

БЕЛОРУССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

УДК 576.6:612.017.1:576.3:53.088.3

МОХАММЕД
Салем Абдо Абдулгани

**АТОМНО-СИЛОВАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ
КЛЕТОК С УЧЕТОМ ГИСТЕРЕЗИСА ПЬЕЗОСКАНЕРА
И ВЛИЯНИЯ СИЛ АДГЕЗИИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

по специальности 05.11.01 – Приборы и методы измерения

Минск, 2016

Работа выполнена в Белорусском национальном техническом университете

Научный руководитель **Чижик Сергей Антонович**, академик, доктор технических наук, профессор, заведующий лабораторией нанопроцессов и технологий Государственного научного учреждения «Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси»

Официальные оппоненты: **Крень Александр Петрович**, доктор технических наук, заведующий лабораторией контактно-динамических методов контроля Государственного научного учреждения «Институт прикладной физики Национальной академии наук Беларуси»;

Ковалева Инна Николаевна, кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник Государственного научного учреждения «Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого Национальной академии наук Беларуси»

Оппонирующая организация Государственное научное учреждение «Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси»

Защита диссертации состоится 29 июня 2016 года в 14⁰⁰ на заседании совета по защите диссертаций Д 02.05.17 при Белорусском национальном техническом университете по адресу: 220013, г. Минск, проспект Независимости, 65, корп. 1, ауд. 202. Телефон ученого секретаря: +375 (17) 293 96 18, e-mail: D.02.05.17@tut.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского национального технического университета.

Автореферат разослан « 26 » мая 2016 г.

Ученый секретарь Совета
по защите диссертаций
кандидат технических наук

Ризноокая Н.Н.

© Мохаммед С.А.А., 2016

© Белорусский национальный
технический университет, 2016

ВВЕДЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – современный высокоэффективный метод визуализации поверхностей, микро- и наноразмерных объектов, в том числе биологических клеток. Помимо изображения поверхности с нанометровым разрешением также возможно и определение механических свойств исследуемого объекта, в частности, модуля упругости. Реализуется такая возможность при работе прибора в режиме силовой спектроскопии, т.е. наноиндентирования в выбранной точке поверхности объекта. Механические свойства могут быть измерены в статическом и динамическом режимах АСМ.

Измерения модуля упругости на субмикронных и наноразмерных масштабах имеют специфические особенности и сложности, обусловленные малыми размерами зонда, наличием на поверхности объекта структурно-механических неоднородностей, локализованных в областях, сопоставимых по размерам с размерами зонда, влиянием адгезионного взаимодействия материала объекта и острия зонда на измеряемые величины приложенной к зонду нагрузки и его внедрения в исследуемый объект, значительной чувствительностью результатов измерений к вибрационным помехам, зависимостью этих результатов от выбора точки контакта и математической модели, устанавливающей связь между величинами измеряемой силы и внедрения зонда в образец. В итоге актуальной остается задача повышения точности и информативности измерений механических свойств различных материалов, в частности, биологических клеток, методом атомно-силовой спектроскопии.

В данной работе акцент сделан на совершенствовании методики калибровки атомно-силового микроскопа при измерениях в условиях неустраняемых вибрационных помех, методики выбора (определения) точки контакта, учете адгезионных сил при обработке исходных данных, совместном рассмотрении кривых внедрения, полученных на прямом и обратном ходах перемещения объекта, и некоторых других методических аспектах АСМ и атомно-силовой спектроскопии (АСС). Предложенные методические усовершенствования использованы при проведении исследований механических свойств высокоэластичных материалов и биологических клеток.

Актуальность работы обусловлена активным развитием био- и нанотехнологий и потребностью в более полной и точной характеристике наноструктурных материалов, в частности, высокоэластичных материалов и биологических клеток с учетом факторов, влияющих на точность определения их модуля упругости и других характеристик.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами

Исследования по теме диссертации выполнялись на кафедре «Микро- и нанотехника» приборостроительного факультета Белорусского национального технического университета и лаборатории нанопроцессов и технологий Государственного научного учреждения «Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси»

Тема диссертации соответствует п. 6.10. Оптико-электронные методы и средства измерений физических величин, контроля технологии и параметров производства полупроводниковых приборов и интегральных схем, размерного контроля Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 годы, утвержденного Постановлением Совета министров Республики Беларусь от 19.04.2010г. № 585.

Исследования по тематике диссертационной работы проводились в рамках ГПНИ «Конвергенция» «Разработка подходов локального анализа и картографирования адгезионных свойств биологических клеток» (задание №3.2.03.3, 2014-2015 гг.) (научный руководитель – С.А.Чижик).

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования является уменьшение погрешности измерения на воздухе механических свойств биологических клеток методом АСС с учетом влияния неустраняемых вибрационных помех, гистерезиса пьезосканера, а также сил адгезии. Для достижения поставленной цели потребовалось решить следующие задачи:

- разработать методику определения калибровочного коэффициента для перемещений отклоняющейся консоли зонда атомно-силового микроскопа, более устойчивую, чем стандартная методика, к воздействию вибрационных помех;
- разработать метод программной коррекции гистерезиса пьезосканера атомно-силового микроскопа;
- уменьшить неоднородность измеряемого на воздухе модуля упругости высушенной биологической клетки при глубине внедрения менее 5-15 нм, в том числе в области притяжения зонда к поверхности клетки;
- с учетом влияния сил адгезии провести измерения модуля упругости некоторых типов биологических клеток, эластичных полимерных материалов и определить их адгезионные свойства.

Научная новизна заключается в теоретическом обосновании и практической проверке новых методик обработки данных АСС, имеющих ряд преимуществ по сравнению со стандартными методиками. Показана целесообразность

ность сглаживания калибровочной кривой для получения калибровочного коэффициента при наличии неустранимых вибрационных помех. Установлена закономерность смещения кривой «сила-расстояние» на этапе отвода образца от зонда по отношению к кривой подвода, на основании которой впервые осуществлена программная коррекция гистерезиса пьезосканера. Применительно к исследованиям на воздухе методом АСС механических свойств биологических клеток с учетом сил адгезии обоснован выбор точки контакта при применении моделей Герца и Джонсона-Кенделла-Робертса (ДКР).

Положения, выносимые на защиту

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Методика калибровки перемещений отклоняющейся консоли зонда атомно-силового микроскопа по калибровочной кривой, сглаженной полиномом первой или второй степени, обеспечивает большую устойчивость и меньшую погрешность измеряемого калибровочного коэффициента к вибрационным помехам, чем стандартная методика калибровки по двум точкам исходной калибровочной кривой. Совместная обработка данных наноиндентирования поликарбоната с известными механическими свойствами и использованием модели ДКР и данных калибровки по кремниевой пластине показала, что погрешность определения калибровочного коэффициента по предлагаемой методике составила 9 %, а по стандартной 15%.

2. Величина смещения кривой "сила-расстояние" при отводе образца от зонда относительно кривой подвода для используемой измерительной системы слабо зависит от механических свойств исследуемого материала и описывается математической моделью релаксационного типа. Это позволило впервые осуществить программную коррекцию гистерезиса пьезосканера атомно-силового микроскопа для анализа механических свойств исследуемых образцов с использованием кривой отвода.

3. Выбор точки контакта (ТК2) согласно модели ДКР с учетом сил адгезии, по сравнению со стандартной методикой выбора положения точки контакта, соответствующей модели Герца (ТК1), позволяет определять модуль упругости биологических клеток с меньшей неоднородностью и при меньшей величине внедрения зонда в образец (5-15 нм), а также в области действия сил притяжения. Координата точки контакта ТК2 соответствует точке на кривой отвода, в которой величина силы взаимодействия зонда и образца составляет 8/9 от величины силы адгезии в точке отрыва зонда от поверхности образца.

4. Учет сил адгезии при анализе механических свойств тромбоцитов с использованием модели ДКР и точки контакта ТК2 позволил уменьшить на 33% систематическую погрешность завышения модуля упругости, по сравнению с методикой основанной на модели Герца и выборе точки контакта ТК1.

Личный вклад соискателя

Автором выполнена разработка, конкретизация, алгоритмическая и программная реализация общих установок и идей научного руководителя: доктора технических наук, профессора С.А. Чижика. Автор принимал непосредственное участие в проведении экспериментов по атомно-силовой спектроскопии и атомно-силовой микроскопии, обработке экспериментальных данных с использованием разработанной им для этих целей компьютерной программы. Соавторы публикаций по теме диссертации участвовали в подготовке биологических клеток к исследованиям и проведении отдельных измерений методами АСМ и АСС (Дрозд Е.С., Кужель Н.С., Мельникова Г.Б.), обсуждении полученных результатов, оформлении публикаций и разработке программного обеспечения (Маханёк А.А. и Дрозд Е.С.).

Апробация результатов диссертации

Основные результаты работы доложены на 5 международных конференциях: International workshop on new approaches to high-tech “Nano-design, technology, computer simulations (NDTCS ‘13)” (June 11-15, 2013, Minsk, Belarus); International conference «Shell and membrane theories in mechanics and biology: from macro- to nanoscale structures », September 16-20, 2013, Minsk, Belarus; VI Международной научно-технической конференции «Приборостроение – 2013», 20 – 22 ноября 2013 г, Минск; XII международной конференции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» 11-12 апреля 2014 г., Минск; VII Международной научно-технической конференции «Приборостроение – 2014», Минск, 19-21 ноября 2014 г.

Опубликованность результатов

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах (всего 2,84 а.л.), а также 5 докладов и тезисов докладов в сборниках материалов международных конференций (всего 0,6 а.л.).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, пяти глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Общий объем диссертации составляет 124 страницы, из них 70 страниц основного текста, 52 иллюстрации на 38 страницах, 5 таблиц на 4 страницах, библиографический список на 15 страницах, включающий 170 наименований использованных источников и 12 наименований публикаций соискателя, 3 приложения на 6 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении диссертационной работы обосновывается актуальность и значимость выбранной темы диссертации, определяется круг решаемых задач.

В первой главе представлены общие положения атомно-силовой микроскопии и статической силовой спектроскопии (далее силовой спектроскопии), отражены результаты анализа научных публикаций, касающихся некоторых аспектов применения этих методов, в частности, артефактов и ошибок, возможных при АСМ и АСС, изложены математические модели обработки данных наноиндентирования методом силовой спектроскопии. На основании выполненного литературного обзора сделан вывод о необходимости учета сил адгезии при исследовании методом АСС на воздухе механических свойств высушенных биологических клеток. Определены цель и задачи исследований.

Во второй главе отмечается недостаток стандартной методики калибровки перемещений отклоняющейся консоли зонда томно-силового микроскопа по двум точкам в верхней части калибровочной кривой, проявляющийся в завышении величины калибровочного коэффициента при наличии неустранимых вибрационных помех. Определение калибровочного коэффициента K осуществляется по формуле

$$K = (Z_{defl,n}^* - Z_{defl,m}^*) / (Z_{pos,n}^* - Z_{pos,m}^*), \quad (1)$$

где Z_{defl}^* , Z_{pos}^* – измеренное отклонение консоли (в условных единицах) и перемещение рабочей площадки с образцом (в нм), n и m – номера точек измерений. Предполагается, что калибровочный материал и зонд достаточно жесткие и их деформацией можно пренебречь. Отклонение кантилевера, выраженное в нм, вычисляется по формуле $Z_{defl} = Z_{defl}^* / K$, перемещение рабочей площадки относительно точки контакта (ТК) $Z_{pos} = Z_{pos,TK}^* - Z_{pos}^*$.

Предлагаются альтернативные способы калибровки прибора. Показано, что из модели Герца следует выражение, связывающее калибровочный коэффициент с измеряемыми параметрами Z_{pos} (в нм) и Z_{defl}^* следующим образом:

$$1/K = 3/K_0 - 2Z_{pos}^*/Z_{defl}^*, \quad K_0 = dZ_{defl}^*/dZ_{pos}^*. \quad (2)$$

Здесь K_0 – оцениваемое в «верхней» части кривой внедрения локальное значение тангенса угла наклона калибровочной кривой к оси вертикальных перемещений рабочей площадки атомно-силового микроскопа.

Соотношение (2) справедливо при любых постоянных по глубине внедрения зонда значениях модулей упругости и коэффициентов Пуассона зонда и калибровочного материала, в том числе и при калибровке кремниевого зонда по пластине из кремния или слюды.

Также рассмотрены еще три варианта обработки калибровочной кривой и определения калибровочного коэффициента K :

1) Определение K в результате сглаживания калибровочной кривой полиномом невысокой степени, например, параболой

$$Z_{defl}^*(Z_{pos}) = a_0 + a_1 Z_{pos} + a_2 Z_{pos}^2, \quad K \approx a_1 + 2a_2 Z_{pos, \max}, \quad (3)$$

где $Z_{pos, \max}$ – координата максимального отклонения консоли по оси Z_{pos} .

2) Трехпараметрическая аппроксимация калибровочной кривой на основе модели Герца и минимизации целевой функции

$$\Phi(K, C, d_0) = \sum_n \left[Z_{defl, n}^* / K - C \left(Z_{pos, n} - Z_{defl, n}^* / K + d_0 \right)^{3/2} \right] = \min. \quad (4)$$

Здесь параметр C учитывает механические свойства зонда и материала образца, а d_0 – поправка в положение точки контакта.

3) Определение калибровочного коэффициента по известной величине модуля упругости на основе модели ДКР, согласно которой выражения, связывающие величину внедрения $\delta_{ДКР}$, радиус пятна контакта a однородного полусферического острия зонда, плотность поверхностной энергии адгезии в контакте образец – зонд γ и нагрузку F имеют вид

$$\delta_{ДКР}(a) = a^2 / R - (2\pi a \gamma / E^*)^{1/2}, \quad F(a) = 4E^* a^3 / (3R) - (8\pi a^3 E^* \gamma)^{1/2}. \quad (5)$$

Здесь $1/E^* = (1 - \nu_1^2) / E_1 + (1 - \nu_2^2) / E_2$ – приведенный модуль упругости, индексы 1 и 2 относятся к материалу зонда и поверхности внедрения, E и ν – модуль упругости и коэффициент Пуассона, соответственно.

Минимальная сила взаимодействия зонда и поверхности образца равна

$$F_a = -3\pi R \gamma / 2. \quad (6)$$

При некотором ненулевом радиусе контакта a_0 сила $F(a_0) = 0$. Из выражений (5) следует, что соответствующая этому контактному радиусу величина внедрения $\delta_0 = (F_a^2 / (3RE^{*2}))^{1/3}$, а фактическая величина внедрения и сила взаимодействия зонда и образца

$$\delta_{ДКР} \approx \delta + \delta_0, \quad \delta = Z_{pos} - Z_{defl}, \quad (7)$$

$$F = F_{\Gamma} \left[1 - \left(3\delta_0 R a^{-2} \right)^{3/4} \right], \quad F_{\Gamma} = 4E^* a^3 / (3R). \quad (8)$$

Параметр δ в (7) является измеренным значением величины внедрения зонда в образец относительно точки контакта, соответствующей модели Герца (ТК1). При $\delta \gg \delta_0$ модель ДКР преобразуется в модель Герца.

Алгоритм нахождения калибровочного коэффициента включает два этапа. На первом этапе вычисляется E^* при некотором начальном приближении искомого калибровочного коэффициента $K^{(0)}$, полученного, например, из калибровки по кремниевой пластине любым из описанных выше способов. На втором этапе находится и минимизируется невязка между вычисленным эффективным модулем упругости и его заданным (эталонным) значением путем соответствующего уточнения калибровочного коэффициента любым минимаксным способом. Для нахождения модуля упругости на первом этапе методом Хука-Дживиса решалась оптимизационная задача

$$\Phi(E^*) = \sum_n \left| F_n - F(\delta_n, E^*) \right| = \min. \quad (9)$$

Здесь F_n – измеренная сила в точке n , а $F(\delta_n, E^*)$ – сила, вычисленная согласно модели ДКР при заданном E^* и измеренном внедрении δ_n . Радиус пятна контакта a_n определяли по итерационной схеме (m – номер итерации) $x_n^{(m)} = \delta_n + \delta_0 + (16\delta_0^3 x_n^{(m-1)})^{1/4}$, $x_n^m = (a_n^{(m)})^2 / R$, $x_n^{(0)} = \delta_n$.

Результаты оценок калибровочного коэффициента в двух сериях экспериментов рассмотренными способами представлены в таблице 1 [4].

Таблица 1. – Результаты калибровки по кремнию (Si) и поликарбонату (ПК) с использованием предлагаемых способов вычисления K (нм^{-1})

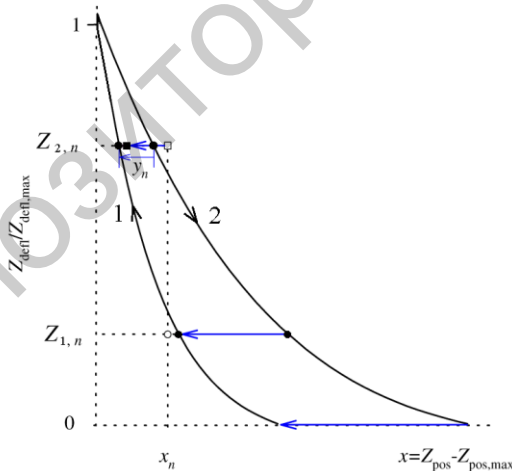
Параметр и модель	Калибровочный коэффициент, нм^{-1}	Материал
K по формуле (1)	0,584	Si (111)
K согласно модели (3)	0,465	Si
K согласно модели (2)	0,599	Si
K согласно модели (4)	0,496	Si
d_0 в формуле (4), нм	-0,32	Si
C в формуле (4), $\text{нм}^{-1/2}$	0,616	Si
K согласно модели (5) – (9)	0,507	ПК

Можно констатировать близость калибровочных коэффициентов, полученных при калибровке в разных экспериментах по пластине из ПК. Близкие к этим значениям величины K получены при калибровке по кремниевой пластине в эксперименте с радиусом наконечника зонда 46 нм и вычислениях по формуле (1) и минимизации функции, описываемой формулой (4).

В третьей главе представлена методика коррекции гистерезиса пьезосканера атомно-силового микроскопа NT-206 [6]. Гистерезис проявляется в зависимости величины деформации пьезосканера от направления изменения управляющего напряжения. В итоге, при одних и тех же управляющих электрических сигналах рабочая площадка с образцом оказывается в разных положениях в зависимости от направления изменения этих сигналов. Методика коррекции гистерезиса пьезосканера основывается на следующей закономерности: расстояние между кривыми подвода и отвода рабочей площадки при разных (и соответственных) уровнях отклонения консоли (рисунок 1) описывается соотношением релаксационного типа:

$$\Delta Z_{pos} = ae^{-x/c} + b(1 - e^{-x/c}). \quad (10)$$

Здесь x - расстояние между текущей координатой по оси перемещений рабочей площадки Z_{pos} и координатой точки максимального отклонения консоли:



○ – экспериментальная (n -я) точка на кривой подвода 1, □ – экспериментальная точка на кривой отвода 2, ■ – скорректированная точка на не сглаженной кривой отвода, ● – точки на аппроксимационных (сглаженных) кривых подвода и отвода

Рисунок 1. – Схема коррекции гистерезиса пьезосканера

$$x = Z_{pos} - Z_{pos,max} . \quad (11)$$

Таким образом, для получения скорректированного с учетом гистерезиса пьезосканера положения рабочей площадки при ее отводе $Z_{pos}^{(скор)}$ достаточно ввести поправку ΔZ_{pos} в текущую координату по оси Z_{pos} :

$$Z_{pos}^{(скор)} = Z_{pos}^{(изм)} - \Delta Z_{pos} . \quad (12)$$

Коэффициенты a , b и c находятся из решения оптимизационной задачи:

$$\Phi(a,b,c) = \sum_n (y_n - \Delta Z_{pos}(x_n))^2 = \min , \quad (13)$$

где y_n – расстояние между сглаженными кривыми в точке x_n (рисунок 1).

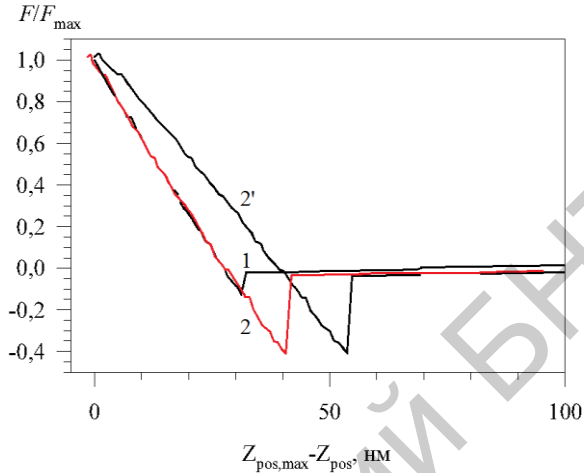
Алгоритм коррекции содержит этап сглаживания экспериментальных данных для обеих кривых полиномом невысокой степени (сплошные линии на рисунке 1). Сглаживание позволяет для каждой точки кривой подвода получить координату точки на кривой отвода с такой же величиной отклонения консоли и определить нужную величину смещения кривой отвода вдоль оси Z_{pos} (в направлении кривой подвода), как это показано горизонтальными стрелками на рисунке 1. Именно эти сглаженные кривые используются для определения коэффициентов модели (10) из решения минимаксной задачи (13) и вычисления по формуле (10) поправки ΔZ_{pos} при смещении x . Данная поправка учитывается при коррекции по формуле (12) экспериментальных значений координат $Z_{pos}^{(изм)}$ на кривой отвода образца.

Рисунок 2 и таблица 2 показывают результат коррекции кривой отвода для слюды. Подобные результаты были также получены для кремния, полисульфона, эритроцитов и тромбоцитов при использовании двух экземпляров трубчатых пьезосканеров, консолей различной жесткости с зондами, имеющими радиусы закругления наконечника 30-60 нм.

Рассогласование между скорректированными кривыми отвода и измеренными кривыми подвода зависит от величины вибрационных помех и обычно составляет менее 2 нм, за исключением нескольких точек вблизи максимального отклонения кантилевера, где погрешность может достигать 10 нм при наличии крипа пьезотрубки, проявляющегося в скачкообразном увеличении величины силы после изменения направления перемещения рабочей площадки.

Предложенная методика программной коррекции гистерезиса пьезосканера позволяет осуществлять анализ механических свойств исследуемого объекта по кривой отвода и необходима для учета влияния адгезионных сил при малых величинах внедрения зонда в образец, а также для более надежного определе-

ния точки контакта и учета деформаций образца в рамках модели ДКР в области действия сил притяжения.



1 – кривая подвода, 2' – исходная кривая отвода,
2 – скорректированная кривая отвода

Рисунок 2. – Исходные и скорректированные с учетом гистерезиса пьезосканера кривые отвода для слюды

Таблица 2. – Параметры модели (10) для рассмотренных образцов

Образец	Параметры модели (10)		
	a , нм	b , нм	c , нм
Кремний	9,69	39,6	67,66
Полисульфон	3,69	29,2	108,3
Слюда	2,22	15,0	22,28
Эритроцит	7,53	126,0	199,0
Тромбоцит	6,56	128,2	256,8

В четвертой главе предлагается при использовании модели ДКР выбор точки контакта (ТК2), в которой, как и в случае модели Герца, величина внедрения зонда в образец $\delta=0$, а величина силы определяется моделью ДКР и равна, как следует из этой модели, $F_{ТК2} = 8F_a/9$ (рисунок 3) [5].

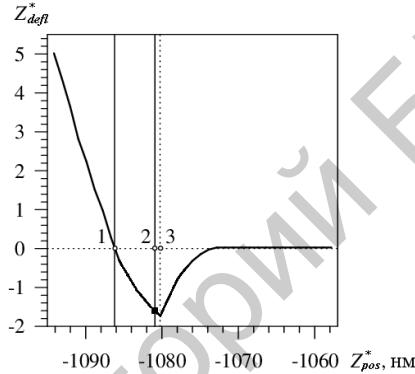
Показано, что критерий Тейбора, в случае применимости модели ДКР, можно представить в виде

$$\mu = C(v)(\delta_0/z_0), \quad C(v) = (4/3\pi^2)^{1/3}(1-v^2)^{-2/3}, \quad (14)$$

а величина внедрения в точке 1 (ТК1) вычисляется непосредственно по измеряемой силе адгезии F_a и расстоянию d между точками 1 и 3 на рисунке 3:

$$\delta_0 = C_0(d - |F_a/k|), \quad C_0 = (1 + 4^{-2/3})^{-1} \approx 0,716. \quad (15)$$

Здесь k – изгибная жесткость консоли зонда, ν – коэффициент Пуассона, z_0 – равновесное расстояние между поверхностями зонда и образца, на котором происходит разрыв адгезионных связей.



- 1** – точка контакта, соответствующая модели Герца, **2** – координата точки нулевого внедрения зонда в образец, соответствующая модели ДКР, **3** – координата минимальной силы взаимодействия зонда и образца F_a

Рисунок 3. – Кривая подвода и внедрения вблизи особых точек

Согласно формуле (14), критическому значению параметра Тейбора, при котором справедлива модель ДКР, соответствует минимальное значение величины внедрения, равное 3,2 нм при $z_0 = 0,4$ нм и $\nu = 0,5$.

Эффект от применения модели ДКР в сравнении с обработкой тех же данных наноиндентирования по модели Герца для двух способов выбора точки контакта 1 и 2 иллюстрирует рисунок 4.

Рисунок 4а демонстрирует неоднородность (дисперсию) измеряемого модуля упругости по глубине внедрения при выборе точки контакта ТК1. Кривая 1 здесь получена согласно модели Герца, то есть при $F(\delta=0)=0$, а кривая 2 вычислена по модели ДКР с введением поправки δ_0 в величину внедрения, то есть $F(\delta_0)=0$. Рисунок 4б соответствует выбору точки контакта ТК2, где расчет по модели Герца производился с введением поправки в величину силы,

равную F_{TK2} , так что в ТК2 $F_{Герц} = F - F_{TK2}$, а расчет по модели ДКР производился без поправки в измеряемую силу F , но с учетом того, что величина внедрения зонда в образец равна $\delta = (Z_{pos,TK2}^* - Z_{pos}^*) - (Z_{defl} - Z_{defl,TK2})$.

Можно видеть, что при выборе ТК2 модель ДКР позволяет получать искомым модуль при меньших величинах внедрения, а различия между результатами, получаемыми по моделям Герца и ДКР с выбором ТК2 незначительны.

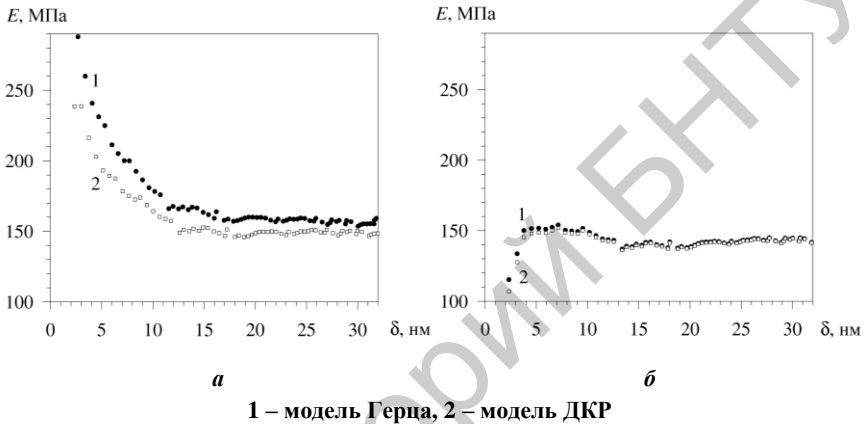


Рисунок 4. – Влияние способа выбора точки контакта ТК1 (а) или ТК 2 (б)

В пятой главе отражены результаты исследования в полуконтактном динамическом режиме АСМ влияния нагрузки на качество изображений топографии и фазового контраста структуры поверхности полимера поливинилпиридин (ПВП) с наночастицами кремния SiO_2 и раковых клеток линии A549 [1, 11]. Установлено, что при относительных нагрузках, соответствующих 60-85% максимально возможному изгибу консоли, зонд может значительно деформировать поверхность клетки. При этом снижается качество изображения рельефа и фазового контраста. Выбор оптимальной нагрузки зависит как от характеристик зонда, в частности, жесткости кантилевера, так и от высоты и распределения неоднородностей на поверхности исследуемых клеток.

Приведены результаты визуализации топографии и томографии биологических клеток и наночастиц в клетках [9, 10].

Представлены результаты исследования методами оптической микроскопии и атомно-силовой микроскопии в полуконтактном динамическом режиме влияния температуры культивирования на топографию поверхности и механические свойства раковых клеток легких человека линии A549 [2]. Обнаружено,

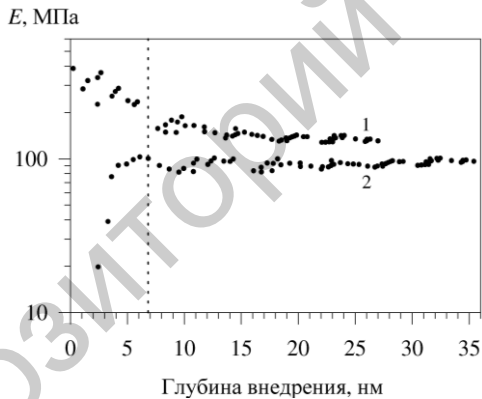
что по сравнению с культурой клеток A549, выращенной при 37 °С, последующее экспонирование клеток при пониженной температуре (30 °С) в течение 5 и 8 суток приводит к появлению клеток с удлинёнными выростами цитоплазмы. При пониженной температуре отмечается также появление соединённых друг с другом морфологически сходных клеток, образовавшихся в результате незавершённого митоза. В результате одиннадцати суточного культивирования клеток A549 при 30 °С появляются клетки с множественными выростами цитоплазмы, что свидетельствует об индуцировании процессов дифференцировки. Исследование методом статической спектроскопии механических свойств клеток линии рака легкого A549 показало, что понижение температуры культивирования до 30 °С в течение 8 суток не приводит к достоверным изменениям механических свойств клеток A549 и обнаружило тенденцию увеличения силы адгезии острия зонда к поверхности мембраны.

Отражены результаты исследования методом АСМ в полуконтактном динамическом режиме и силовой спектроскопии влияния наночастиц биоэлементов на структурные и механические свойства клеток почки быка линии MDBK [3, 8]. Представлены результаты расчетов локального модуля упругости, силы поверхностной адгезии клеток, работы адгезии, а также анализа трехмерных изображений клеток в контроле и после инкубации с наночастицами биоэлементов в течение 20 мин. Установлено, что в результате инкубирования клеток с наночастицами меди и серебра, а также нитрита серебра значение модуля упругости увеличивается по сравнению с модулем упругости клеток контрольного образца. В случае инкубирования клеток с наночастицами оксида цинка наблюдается противоположный эффект – уменьшение величины модуля упругости клеток по сравнению с модулем упругости клеток контрольного образца. Действие наночастиц оксида цинка приводит к значительному, практически разрушительному, изменению формы и структуры поверхности клеток (возрастает шероховатость поверхности клетки) и к уменьшению силы адгезии на 30 % по сравнению с контролем.

Представлены результаты применения разработанной методики коррекции гистерезиса пьезосканера при анализе механических свойств тромбоцитов здоровых людей [7]. Силовая спектроскопия клеток производилась на воздухе. Жесткость консоли составляла 3 Н/м. Радиус наконечника зонда изменялся на протяжении серии опытов от 54 до 67 нм. Деформацией зонда пренебрегали. Коэффициент Пуассона принимался равным 0,5. Области наноиндентирования имели размеры 1,5x1,5 мкм и выбирались на поверхности клеток из условия наименьшей неоднородности перепада высот. Гистограмма высот поверхности тромбоцитов показала наличие двух выраженных пиков, которые пришлись на высоты 192 и 89 нм с частотами встречаемости 4,0 и 2,0 %.

Отражением структурной неоднородности поверхности клеток является неоднородность их упругих свойств в разных точках внедрения зонда при проведении атомно-силовой спектроскопии. Многократные измерения модулей упругости на одном и том же образце, а также на разных образцах клеток обнаружили разброс значений вычисляемых модулей упругости от двух десятков до двух сотен МПа. Пример вычисления модуля упругости по кривой отвода с использованием моделей Герца и ДКР показывает рисунок 5.

Неоднородность значений модулей упругости в диапазонах от 0 до 250 МПа с шагом 50 МПа иллюстрирует рисунок 6а. При вычислениях по модели ДКР максимум частоты встречаемости (34%) пришелся на диапазон модулей упругости 100–150 МПа. Итоговый по всем данным результат показал, что (при уровне значимости 0,05) доверительные интервалы модулей упругости тромбоцитов, вычисленных согласно моделям Герца и ДКР, составляют 124–150 МПа и 90–116 МПа, соответственно.

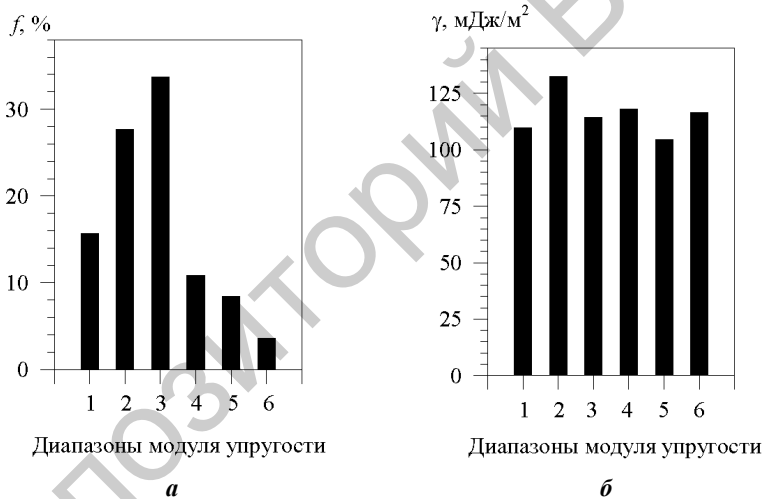


1 – расчет по модели Герца с выбором ТК1, 2 – расчет по модели ДКР с выбором ТК2. Пунктирная линия – граница области преобладания сил притяжения

Рисунок 5. – Характерные распределения модуля упругости тромбоцитов по глубине внедрения зонда в клетку

Помимо дисперсии модулей упругости клеток обнаружен также и разброс величин поверхностной плотности адгезионной энергии γ , вычисляемой из соотношения (6) по измеренной силе адгезии F_a . Средние значения γ в рассмотренных выше диапазонах модулей упругости приведены на рисунке 6б. Достоверных различий между γ в разных диапазонах значений E при уровне значимости $p=0,05$ не обнаружено.

Выбор модели Герца или ДКР для обработки данных наноиндентирования методом атомно-силовой спектроскопии имеет большое значение при оценке величины модуля упругости исследуемого материала. Значения модулей упругости тромбоцитов, фиксированных глутаровым альдегидом и высушенных на воздухе, составили для моделей Герца и ДКР (137 ± 8) и (103 ± 6) МПа. Поверхностная плотность адгезионной энергии равна (115 ± 3) мДж/м². При не учете сил адгезии в рамках модели Герца средние значения модулей упругости на 33% больше результата, получаемого согласно модели ДКР с выбором точки контакта на скорректированной кривой отвода со значением силы притяжения, равным 8/9 от величины силы отрыва зонда от поверхности клетки. Не установлено достоверных различий в величине удельной плотности адгезионной энергии участков поверхности тромбоцитов с разными модулями упругости.



1 – $E < 50$; 2 – 50-100; 3 – 100-150; 4 – 150-200; 5 – 200-250; 6 – $E > 250$ МПа

Рисунок 6. – Частотное распределение модуля упругости тромбоцитов (а) и средняя поверхностная плотность адгезионной энергии тромбоцитов (б) в различных диапазонах модулей упругости

Результаты исследования структурно-механических свойств тромбоцитов при совместной обработке кривых подвода и отвода рабочей площадки и применения моделей Герца и ДКР для двух вариантов выбора точки контакта отражены в публикации [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

В результате выполнения данного диссертационного исследования были получены следующие новые научные результаты:

1. Разработана методика определения калибровочного коэффициента, обеспечивающая высокую устойчивость к вибрационным и другим помехам и меньшую погрешность в величине определяемого калибровочного коэффициента по сравнению с существующей стандартной методикой калибровки отклоняющейся системы кантилевера атомно-силового микроскопа [4].

2. Установлено, что величина смещения кривой "сила-расстояние" в цикле подвод-отвод в контакте зонд-образец в используемой измерительной системе в основном определяется фактором гистерезиса пьезосканера и описывается математической моделью релаксационного типа [6]. С использованием этой модели разработана методика программной коррекции гистерезиса пьезосканера, позволяющая анализировать механических свойств исследуемых образцов по кривой отвода.

3. Показано, что наименьшая неоднородность вычисляемого модуля упругости биологических клеток по глубине индентирования обеспечивается при выборе точки контакта вблизи координаты максимального притяжения зонда к поверхности объекта со значением силы $8/9$ от величины силы отрыва зонда от поверхности объекта. В этом случае постоянное значение измеряемого модуля упругости клеток и высокоэластичных материалов обнаруживается на глубинах внедрения значительно меньших радиуса наконечника зонда (5-15 нм при величине модуля упругости менее 100 МПа) [5, 7].

4. На примере данных наноиндентирования методом атомно-силовой спектроскопии тромбоцитов показано, что выбор модели Герца или ДКР и соответствующих им точек контакта имеет большое значение при оценке величины модуля упругости исследуемого материала. Средние значения модуля упругости фиксированных глутаровым альдегидом и высушенных на воздухе тромбоцитов составили для моделей Герца и ДКР (137 ± 8) и (103 ± 6) МПа, поверхностная плотность адгезионной энергии – (115 ± 3) мДж/м². В рамках модели Герца среднее значения модуля упругости на 33% больше результата, получаемого согласно модели ДКР с выбором точки контакта на кривой отвода со значением силы притяжения, равным $8/9$ от величины силы отрыва зонда от поверхности клетки. Не установлено достоверных различий в величине удельной плотности адгезионной энергии участков поверхности тромбоцитов с разными модулями упругости [7].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Разработанные методики могут быть использованы для повышения точности и улучшения воспроизводимости результатов измерения модуля упругости биологических клеток и высокоэластичных материалов методом атомно-силовой спектроскопии.

Результаты данной работы могут быть использованы также при модернизации программного обеспечения атомно-силового микроскопа для автоматизации совместной обработки множества кривых наноиндентирования, полученных методом АСС, в том числе кривых отвода при анализе механических свойств клеток с учетом сил адгезии.

Разработанные в диссертации методики и полученные результаты использованы в учебном процессе на кафедре «Микро- и нанотехника» приборостроительного факультета Белорусского национального технического университета в рамках курсов «Микро- и наномеханика» и «Техника наноконтроля».

Разработанные методики использованы при проведении исследований механических свойств биологических клеток в лаборатории нанопроцессов и технологий Государственного научного учреждения «Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси», а программное обеспечение при реализации функций статической силовой спектроскопии в многофункциональных атомно-силовых микроскопах НТ-206 и др.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ**Статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК**

1. Мохаммед, С.А.А. Влияние нагрузки в контакте зонд-образец на качество изображений в полуконтактном динамическом режиме атомно-силовой микроскопии / С.А.А. Мохаммед, Е.С. Дрозд, С.А. Чижик // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя фізіка-тэхнічных навук. – 2014. – № 3. – С. 112–116.

2. Дрозд, Е.С. Исследование влияния температуры культивирования на морфологию, механические и адгезионные свойства раковых клеток легких человека линии A549 / Е.С. Дрозд, С.А.А. Мохаммед, О.С. Спиридонова, Н.С. Кужель, С.А. Чижик // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя фізіка-тэхнічных навук. – 2014. №4. – С.93–96.

3. Дрозд, Е.С. Исследование методом атомно-силовой микроскопии влияния наночастиц на структурные и механические свойства клеток почки быка линии MDBK / Е.С. Дрозд, С.А.А. Мохаммед, С.А. Чижик, О.С. Спиридонова, Н.С. Кужель, М.Е. Мычко // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя фізіка-тэхнічных навук. – 2014. №4. – С.97–101.

4. Мохаммед, С.А.А. Новые способы обработки результатов наноидентификации методом атомно-силовой микроскопии / С.А.А. Мохаммед, Г.Б. Мельникова, А.А. Маханёк, С.А. Чижик // Наука и техника. Серия 1. Машиностроение – 2015. – № 1. – С. 52 – 60.

5. Мохаммед, С.А.А. Методические аспекты определения модуля упругости высокоэластичных материалов и биологических клеток методом силовой спектроскопии / С.А.А. Мохаммед, Г.Б. Мельникова, А.А. Маханёк, С.А. Чижик // Механика машин, механизмов и материалов. – 2015. – № 2. – С. 80–84.

6. Мохаммед, С.А.А. Методика коррекции гистерезиса пьезосканера атомно-силового микроскопа / С.А.А. Мохаммед, Г.Б. Мельникова, А.А. Маханёк, С.А. Чижик, Н.С. Кужель // Механика машин, механизмов и материалов. – 2015. – № 3. – С. 73–78.

7. Мохаммед, С.А.А. Структурно-механические свойства тромбоцитов при измерениях на воздухе методом атомно-силовой спектроскопии / С.А.А. Мохаммед, Н.С. Кужель, А.А. Маханёк, С.А. Чижик // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя фізіка-тэхнічных навук. – 2015. №4. – С.94–99.

Материалы научных конференций

8. Drozd, E. Visualization of the interaction of nanoparticles with biological cells by AFM / E. Drozd, M. Sudas, S. Mohammed, S. Chizhik // International workshop on new approaches to high-tech “Nano-design, technology, computer simulations (NDTCS ‘13)” (June 11-15, 2013, Minsk, Belarus) / Minsk, 2013. – P. 60–62.

9. Chizhik, S.A. Experimental methods of micro-and nanomechanics / S.A. Chizhik, E.S. Drozd, S.A.A. Mohammed // International conference «Shell and membrane theories in mechanics and biology: from macro- to nanoscale structures», September 16-20, 2013, Minsk, Belarus, P. 17–19.

10. Чижик, С.А. Процедура нанотомографии в атомно-силовой микроскопии / С.А. Чижик, С.А.А. Мохаммед // Приборостроение–2013: материалы 6-й Международной научно-технической конференции, 20–22 ноября 2013 года. – Минск, 2013. – С. 390–391.

11. Мохаммед, С.А. Изображения фазового контраста при исследовании биологических клеток / С.А. Мохаммед, С.А. Чижик // Материалы 12-й Международной конференции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» 11-12 апреля 2014 г. – Минск, 2014. – С. 207–210.

12. Мохаммед С.А.А. Некоторые методические аспекты калибровки атомно-силового микроскопа в режиме статической спектроскопии / С.А.А. Мохаммед, Г.Б. Мельникова, А.А. Маханёк, С.А. Чижик // Приборостроение–2014: Материалы 7-й Международной научно-практической конференции. 19-21 ноября 2014 г. – Минск, 2014. – С. 207–209.

РЭЗЮМЭ

Махаммед Салем Абдо Абдулгані

Атамна-сілавая спектраскапія біялагічных клетак з улікам гістарэзісу п'езасканера і ўплыву сілаў адгезіі

Ключавыя словы: біялагічная клетка, модуль пругкасці, атамна-сілавая мікраскапія, атамна-сілавая спектраскапія, кропка дотыку, мадэль Герца, мадэль Джонсана-Кендэла-Робертса.

Аб'ект даследавання: метады атамна-сілавой спектраскапіі.

Мэта дысертацыйнай працы: ўдасканаленне метаду атамна-сілавой спектраскапіі на этапах каліброўкі атамна-сілавога мікраскопа, нанайндэнтавання біялагічных клетак і матэматычнага аналізу эксперыментальных дадзеных.

Метады даследавання і апаратура: метады атамна-сілавой мікраскапіі, метады атамна-сілавой спектраскапіі, кампутарнае мадэляванне, атамна-сілавой мікраскоп.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Распрацавана метадыка вызначэння калібрвальнага каэфіцыента адхіляючайся сістэмы атамна-сілавога мікраскопа, больш устойлівая, чым стандартная метадыка каліброўкі па дзвум кропкам каліброўчай крывой, да ўздзеяння вібрацый; распрацаваны метады праграмнай карэкцыі гістарэзісу п'езасканера атамна-сілавога мікраскопа; паказана, што найменшая неаднароднасць модуля пругкасці біялагічных клетак па глыбіні індэнтавання забяспечваецца пры выбары кропкі нулявога ўкаранення зонда са значэннем сілы 8/9 ад велічыні сілы адрыву зонда ад паверхні аб'екта; з улікам сіл адгезіі выкананы вымярэнні модуля пругкасці некаторых тыпаў біялагічных клетак, эластычных палімерных матэрыялаў і вызначаны іх адгезійныя ўласцівасці да паверхні зонда атамна-сілавога мікраскопа.

Навізна атрыманых вынікаў вызначаецца тым, што ўпершыню тэарэтычна абгрунтаваны і практычна правераны новыя метадыкі апрацоўкі дадзеных атамна-сілавой спектраскапіі, якія маюць шэраг пераваг у параўнанні са стандартнымі: пры наяўнасці вібрацыйных перашкод паказана мэтазгоднасць згладжвання калібрвальнага крывой для атрымання калібрвальнага каэфіцыента, абгрунтаваны выбар кропкі кантакту з нулявой пачатковай дэфармацыяй доследнага аб'екта пры ўжыванні мадэляў Герца і ДКР, прапанаваны і апрабаваны метады праграмнай карэкцыі гістарэзісу п'езасканера.

Галіна прымянення вынікаў: біямеханіка клетак і высокапружкіх матэрыялаў.

РЕЗЮМЕ

Мохаммед Салем Абдо Абдулгани

Атомно-силовая спектроскопия биологических клеток с учетом гистерезиса пьезосканера и влияния сил адгезии

Ключевые слова: биологическая клетка, модуль упругости, атомно-силовая микроскопия, атомно-силовая спектроскопия, точка контакта, модель Герца, модель Джонсона-Кенделла-Робертса.

Объект исследования: метод атомно-силовой спектроскопии.

Цель диссертационной работы: совершенствование метода атомно-силовой спектроскопии на этапах калибровки атомно-силового микроскопа, наноиндентирования биологических клеток и математического анализа экспериментальных данных.

Методы исследования и аппаратура: метод атомно-силовой микроскопии, метод атомно-силовой спектроскопии, компьютерное моделирование, атомно-силовой микроскоп.

Полученные результаты и их новизна: Разработана методика определения калибровочного коэффициента отклоняющейся системы атомно-силового микроскопа, более устойчивая, чем стандартная методика калибровки по двум точкам калибровочной кривой, к воздействию вибраций; разработан метод программной коррекции гистерезиса пьезосканера атомно-силового микроскопа; показано, что наименьшая неоднородность вычисляемого модуля упругости биологических клеток по глубине индентирования обеспечивается при выборе точки нулевого внедрения зонда со значением силы $8/9$ от величины силы отрыва зонда от поверхности объекта; с учетом сил адгезии выполнены измерения модуля упругости некоторых типов биологических клеток, эластичных полимерных материалов и определены их адгезионные свойства к поверхности зонда атомно-силового микроскопа.

Новизна полученных результатов определяется тем, что впервые теоретически обоснованы и практически проверены новые методики обработки данных атомно-силовой спектроскопии, имеющие ряд преимуществ по сравнению со стандартными: при наличии вибрационных помех показана целесообразность сглаживания калибровочной кривой для получения калибровочного коэффициента, обоснован выбор точки контакта с нулевой начальной деформацией исследуемого объекта при применении моделей Герца и ДКР, предложен и апробирован метод программной коррекции гистерезиса пьезосканера.

Область применения результатов: биомеханика клеток и высокоэластичных материалов.

SUMMARY

Mohammed Salem Abdo Abdulgani

ATOMIC FORCE SPECTROSCOPY OF BIOLOGICAL CELLS IN VIEW OF THE HYSTERESIS OF PIEZOSCANNER AND THE INFLUENCE OF ADHESION FORCES

Keywords: biological cell, modulus of elasticity, atomic force microscopy, atomic force spectroscopy, contact point, Hertz model, Johnson-Kendall-Roberts model.

Object of research: method of atomic-force spectroscopy.

Aim of the thesis: improvement of the method of atomic force spectroscopy at the stages of an atomic force microscope calibration, nanoindentation of biological cells and mathematical analysis of experimental data.

Research methods and equipment: method of atomic force microscopy, method of atomic force spectroscopy, computer modeling, atomic force microscope.

Results and their novelty: The technique of determining the calibration factor of the deflection system of the atomic force microscope has been developed, more resistant to vibrations than the standard technique of calibration according to the two points of the calibration curve; method of software adjustment of the hysteresis of an atomic force microscope piezoscanner has been developed; it has been proved that the lowest variance of the computed modulus of elasticity of biological cells by depth of indentation is provided when selecting the point of zero introduction of the probe into the sample near the coordinate of the maximum attraction of the probe to the surface of the object with the value of force $\frac{8}{9}$ of the force of separation of the probe from the object surface; considering adhesion forces the modulus of elasticity of certain types of biological cells, elastic polymer materials has been measured and their adhesive properties to the surface of the atomic force microscope probe have been defined.

The novelty of the results is determined by the fact that new methods of processing atomic force spectroscopy data have for the first time been theoretically explained and practically tested, which have a number of advantages compared to the standard ones: it has been proved that in the presence of vibration noise it is reasonable to smooth the calibration curve to obtain the calibration factor, choice of the contact point with the zero initial deformation of the object during the use of the Hertz and JKR models has been proved, method of software adjustment of the piezoscanner hysteresis has been proposed and tested.

Areas of results application: biomechanics of cells and high-elasticity materials.

Научное издание

МОХАММЕД Салем Абдо Абдулгани

**АТОМНО-СИЛОВАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ
КЛЕТОК С УЧЕТОМ ГИСТЕРЕЗИСА ПЬЕЗОСКАНЕРА
И ВЛИЯНИЯ СИЛ АДГЕЗИИ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

по специальности 05.11.01 – Приборы и методы измерения

Подписано в печать 25.05.2016. Формат 60×84 $\frac{1}{16}$ Бумага офсетная. Ризография.

Усл. печ. л. 1,34. Уч.-изд. л. 1,04. Тираж 60. Заказ 478.

Издатель и полиграфическое исполнение: Белорусский национальный технический университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя
печатных изданий № 1/173 от 12.02.2014. Пр. Независимости, 65. 220013, г. Минск.