



# МИР физики и техники

О.И. Агапова, А.Е. Ефимов,  
Д.Ю. Соколов, И.И. Агапов

Сканирующая  
зондовая  
нанотомография

ТЕХНОСФЕРА  
Москва  
2016

УДК 616-07  
ББК 53.4  
А23

**Рецензенты:**

*Дебабов Владимир Георгиевич – академик РАН, д.б.н., профессор, научный руководитель ГНЦ РФ ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва.*

*Белоусов Всеволод Вадимович – д.б.н, руководитель группы биологии активных форм кислорода Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва.*

**А23 Агапова О. И., Ефимов А. Е., Соколов Д. Ю., Агапов И. И.**

**Сканирующая зондовая нанотомография**

**Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2016. – 184 с. ISBN 978-5-94836-456-8**

Монография посвящена разработанному в ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России современному методу исследования трехмерных микро- наноструктур – сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ), основанной на комбинации сканирующей зондовой микроскопии и ультрамикротомии. В книге проанализированы преимущества и недостатки СЗНТ в сравнении с другими методами анализа ультраструктуры, представлены результаты исследований трехмерной структуры различных биоматериалов и биологических объектов. Рассмотрены ключевые технические решения разработанных аппаратных комплексов для СЗНТ и криоСЗНТ и особенности их патентования. Книга предназначена для специалистов в области нанотехнологий, микроскопии высокого разрешения, структурной биологии, химии полимеров, науки о материалах и других специальностей.

**УДК 616-07  
ББК 53.4**

© 2016, Агапова О. И., Ефимов А. Е., Соколов Д. Ю., Агапов И. И.

© 2016, АО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», оригинал-макет, оформление.

**ISBN 978-5-94836-456-8**

# Содержание

Авторы.....	5
Введение.....	7
<b>Глава 1. Сравнительный анализ сканирующей зондовой микроскопии с другими существующими методами исследования.....</b>	<b>8</b>
<b>Глава 2. Идея возникновения сканирующей зондовой нанотомографии.....</b>	<b>14</b>
2.1. Техническое описание СЗНТ (ИНТЕГРА Томо).....	15
2.2. Исследование структуры смеси полимеров ABS/ПА6 (акрилонитрил-бутадиен-стирол/полиамид 6).....	24
2.3. Исследование хитиновой структуры антенных сенсилл Placodea и Coeloconica паразитической осы Cotesia glomerata.....	26
2.4. Исследование структуры цианобактерии Synechococcus.....	27
2.5. Исследование трехмерной структуры биodeградируемого клеточного матрикса из поли- $\beta$ -оксибутирата.....	29
2.6. Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка при комнатной температуре.....	30
2.7. Исследования изолированных эукариотических клеток (кардиомиоцитов и фибробластов) с помощью методики СЗНТ.....	38
<b>Глава 3. Расширение модификации СЗНТ — криоСЗНТ.....</b>	<b>45</b>
3.1. Техническое описание и работа криоСЗНТ.....	45
3.1.1. Система проведения ультрасрезов при СЗНТ в криогенных условиях.....	48
3.1.2. Система сканирования.....	49
3.1.3. Измерительный модуль СЗМ.....	52
3.1.4. Блок микропроцессорного управления.....	54
3.1.5. Последовательные этапы работы аппаратного комплекса при выполнении криоСЗНТ.....	55
3.2. Особенности проведения сканирующей зондовой микроскопии для гидратированных сред.....	59
3.3. Исследование микро- и наноструктуры тканеспецифического мелкодисперсного альгинатного матрикса с помощью сканирующей зондовой крионанотомографии.....	61
3.4. Исследования макроносителя из фиброина шелка с добавлением гидроксиапатита.....	80

3.5. Исследования пористых макроносителей на основе регенерированного шелка, модифицированных микрочастицами децеллюляризованного внеклеточного матрикса печени крысы.....	85
3.6. Исследования пористых макроносителей на основе регенерированного шелка, витализированных клетками гепатомы HepG2 человека.....	86
<b>Глава 4. Особенности патентования составных высокотехнологичных комплексов в составе микротом — сканирующий зондовый микроскоп.....</b>	<b>93</b>
4.1. Выявление отличительных признаков и технических эффектов сопряженных устройств.....	99
4.2. Особенности патентования комплекствующих для составных высокотехнологичных комплексов.....	106
4.3. Развитие стратегии доминирующего патента.....	121
<b>Заключение.....</b>	<b>125</b>
<b>Список сокращений.....</b>	<b>127</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>128</b>
<b>Приложение 1.....</b>	<b>136</b>
<b>Приложение 2.....</b>	<b>147</b>
<b>Приложение 3.....</b>	<b>161</b>
<b>Приложение 4.....</b>	<b>168</b>

## Авторы

**Ольга Игоревна Агапова** — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени акад. В. И. Шумакова» Минздрава России, специалист по трехмерному структурному анализу биополимеров, клеток и тканей.

**Антон Евгеньевич Ефимов** — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени акад. В. И. Шумакова» Минздрава России, генеральный директор ООО «СНОТРА», специалист в области разработок приборных комплексов для сканирующей зондовой нанотомографии и методик исследований наноструктуры различных материалов, автор более 30 изобретений и научных работ.

**Дмитрий Юрьевич Соколов** — главный конструктор ООО «СНОТРА», специалист по разработкам криогенных и вакуумных СЗМ систем, а также по патентованию разработок в области высоких и нанотехнологий, автор более 70 изобретений, монографий и научных работ.

**Игорь Иванович Агапов** — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией бионанотехнологий ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени акад. В. И. Шумакова» Минздрава России, специалист по молекулярной биологии, регенеративной медицине, автор более 150 научных работ и изобретений.

Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова — крупнейшее научно-практическое учреждение, выполняющее фундаментальные и прикладные исследования в области трансплантологии и искусственных органов.

ООО «СНОТРА» — малое инновационное предприятие, резидент Фонда «Сколково» в кластере Ядерных технологий, специализирующееся в области разработок и коммерциализации аппаратно-методических комплексов для сканирующей зондовой нанотомографии.

Agapova O.I., Efimov A.E., Sokolov D.Yu., Agapov I.I.

## Scanning Probe Nanotomography

**Annotation:** The book is dedicated to the modern method of investigation of three-dimensional micro- and nanostructures — scanning probe nanotomography (SPNT), which is based on the combination of scanning probe microscopy and ultramicrotomy. This method was developed in Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of Ministry of Healthcare of Russian Federation and SNOTRA LLC. innovation company (Skolkovo Foundation resident in Cluster of Nuclear Technologies). In this book authors analyze advantages and disadvantages of SPNT technique in comparison with other methods of ultrastructure analysis, present results of studies of three-dimensional structure of various biomaterials and biological objects. Key technical solutions and patenting specificities of developed integrated devices for SPNT and cryoSPNT are discussed. The book is intended for specialists in the fields of nanotechnology, high-resolution microscopy, structural biology, polymer chemistry, material science and other specialities.

### Authors

**Agapova Olga Igorevna** — PhD in Biology, researcher of Laboratory of Bionanotechnology, Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Healthcare of Russian Federation.

**Efimov Anton Evgenievich** — PhD in Physics and Mathematics, leading scientist of Laboratory of Bionanotechnology, Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Healthcare of Russian Federation, general director of SNOTRA LLC.

**Sokolov Dmitry Yurievich** — Chief designer of SNOTRA LLC.

**Agapov Igor Ivanovich** — Doctor of Science in Biology, professor, head of Laboratory of Bionanotechnology, Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Healthcare of Russian Federation

## Введение

В современном мире мультипараметрический наномасштабный анализ трехмерной структуры объектов как природного, так и искусственного происхождения является весьма актуальным. В самых различных областях, будь то биология, медицина, фармацевтика или химия, изучение материалов, веществ и комплексных конструкций на наномолекулярном уровне имеет важное значение.

В биологии исследование объектов живой природы на молекулярном и наноуровне позволяет значительно лучше понять природу и механизмы процессов, протекающих в организмах, дает возможность увидеть наномасштабное строение отдельных частей объектов и их структуру. Приоритетным является изучение биологических объектов в их нативной форме, т.е. максимально приближенной к тому состоянию, в котором они находятся в природе. В связи с этим важны разработка и поиск технологий, позволяющих проводить исследования с минимальными изменениями природной структуры, в любом ее состоянии, будь то твердое, жидкое или гелеобразное. В медицине приборы и методики с такими характеристиками делают возможным создание новых биологических материалов и биоинженерных конструкций для заместительной и регенеративной медицины. Благодаря таким разработкам могут создаваться максимально эффективные лекарственные препараты, обладающие четко направленным действием и вводимые в организм безоперационными, инъекционными путями, с минимальными повреждениями целостности тканей. В области химии, смежных и связанных с ней областей понимание строения наноструктуры веществ помогает в разработке уникальных материалов, которым можно задавать необходимые физические, механические и химические свойства для различного рода и вида изделий.

# ГЛАВА I

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ С ДРУГИМИ СУЩЕСТВУЮЩИМИ МЕТОДАМИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для микроскопических исследований конструкций из полимерных материалов с витализированными клетками, биodeградируемых клеточных носителей, гидратированных гелевых биоматериалов необходимо сохранять их нативную структуру на уровне отдельных макромолекул как во время измерений, так и в процессе подготовки объекта.

Методы просвечивающей электронной микроскопии и электронной томографии [1], [2], [3], [4], [5] и их сочетание с корреляционными оптическими методиками [6], [7], [8] имеют как свои достоинства и преимущества, так и недостатки, например высокая стоимость оборудования, трудоемкость работы [9], [10], а также ограничения, связанные с физическими принципами измерений и формированием контраста в этих методах. Кроме того, электронная микроскопия дает возможность восстанавливать трехмерную структуру объекта при срезах не более 300 нм, что ограничивает возможности исследования, например, клеточных носителей.

Объединение техники сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и травления поверхности фокусированным ионным пучком (ФИП) является одним из наиболее перспективных методов.



Восстановление трехмерной структуры осуществляется с помощью последовательных СЭМ-изображений поверхности, которые получают после стравливания слоев материала ионным потоком с поверхности объекта. Метод эффективен при работе с большим количеством материалов и объектов [11], [12], но воздействие электронных и ионных пучков, а также вакуумные условия могут оказывать структурные изменения, например, в биологических образцах, что является недостатком при исследовании [13].

Для изучения полимеров, клеточных носителей, биоматериалов на микроуровне [14], [15], [16] широко применяется рентгеновская томография, однако она не позволяет получать на такого рода объектах разрешение в десятки нм; кроме того, для получения максимального разрешения с использованием данного метода размер образца не должен превосходить 1 мкм [17], [18].

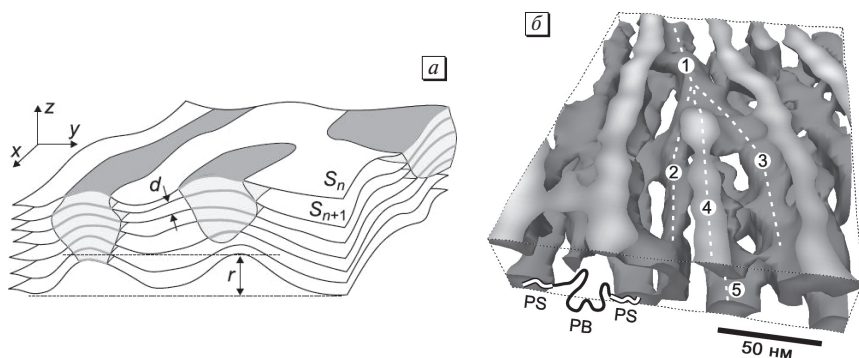
Такие ограничения рентгеновской и электронной томографии весьма неудобны при анализе биологических и полимерных материалов из легких химических элементов. Избежать подобных ограничений возможно с помощью методов сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ). Такой анализ структуры поверхности позволяет осуществлять исследование с наноразрешением [19], [20], при этом не разрушая образец химической фиксацией и не нанося повреждения электронным пучком, а также помогает избежать слабого электронно-микроскопического контраста [21], [22]. Кроме того, СЗМ позволяет анализировать поверхность несколькими методиками: изображение фазы, распределение электрической проводимости [23], [24], метод измерения силовых кривых, магнитная [25] или электростатическая силовая микроскопия, химическая силовая микроскопия [26], [27].

Принцип сканирующей зондовой нанотомографии заключается в серии последовательных измерений поверхности образца после удаления сверхтонких поверхностных слоев материала, после которых выполняется воссоздание трехмерного томографического изображения путем объединения серий двухмерных СЗМ-изображений. Существует несколько способов удаления верхних слоев образца:

плазменное или химическое травление, механическое удаление с использованием жесткого зонда СЗМ, срез ультрамикротомом.

Впервые томографическая трехмерная реконструкция на основе последовательных измерений СЗМ была сделана при помощи плазменного травления [28], а также защищена патентами [29], [30]. Плазменное травление производилось *ex situ*, что предполагало перемещение образца из СЗМ в установку для травления и обратно с дальнейшей локализацией области исследования с точностью до десятков нм, что является недостатком данной методики. Спустя некоторое время, благодаря усовершенствованию методики и установки, стало возможно осуществить химическое [31] или плазменное травление поверхности образца, оставляя его в установке СЗМ. Такая методика использовалась при изучении трехмерных структур полимерных композитов, а также кости человека [32], [33].

На рис. 1.1 показан пример трехмерной реконструкции микродоменной структуры три-блок-сополимера поли-(стирен-блок-бутадиен-блок-стирена), полученной при помощи последовательных СЗМ-измерений и плазменного травления поверхности [28].



**Рис. 1.1.** *a* — схематическая иллюстрация общего принципа объемной реконструкции на основе серий последовательных СЗМ-изображений; *б* — трехмерное изображение цилиндрических полистироновых доменов в стирен-бутадиеновой матрице, реконструированное из серии фазовых и топографических изображений. Реконструированный объем  $200 \times 160 \times 45 \text{ нм}^3$

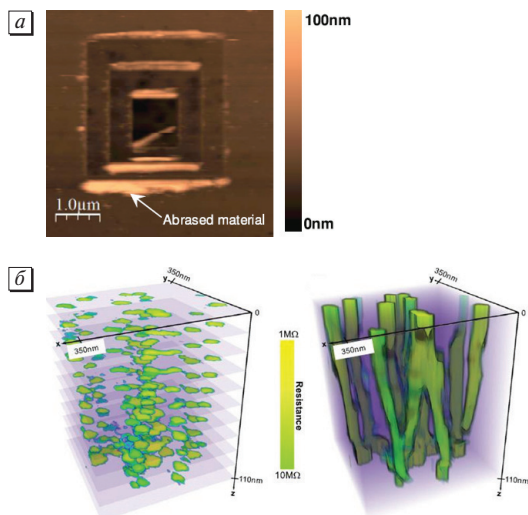
В данном исследовании для трехмерной реконструкции слои средней толщиной 7,5 нм 13 раз стравливались с поверхности. Комбинация информации о топографии и фазовом контрасте поверхности из серии полученных 14 СЗМ-изображений позволила реконструировать домены в объеме  $200 \times 160 \times 45 \text{ нм}^3$ . Трехмерная реконструкция изображений фазового контраста может быть интерпретирована как трехмерная организация цилиндрических полистироновых доменов в стирен-бутадиен-стиреновой матрице. Недостатком этого метода является то, что плазменное травление производилось *ex situ*, что, в свою очередь, требовало перемещения образца из СЗМ в установку для травления и обратно и последующей локализации области измерений с точностью до десятков нм.

Недостатком удаления верхних слоев образца плазменным травлением при низком давлении является отличие скорости травления различных компонентов или фаз в сложных гетерогенных, гибридных полимерных системах, что ведет к ошибке определения вертикального положения зон поверхности при реконструкции. В связи с этим такая методика не подходит для исследования микро- и нанопористых биоматериалов.

Другая методика предполагает последовательное удаление тонких слоев поверхности образца зондом СЗМ и дальнейшими измерениями поверхности. В работе проводящий алмазный зонд, легированный бором, использовался как для удаления слоев, так и для измерений структуры из многостенных углеродных нанотрубок в матрице из оксида кремния [34]. Результат трехмерной реконструкции локальной проводимости нанотрубок представлен на рис. 1.2.

Такой подход осуществим на стандартной установке СЗМ, но не подходит для мягких полимерных и биополимерных материалов, а также для микро- и нанопористых материалов.

На данный момент существуют и другие устройства и методики, позволяющие изучать микроструктуру объектов, измеряя и визуализируя полученные данные о внутренней морфологии образца как в двухмерных, так и трехмерных изображениях, например микрокомпьютерная томография (МКТ) [35], предназначенная для того,



**Рис. 1.2.** *а* — топографическое СЗМ-изображение области измерений после трехмерной реконструкции, демонстрирующее последовательную эрозию материала зондом при сканировании; *б* — индивидуальные карты двумерных распределений проводимости, объединенные в вертикальный стек (слева) и реконструированное трехмерное томографическое изображение многостенных нанотрубок в матрице оксида кремния (справа)

чтобы дополнить сканирующую электронную микроскопию благодаря трехмерной микроскопии. МКТ позволяет получать информацию о внутренней микроструктуре объекта, при этом не разрушая структуру и не требуя дополнительной подготовки образца, внутренняя морфология исследуется в двухмерном и трехмерных режимах, а получаемые реалистичные модели могут использоваться для виртуального изучения объекта. Визуализация при МКТ может осуществляться в виде трех ортогональных сечений, а также срез за срезом, что делает данное устройство схожим по качеству получаемых результатов с ультрамикротомом. Однако МКТ не позволяет исследовать объекты в жидком состоянии или состоянии геля, что возможно при использовании криоультрамикротомии, а также не дает возможности оценить взаимосвязанность нанопор, что играет важную

роль при использовании исследуемых материалов в регенеративной медицине.

Также одной из методик, используемых для локального анализа материалов, является ФИП (фокусируемый ионный пучок) [12]. Принцип его работы схож с электронным микроскопом, разница в том, что в ФИП используется ионный пучок. Еще одно отличие состоит в том, что метод ФИП разрушает образец путем вырывания атомов объекта при ударе ионов галлия о его поверхность. А за счет того, что в процессе обработки происходит проникновение атомов гелия в толщу образца на несколько нанометров, поверхность образца приобретает аморфное состояние. Одним из преимуществ этого метода является очень тонкая обработка поверхности образца, т. е. толщина удаленного верхнего слоя может равняться размеру атома, при этом следующий слой не затрагивается. ФИП можно использовать для контролируемого травления, так как положение ионного пучка, размер и время воздействия хорошо регулируются. При использовании данной методики возможно травление до нанометрового масштаба. В этом ФИП имеет преимущество перед нашим методом, так как толщина слоя, подвергающегося травлению, составляет не менее 2 нм, в то время как толщина среза криоультрамикротомом больше 10 нм. Кроме того, при СЗНТ можно исследовать лишь те виды материалов, которые пригодны для резки алмазным ножом, в то время как ФИП можно использовать практически для любого вида материалов, пригодного для ионного фрезерования. Однако при исследовании криоСЗНТ не происходит радиационного повреждения образца, отсутствует поверхностная молекулярная модификация образца, а также не происходит изменений его химического состава, что является важным фактором при исследовании биологических образцов, так как важно сохранить при исследовании их нативную структуру и свойства. Кроме того, наша методика позволяет исследовать большую площадь поверхности блока и не требует долгой предварительной подготовки образца, в отличие от ФИП, где пробоподготовка занимает несколько часов с использованием специальных методов.