...способность вступать во взаимодействия с кислородом.

Что, в свою очередь, определяет... (укажите не менее двух вариантов ответа):

- а) возможность образования высокомолекулярных соединений;
- б) химическую активность органических соединений;
- в) многообразие органических веществ;
- д) перенос питательных веществ в организме.

22. Наночастицы серебра обладают противовирусным действием. Можно ли блокировать вирусы гриппа, изображенные на фотографии, полученной на электронном микроскопе (рис. 3), выстроив из наночастиц серебра барьер высотой  $h = 10$  нм и толщиной  $d = 10$  нм? Для строительства барьера имеется  $m = 10^{-6}$  нг серебра (плотность  $10,5$  г/см<sup>3</sup>). Барьер строить вдоль линии, обозначенной на рис. 3.

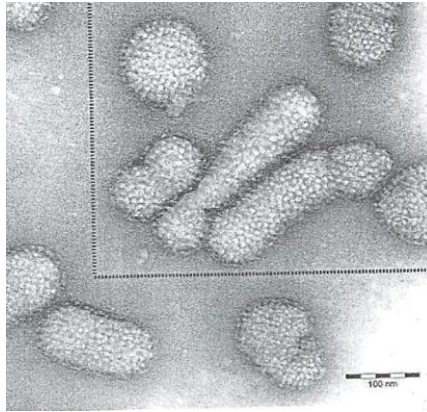


Рис. 3

23. Бактерии применяются для охраны окружающей среды. На рисунке показаны разные водоемы с необычным цветом воды. Это вовсе не грязь, а результат жизнедеятельности бактерий! Эти бактерии окисляют ионы определенного металла из воды, и при взаимодействии с кислородом он превращается в нерастворимое соединение, которое определяет цвет водоема.



- О каких бактериях идет речь? Какой металл они окисляют?
- Какое соединение, образующееся в результате деятельности бактерий, обуславливает цвет водоема?
- В результате промышленной деятельности человека происходит загрязнение водоемов и почв тяжелыми металлами. Какими? Какими способами металл может попасть в окружающую среду? Чем он вреден для живых организмов?

24. В известной книге Яна Ларри «Необыкновенные приключения Карика и Вали» рассказывается о невероятных событиях, которые произошли с братом и сестрой Кариком и Валею и профессором Иваном Гермогеновичем после того, как они выпили уменьшающую жидкость и стали меньше муравья. Исходя из описаний в книге, можно сделать вывод, что размер детей после уменьшения стал 3–4 мм.

- Подумайте и обоснуйте, возможно ли подобное уменьшение человеческого организма с полным сохранением всех функций органов и мозговой деятельности в случаях, когда:

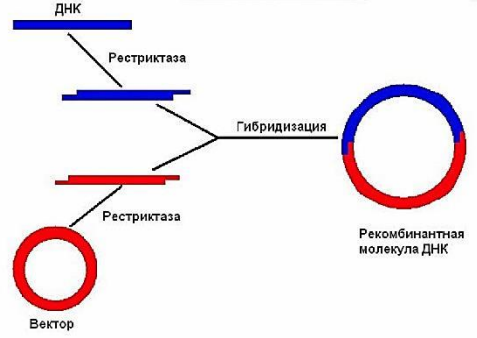


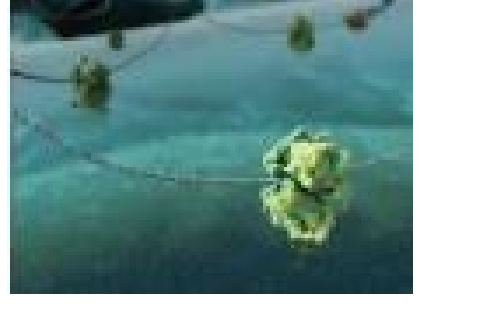
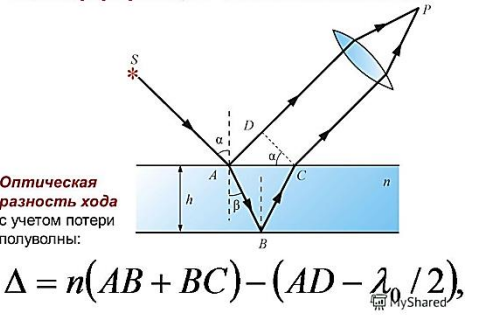

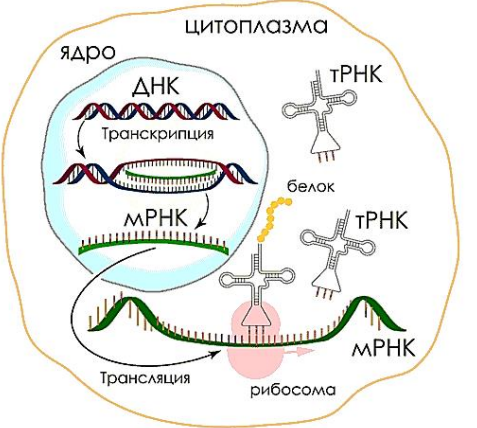
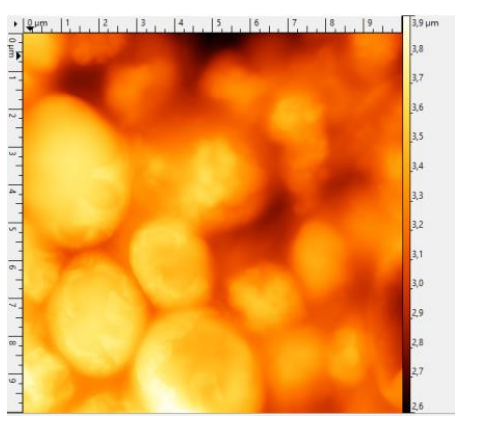

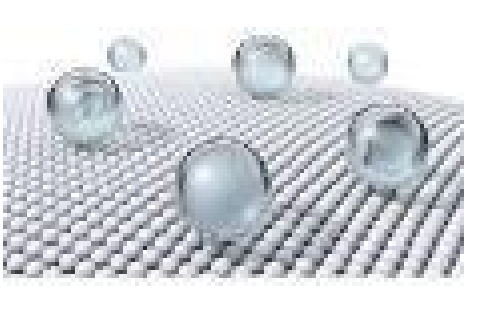
– все клетки уменьшаются равномерно по мере уменьшения всего тела, при этом число клеток не меняется;

– уменьшение размеров тела происходит частично за счет уменьшения размеров тела и частично за счет уменьшения числа клеток.

- При обосновании ответов следует учитывать, что размеры самих молекул и атомов изменяться не могут.

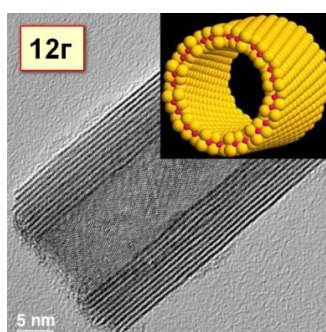
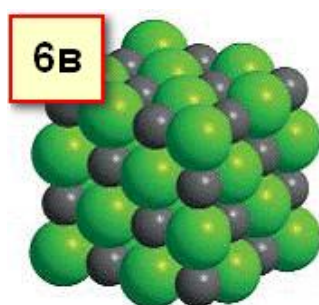
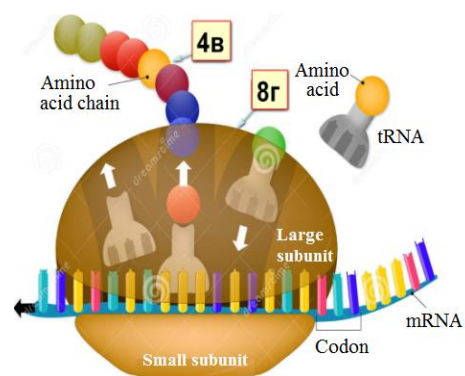
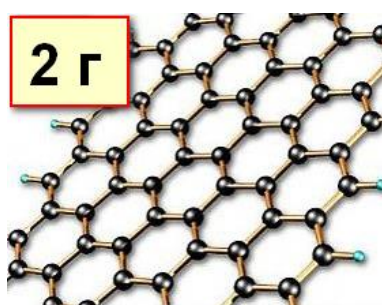
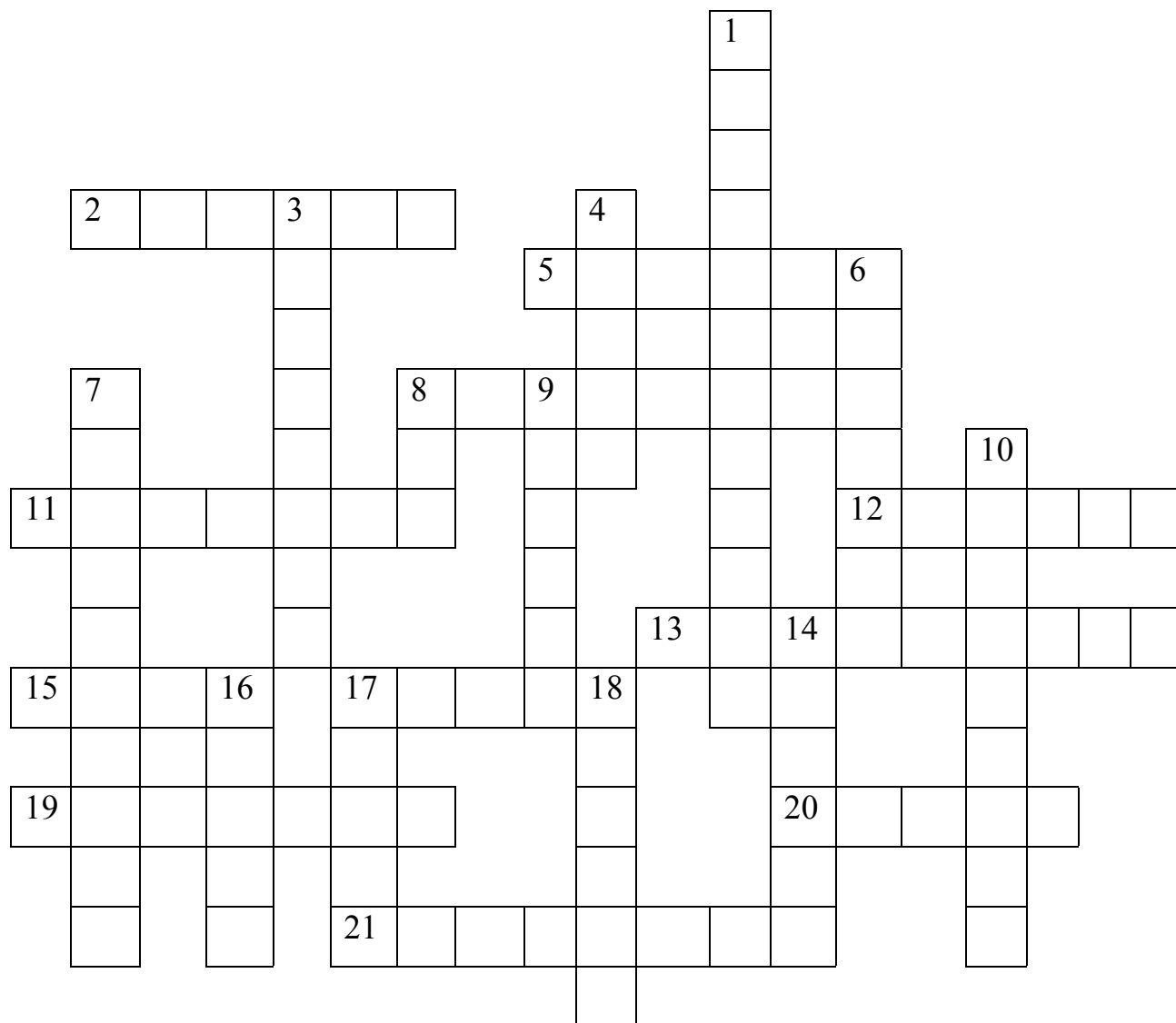
- Назовите одно или несколько самых маленьких многоклеточных животных, существующих на нашей планете. За счет чего происходит уменьшение размера клеток?

25. Для каждой картинки из левой колонки найдите пару из правой колонки (только одну картинку). Объясните связь между ними.

1		А	
2		Б	
3	 <p>Оптическая разность хода с учетом потери половинны:</p> $\Delta = n(AB + BC) - (AD - \lambda_0 / 2),$	В	
4		Г	
5		Д	



26. Заполните кроссворд.



### **По горизонтали**

2. Псевдодвумерная (2D) форма углерода (рис. 2г).
5. Искривление поверхности жидкости, например, возле стенки тонкого капилляра.
8. Клеточная бионаномашина (рис. 8г).
11. Химический элемент, важнейшая составная часть всех органических веществ в природе, способный образовывать многообразные линейные и разветвленные структуры.
12. Пример псевдоодномерной (1D) наноструктуры (рис. 12г).
13. Она диаметром менее 2 нм, в большом количестве есть у адсорбентов.
15. Кантилевер.
17. Острое заболевание, вызванное вирусом H5N1.
19. Катализатор в живой клетке.
20. Она может быть и причинно-следственная, и водородная, и ковалентная (рис. 20г).
21. Совокупность величин, пространственная разномерность которых исчисляется от  $10^{-8}$  до  $10^{-16}$  см.

### **По вертикали**

1. Метод получения нескольких идентичных организмов путем бесполого размножения.
3. Углеродный шарик (рис. 3в).
4. Получается в результате работы клеточной бионаномашины 8г (рис. 4в).
6. Группа атомов, молекул или ионов (рис. 6в).
7. Химические элементы, входящие в состав всех органических соединений и составляющие около 98 % массы клетки.
9. Матрица с нанесёнными биомолекулами для одновременного проведения большого числа анализов в одном образце.
10. Взвесь наночастиц в воде.



14. Знак на дисплее сканирующего зондового микроскопа, отмечающий рабочую точку.

16. Или элемент третичной структуры белка, или самый верхний уровень группировки организмов в системе научной классификации, включающий в себя несколько царств, или определенная зона в Интернете.

17. Совокупность генов, содержащихся в одинарном наборе хромосом данного организма.

18. Русский биолог, физиолог, лауреат Нобелевской премии 1904 г., основоположник учения о высшей нервной деятельности.

27. Представим, что с помощью генной инженерии вы можете создать бактерии, утилизирующие (или превращающие в менее опасное соединение, или более удобное для дальнейшей химической утилизации) один или несколько тяжелых металлов. Опишите, какой металл будут использовать созданные вами бактерии, где это будет происходить, в какой форме (валентность, растворимость, в виде соли/кислоты/оксида и т. д.) бактерии будут с ним взаимодействовать и в какую форму его превращать; почему именно так?

28. С древних времен нам известен миф о «золотом руне». Некоторые историки объясняют его происхождение тем, что в реках Колхиды золотоискатели опускали шкуру барана в реку, чтобы собирать золотые песчинки. Представьте, что руно на самом деле было золотым и содержало наночастицы золота. Известно, что бараны песок не едят, а в воде золото находится в виде металлических песчинок и ионов.

- Каким образом наночастицы золота могли бы гипотетически попасть в структуру волоса руна?

- Если состричь шерсть из такого «золотого руна», которое содержит наночастицы золота и связать из нее свитер, то отчего бы зависел его цвет при дневном свете?

- В современной онкологии при терапии раковых опухолей используют наночастицы золота в комплексе с антителами. Какое свойство наночастиц золота используют для избирательной гибели опухолевых клеток?

29. Тераностика – это новый подход в медицине, сочетающий терапию и диагностику одновременно. Перспективными методами тераностики опухолевых заболеваний (пока только на животных) являются неинвазивные (*invivo*) спектроскопические технологии, предполагающие использование наночастиц. Однако применение данного метода осложнено рядом факторов: во-первых, проникновением света в ткани, во-вторых, созданием безопасных наночастиц и, в-третьих, необходимостью правильно организовывать методический подход.

- До каких слоев кожи может дойти свет с длиной волны (а) 800 нм и (б) 360 нм? Каким излучениям соответствуют данные длины волн?
- Какие есть методы медицинской диагностики, позволяющие визуализировать более глубокие ткани организма?
- Какой белок обладает наибольшим рассеянием в тканях?

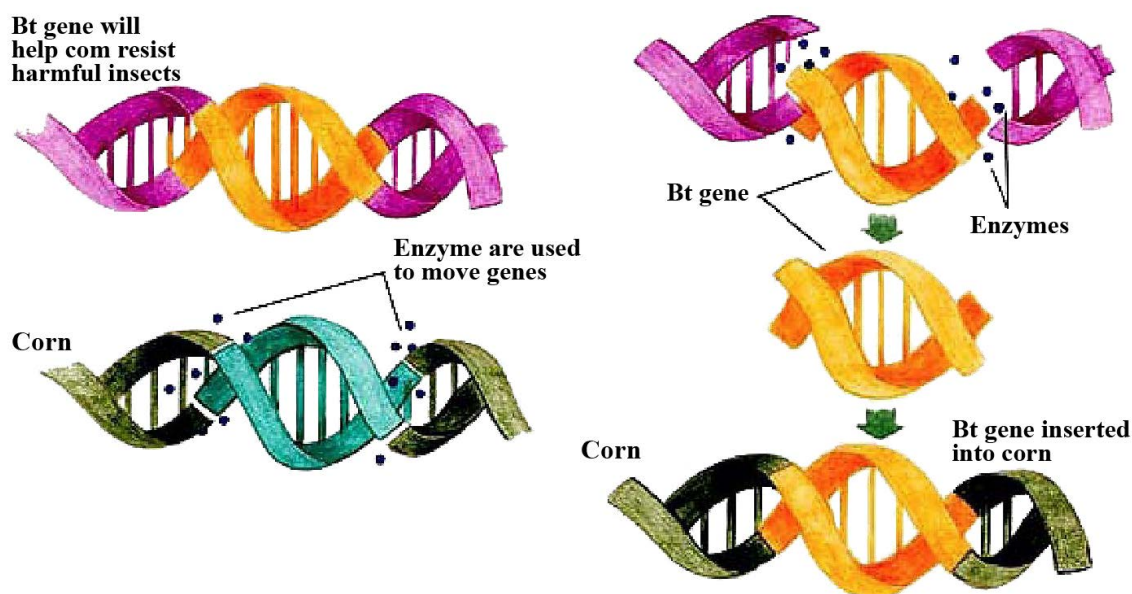
30. У одной лабораторной мышки развилась опухоль – метастазирующая меланома. Участок кожи мышки был очищен от шерсти и покрыт глицерином. С помощью особой технологии при освещении кожи зеленым лазером ученые смогли зарегистрировать клетки, хорошо поглощающие зеленый свет, в кровеносных и лимфатических сосудах. Какие клетки они точно смогут зарегистрировать: а) эритроциты, б) Т-лимфоциты, в) В-лимфоциты, г) циркулирующие метастазы меланомы, д) моноциты, е) эндотелий?

Какие молекулы в этих клетках хорошо поглощают свет?

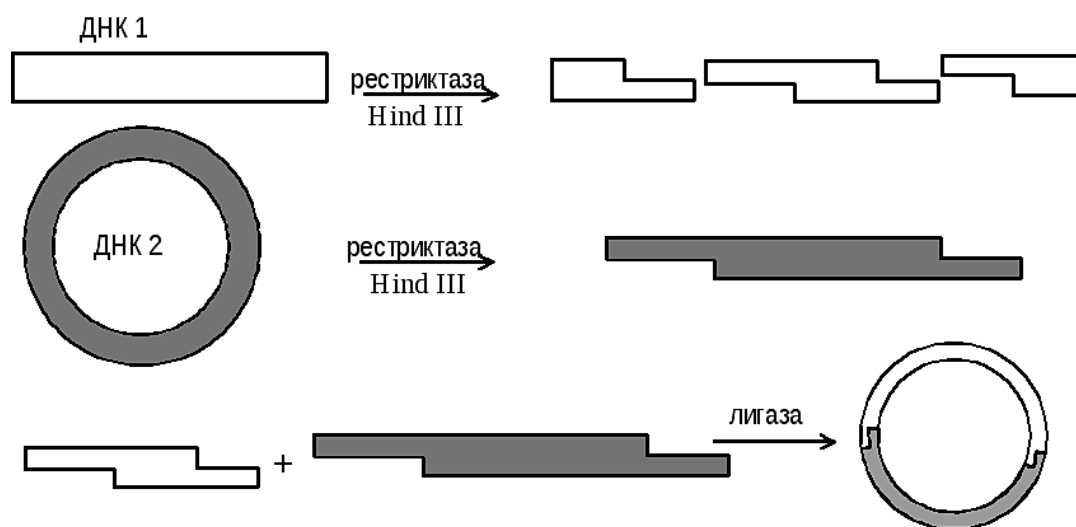
31. Предложите такие наночастицы (НЧ) для тераностики, чтобы они одновременно: а) взаимодействовали с клетками меланомы, циркулирующими по кровотоку (желательно, только с ними); б) чтобы комплексы из

клеток меланомы с НЧ можно было сконцентрировать из кровотока в определенном месте; в) чтобы комплексы можно было элиминировать (и каким образом?).

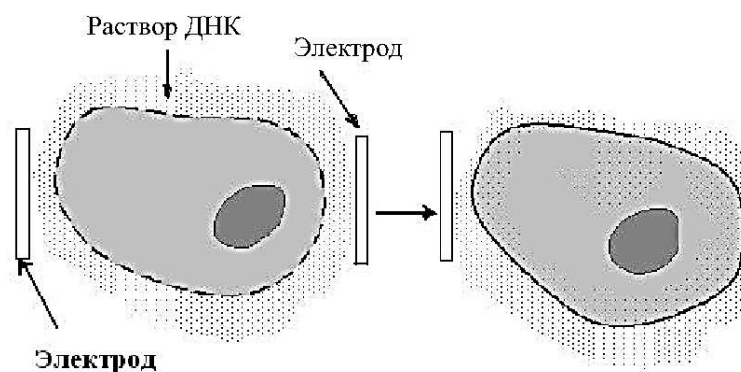
32. На рисунке изображена схема (генно-инженерная манипуляция является частью нанобиотехнологии), на которой основан способ лечения наследственного заболевания человека. Фрагменты ДНК, изображенные оранжевым и голубым цветами, соответствуют генам. Как называется способ лечения наследственного заболевания, основанный на изображенной генно-инженерной манипуляции? Какие ферменты используются в этой генно-инженерной манипуляции? Почему ген, изображенный голубым цветом, после вырезания из ДНК в дальнейших процессах не участвует? Объясните, зачем новый ген (изображен оранжевым цветом) встраивается в ДНК вместо удаленного гена? Дайте свою оценку перспективе использования генно-инженерной манипуляции, которая проиллюстрирована приведенной на рисунке схемой.



33. Зарисуйте приведенную ниже схему в тетради. Напишите название этапа работ по генетической инженерии, который изображен на схеме. Какая из изображенных структур может использоваться в последующем в качестве вектора? Объясните, почему эта структура может служить вектором.



34. Кратко охарактеризуйте методы внедрения чужеродной ДНК в клетку, которые изображены на приведенных ниже рисунках. Какие другие методы внедрения чужеродной ДНК в клетку вам известны? Какой из этих методов, по вашему мнению, наиболее надежен? Какой из методов представляется вам наименее надежным для обеспечения желаемого результата? Ответы аргументируйте.



## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Многие нанопроцессы и наноявления живой природы появились на Земле около 3 млрд лет тому назад. Последующие периоды эволюции живого многократно убеждают нас в гениальности древнейшего наноконструктора и нанотехнолога планеты – Природы. Всестороннее познание живых структур и механизмов жизнедеятельности на самих глубинных уровнях организации живого – главное условие конструирования наноструктур и разработки нанотехнологий путем моделирования.

Главная цель, которую преследовали авторы пособия, – дать обучающимся возможность непринужденно и с интересом прикоснуться к прикладным достижениям нанотехнологий в области биологической науки. Биология – точная наука, и любой лабораторный эксперимент немыслим без всестороннего объяснения условий его постановки.

В пособии рассмотрены теоретические основы исследования наноразмерных биологических объектов методом силовой зондовой микроскопии.

Во время практических занятий на базе Научно-образовательного ресурсного центра «Нанотехнологии» ОмГТУ (НОРЦ ОмГТУ) обучающиеся с помощью метода СЗМ проводят исследования топографии и морфологии поверхности биологических объектов с последующим качественным и количественным анализом её состава, изучают характер разрушения биосистем под действием физических и химических факторов.

Высокая разрешающая способность атомно-силового микроскопа позволяет избирательно определять клетки живых организмов, их структуру без дополнительных стадий обработки.

Для более глубокой проработки рассмотренного метода исследования в пособии приведены практические задания и список рекомендуемой литературы, изучение которой поможет в освоении метода и применении его не только на практике, но и при выполнении ВКР.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

### Основная литература

1. Нанотехнологии и продукты питания [Электронный ресурс]. – URL: [http://perst.issp.ras.ru/Control/Inform/perst/2012/12\\_04/n.php?file=perst.htm&label=L\\_12\\_04\\_11](http://perst.issp.ras.ru/Control/Inform/perst/2012/12_04/n.php?file=perst.htm&label=L_12_04_11).
2. Топливная ферма: Солнечный дизель [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.popmech.ru/technologies/10298-toplivnaya-ferma-solnechnyy-dizel/>.
3. Афанасьев, Г. Производство топлива с помощью бактерий. Метаболическая инженерия [Электронный ресурс] / Г. Афанасьев. – URL: <http://method-estate.com/archives/1174>.
4. Иванова, А. Г. Современные функциональные нанокompозитные материалы, используемые в экспериментальном микробиологическом топливном элементе [Электронный ресурс] / А. Г. Иванова, М. С. Масалович, Н. Н. Губанова, О. А. Загребельный, А. С. Галушко, Г. Г. Панова // Молодой ученый. – 2016. – № 28. – С. 242–248. – URL: <https://moluch.ru/archive/132/37156/>.
5. Биомиметика [Электронный ресурс]. – URL: <http://rgo-sib.ru/news/218.htm>.
6. Биосенсор [Электронный ресурс] // IUPACGoldBook. – URL: <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
7. Грядунов, Д. А. Биочипы – высокие технологии в медицинской диагностике [Электронный ресурс] / Д. А. Грядунов, А. С. Заседателев // Наука из первых рук. – 2017. – № 4 (75). – URL: <https://scfh.ru/papers/biochipy-vysokie-tekhnologii-v-meditsinskoj-diagnostike/>.
8. Миронов, В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии : учеб. пособие / В. Л. Миронов. – Нижний Новгород : РАН Институт физики микроструктур, 2004. – 114 с.
9. Яминский, И. В. Сканирующая зондовая микроскопия биполимеров : учеб. пособие / И. В. Яминский [и др.]. – М. : Научный мир, 1997. – 78 с.

10. Плескова, С. Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях : учеб. пособие / С. Н. Плескова. – Долгопрудный : Интеллект, 2011. – 183 с.

### **Рекомендуемая литература**

#### *Учебные издания*

1. Горленко, В. А. Научные основы биотехнологии. Ч. 1. Нанотехнологии в биологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / В. А. Горленко. – М. : Прометей, 2013. – 262 с. – ЭБС IPRbooks/.
2. Головин, Ю. И. Основы нанотехнологий / Ю. И. Головин. – М. : Машиностроение, 2012. – С. 583–638.
3. Пахарьков, Г. Н. Биомедицинская инженерия: проблемы и перспективы : учеб. пособие / Г. Н. Пахарьков. – СПб. : Политехника, 2011. – 234 с.
4. Келсалл, Р. Научные основы нанотехнологий и новые приборы : учебник-монография/ Р. Келсалла, А. Хэмли, М. Геогеган ; пер. с англ. А. Д. Калашникова. – Долгопрудный : Интеллект, 2011. – 527 с.
5. Наноматериалы и основы нанотехнологий : учеб. пособие / О. В. Кропотин [и др.] ; ОмГТУ. – Омск : Изд-во ОмГТУ, 2012. – 102 с.
6. Нанотехнологии в машиностроении : учеб. пособие для вузов / Ю. Н. Полянчиков [и др.]. – Старый Оскол : ТНТ, 2012. – 91 с.
7. Основы нанонауки и перспективы нанотехнологий : учеб. пособие : в 2 ч. / О. В. Кропотин [и др.] ; под ред. К. Н. Полещенко. – Омск : Изд-во ОмГТУ, 2011. – Ч. 1. – 76 с.
8. Основы нанонауки и перспективы нанотехнологий : учеб. пособие : в 2 ч. / О. В. Кропотин [и др.] ; под ред. К. Н. Полещенко. – Омск : Изд-во ОмГТУ, 2011. – Ч. 2. – 77 с.
9. Получение и исследование наноструктур : лаб. практикум по нанотехнологиям / А. А. Евдокимов [и др.] ; под ред. А. С. Сигова. – М. : БИНОМ. Лаб. знаний, 2010. – 146 с.
10. Пул, Ч. Нанотехнологии : учеб. пособие / Ч. Пул – мл., Ф. Оуэнс ; пер. с англ. ; под ред. Ю. И. Головина. – 5-е изд., испр. и доп. – М. : Техносфера, 2010. – 330 с.

11. Родунер, Э. Размерные эффекты в наноматериалах / Э. Родунер ; пер. с англ. А. В. Хачояна ; под ред. Р. А. Андриевского. – М. : Техносфера, 2010. – 350 с.

12. Рыжонков, Д. И. Наноматериалы : учеб. пособие / Д. И. Рыжонков, В. В. Левина, Э. Л. Дзидзигури. – 2-е изд. – М. : БИНОМ. Лаб. знаний, 2010. – 365 с.

13. Старостин, В. В. Материалы и методы нанотехнологий : учеб. пособие / В. В. Старостин ; под ред. Л. Н. Патрикеева. – 2-е изд. – М. : БИНОМ. Лаб. знаний, 2010. – 431 с.

14. Блесман, А. И. Теоретические основы методов исследования наноматериалов : учеб. пособие / А. И. Блесман, В. В. Даньшина, Д. А. Полонянкин. – Омск : Изд-во ОмГТУ, 2017. – 80 с. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

15. Основы нанотехнологий : учеб. для вузов / Н. Т. Кузнецов [и др.]. – М. : БИНОМ. Лаб. знаний, 2017. – 397 с.

16. Нанотехнологии и наноматериалы [Электронный ресурс] : метод. указания / ОмГТУ ; [сост.: Ю. К. Машков и др.]. – Омск : Изд-во ОмГТУ, 2018. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

#### *Периодические издания*

1. Наноиндустрия : науч.-техн. журн. – 2007–2016.
2. Нано- и микросистемная техника : журн. – 2006–2018.
3. Российские нанотехнологии : журн. – 2010–2016.

#### *Информационные ресурсы*

1. ЭБС «АРБУЗ» [Электронный ресурс]. – URL: <http://lib.omgtu.ru>.
2. Научная электронная библиотека elibrary.ru [Электронный ресурс]. – URL: <https://elibrary.ru>
3. ЭБС IPRbooks [Электронный ресурс]. – URL: [www.iprbookshop.ru](http://www.iprbookshop.ru).



*Учебное издание*

**Даньшина** Валентина Владимировна

**Рогачев** Евгений Анатольевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ  
МЕТОДОМ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ  
В НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ**

*Учебное пособие*

Редактор *К. В. Муковоз*

Компьютерная верстка *Л. Ю. Бутаковой*

Для дизайна обложки использованы материалы  
из открытых интернет-источников

Сводный темплан 2019 г.

Подписано в печать 25.10.19. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.

Отпечатано на дупликаторе. Усл. печ. л. 6,5. Уч.-изд. л. 6,5.

Тираж 100 экз. Заказ 490.

---

Издательство ОмГТУ. 644050, г. Омск, пр. Мира, 11; т. 23-02-12.  
Типография ОмГТУ.