

03;11

## Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа

© Д.В. Лебедев, А.П. Чукланов, А.А. Бухараев, О.С. Дружинина

Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского КазНЦ РАН  
Казанский государственный университет  
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН  
E-mail: denis.lebedev@bk.ru

Поступило в Редакцию 14 ноября 2008 г.

Для получения более точных значений модуля Юнга с помощью атомно-силового микроскопа и предотвращения повреждения поверхности биологических объектов в жидкой среде использовался специально созданный зонд, на вершине которого был закреплен шарик диаметром  $5\ \mu\text{m}$ . Использование такого зонда позволило зарегистрировать *in situ* увеличение модуля Юнга кровеносного сосуда крысы при воздействии на него хлоргексидина.

PACS: 68.37.Ps

Интенсивное развитие сканирующей зондовой микроскопии в последнее десятилетие привело к возникновению новых методов исследования свойств поверхности. К таким методам относится, среди прочих, и атомно-силовая спектроскопия (АСС), позволяющая проводить измерение модуля упругости (модуля Юнга). В основе этого метода лежит измерение степени деформации поверхности при ее взаимодействии с вершиной зонда атомно-силового микроскопа (АСМ). Высокое пространственное разрешение АСС в совокупности с простотой подготовки образцов и возможностью работы в жидкой среде делает этот метод хорошим инструментом для исследований в области биологии, медицины и фармакологии [1,2].

Довольно часто прямой „мишенью“ лекарственного препарата вне зависимости от его фармакологического действия является клеточная мембрана [3]. Важно отметить, что по современным представлениям

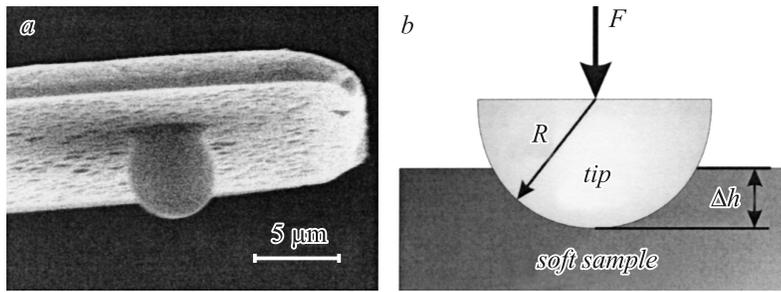
структурные трансформации в мембране, например изменение проницаемости, приводят к изменению ее упругости. В связи с этим представляется интересным применить АСС для измерений *in situ* модуля Юнга биологических объектов в условиях, максимально близких к естественным, когда на них воздействуют химические вещества или лекарственные препараты.

Однако при использовании стандартных зондов (кантилеверов), применяемых в АСМ, довольно сложно получить количественные значения модуля Юнга, так как точная форма вершины каждого конкретного зонда неизвестна (обычно зонд представляет собой конус, радиус закругления при вершине которого может иметь значения от 10 до 50 nm). Еще один недостаток стандартных зондов проявляется при измерении упругости мягких биологических объектов (клеток, бактерий) в жидкой среде (например, в физиологическом растворе). Поскольку стандартные АСМ-зонды характеризуются малым радиусом закругления, то даже при сравнительно небольшом надавливании на поверхность можно легко разрушить живую клетку, проткнув ее мембрану кончиком зонда [4].

Настоящая работа посвящена АСС-измерениям *in situ* модуля Юнга поверхности кровеносного сосуда в жидкой среде при воздействии на него препарата, изменяющего упругие свойства приповерхностного слоя. Для получения более точных количественных данных и предотвращения повреждения поверхности использовался специально созданный АСМ-зонд, на вершине которого был закреплен шарик диаметром 5  $\mu\text{m}$ .

В основе метода АСС лежит регистрация так называемых „силовых кривых“, которые отражают отклонение гибкой балки АСМ-зонда при взаимодействии вершины зонда с поверхностью в зависимости от расстояния между ними [5]. Отклонение балки от положения равновесия детектируется с помощью четырехсекционного фотодиода, в центр которого падает отраженный от балки лазерный луч, и выражается через ток рассогласования между верхней и нижней секциями фотодиода.

Для расчета абсолютного значения модуля Юнга по силовым кривым была использована модель Герца [6], в которой рассматривается взаимодействие жесткой полусферы (в нашем случае АСМ-зонд) и бесконечной плоскости (поверхность биологического образца) (рис. 1, *b*). В этом случае сила взаимодействия зонда в зависимости от глубины



**Рис. 1.** *a* — изображение балки зонда с кварцевым шариком на конце, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа; *b* — схема взаимодействия полусферы с бесконечной плоскостью в рамках модели Герца.

его проникновения в плоскость определяется выражением

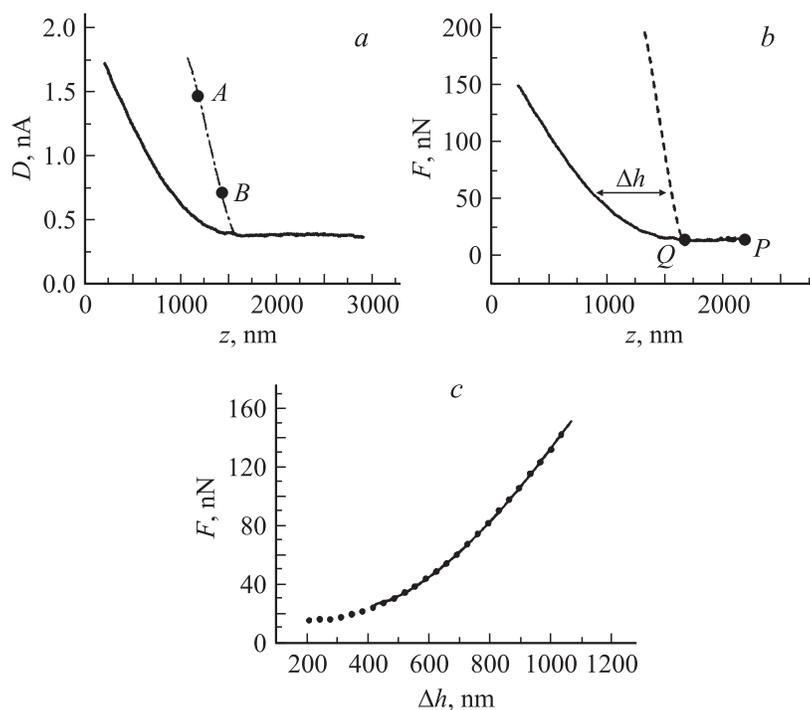
$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} E^* \Delta h^{3/2}, \quad (1)$$

где  $F$  — сила, действующая на образец;  $R$  — радиус закругления зонда;  $\Delta h$  — глубина проникновения зонда в поверхность образца;  $E^*$  — эффективный модуль Юнга системы игла–образец определяется по формуле

$$\frac{1}{E^*} \approx \frac{1 - \mu_{tip}^2}{E_{tip}} + \frac{1 - \mu_{soft}^2}{E_{soft}}. \quad (2)$$

Здесь  $E_{tip}$  и  $E_{soft}$  — модуль Юнга зонда и образца соответственно (в нашем случае  $E_{tip} \gg E_{soft}$ );  $\mu$  — коэффициент Пуассона. В силу того, что коэффициент Пуассона имеет значения, лежащие в интервале от 0 до 0.5 ( $0 \leq \mu_{soft} \leq 0.5$ ), погрешность, вносимая им, пренебрежимо мала. За счет этого можно упростить выражение (2) до вида  $E^* \approx E_{soft}$ .

Для получения значений модуля Юнга с использованием модели Герца следует преобразовать „силовые кривые“, получаемые в эксперименте. С этой целью осуществляется переход от системы координат  $D-z$  к системе  $F-\Delta h$  (рис. 2, *a-b*), где  $D$  — ток рассогласования фотодиода;  $z$  — расстояние, на которое перемещается кантилевер пьезосканером АСМ при подводе к поверхности. Такое преобразование



**Рис. 2.** *a* — силовые кривые, полученные из АСС эксперимента в координатах  $D-z$ : сплошная кривая — биологический объект, штрихпунктирная — стекло,  $A-B$  — прямолинейный участок, по которому рассчитывается тангенс угла наклона; *b* — силовые кривые в координатах  $F-\Delta h$  после преобразования по формуле (3): сплошная кривая — биологический объект, пунктирная — стекло. Участок  $Q-P$  соответствует отсутствию взаимодействия зонда с поверхностью; *c* — зависимость силы, действующей на образец, от глубины проникновения зонда в образец (точки) и результат аппроксимации этой зависимости функцией (1) — сплошная линия.

необходимо, так как отклонение балки от положения равновесия регистрируется с помощью четырехсекционного фотодиода и выражается через ток рассогласования между верхней и нижней секциями. Данный переход осуществляется в несколько этапов. В первую очередь, надо перевести сигнал рассогласования фотодиода в силу взаимодействия по

формуле [7]:

$$F = \frac{k_{tip}}{a} D_{soft}, \quad (3)$$

где  $k_{tip}$  — коэффициент жесткости АСМ-зонда;  $D_{soft}$  — ток рас­согласования фото­диода, полученный на биологическом образце;  $a = D_{glass}/z_{glass}$  — тангенс угла наклона на линейном участке  $A-B$  си­ловой кривой, полученной на стекле (рис. 2,  $a$ ). Параметр  $a$  показывает, на сколько изменяется ток рас­согласования фото­диода в зависимости от того, как сильно прогибается балка кантилевера.

Для дальнейших расчетов модуля Юнга на одном графике строятся силовые кривые, полученные на исследуемом образце и на стекле (ре­перная кривая). При определении момента касания зондом поверхности (точка  $Q$ ) предполагается, что пока участки  $Q-P$  кривой, полученной на стекле, и кривой, полученной на биологическом образце, совпа­дают, зонд не коснулся образца (рис. 2,  $b$ ). При совмещении кривых в точке касания  $Q$  (рис. 2,  $b$ ) разность перемещений пьезосканера ( $z_{glass} - z_{soft}$ ), при которых зонд оказывает одинаковое давление на стекло и мягкий биологический образец, показывает, на какую глубину ( $\Delta h$ ) зонд проникает в поверхность исследуемого образца. После этого строится зависимость силы, действующей на образец, от глубины про­никновения в образец зонда —  $F(\Delta h)$ . Для нахождения  $E^*$  полученная зависимость аппроксимируется формулой (1) с использованием метода наименьших квадратов (рис. 2,  $c$ ). Значение параметра  $E^*$ , при котором экспериментальная и расчетная кривые совпадают, соответствует абсо­лютному значению модуля Юнга исследуемого объекта (при условии, что  $E^* \approx E_{soft}$ ).

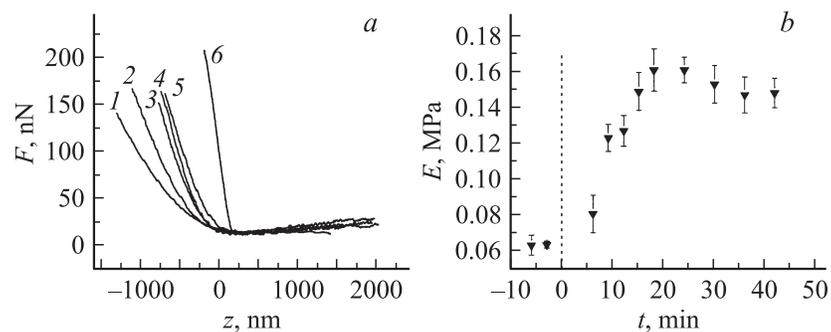
Данный метод определения модуля Юнга поверхности является относительно простым с теоретической точки зрения, однако для получения количественных данных желательно, чтобы АСМ-зонд пред­ставлял собой шарик известного диаметра.

Главное отличие созданных нами зондов от стандартных состоит в том, что вместо обычной острой конической иглы на кантилевере закреплен шарик из кварцевого стекла с диаметром  $5 \mu\text{m}$ . Для получе­ния таких зондов использовался атомно-силовой микроскоп „Solver-Bio“ (фирмы НТ–МДТ), оснащенный оптическим микроскопом с ССD каме­рой. Изготовление зонда включает несколько последовательных этапов: 1) на стеклянную подложку высаживаются отдельно лежащие кварце­вые шарики с последующим высушиванием; 2) на другую часть той

же стеклянной подложки наносится небольшое количество эпоксидного клея; 3) специальный tipless кантилевер (без выращенного на вершине зонда, марки CSC12 фирмы MikroMasch, жесткость  $k_{tip} = 0.6 \text{ N/m}$ ) устанавливается в держатель АСМ, пьезосканер которого используется в качестве прецизионного манипулятора; 4) свободный конец кантилевера приводится в соприкосновение с каплей эпоксидной смолы, а затем опускается на отдельно лежащий кварцевый шарик (этот процесс контролируется с помощью оптического микроскопа); 5) на финальной стадии полученный зонд извлекается из микроскопа и оставляется до полного затвердевания эпоксидной смолы. Данный способ приклеивания шарика к концу балки близок к методу, описанному в работе [8]. Пример полученного нами зонда с шариком диаметром  $5 \mu\text{m}$  представлен на рис. 1, а.

Преимущества таких зондов очевидны: во-первых, благодаря большей контактной площади уменьшается давление на поверхность, что дает возможность проводить эксперименты на мягких биологических объектах, не повреждая их. Во-вторых, поскольку форма и размер таких зондов точно известны, то существенно повышается точность в определении величины модуля Юнга на основе модели Герца, в которой рассматривается упругое взаимодействие полусферы с плоскостью.

С помощью созданных зондов нами были проведены *in situ* эксперименты по исследованию в реальном масштабе времени упругих свойств внутренней поверхности брюшной аорты лабораторной крысы. В качестве лекарственного вещества был выбран хлоргексидин. Этот препарат является одним из наиболее активных местных антисептических средств [9,10]. Молекулярные механизмы его действия подразумевают взаимодействие молекул вещества с компонентами биологической мембраны (липидным бислоем) таким образом, что мембрана становится более плотной [11]. Для проведения эксперимента фрагмент кровеносного сосуда разрезался вдоль, разворачивался и закреплялся на твердом основании в жидкостной ячейке АСМ. Измерения проводились на атомно-силовом микроскопе „Solver-Bio“ (фирмы НТ–МДТ). Вначале была получена серия силовых кривых поверхности образца, находящегося в физиологическом растворе. Затем в жидкостную ячейку с исходным раствором вводилось  $50 \mu\text{l}$  0.05% раствора хлоргексидина, и эксперимент продолжился: на протяжении 50 min через каждые 3 min регистрировалось по 7 силовых кривых. На рис. 3, а представлен ряд



**Рис. 3.** Результаты экспериментов по измерению *in situ* модуля Юнга внутренней стенки сосуда крысы: *a* — силовые кривые, полученные из эксперимента (1 — до добавления хлоргексидина, 2–5 соответственно через 6, 12, 25 и 42 min после добавления хлоргексидина, *b* — силовая кривая, полученная на стекле); *b* — зависимость модуля Юнга от времени (хлоргексидин добавлен в момент времени  $t = 0$ ).

силовых кривых, полученных до добавления хлоргексидина, и через определенные интервалы времени после добавления хлоргексидина (для сравнения показана кривая, полученная на стекле), а результат их статистической обработки — на рис. 3, *b*. Из результатов эксперимента видно, что при взаимодействии с хлоргексидином в течении 20 min поверхность кровеносного сосуда становится более жесткой: ее модуль Юнга увеличивается с 0.065 до 0.161 МПа. Важно отметить, что точность значений модуля Юнга, получаемых описанным методом, составляет 15–20%, что является неплохим показателем для получения объективных данных об упругих свойствах биологических объектов в жидкой среде.

Таким образом, созданные нами специальные АСМ-зонды могут быть использованы для наблюдения *in situ* в реальном масштабе времени за изменением модуля Юнга находящихся в жидкой среде биологических объектов при взаимодействии последних с химическими веществами или лекарственными препаратами, изменяющими их упругие свойства. Атомно-силовая спектроскопия с использованием таких зондов может найти применение в биологии и медицине.

## Список литературы

- [1] *Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Y., Komizu H., Kusumi A.* // *Biophys J.* 1998. V. 74. N 5. P. 2171–2183.
- [2] *Alonso J.L., Goldmann W.H.* // *Life Sci.* 2003. V. 72. P. 2553–2560.
- [3] *Mouritsen O.G., Jørgensen K.* // *Pharmaceutical Research.* 1998. V. 15. N 10. P. 1507–1519.
- [4] *Bukharaev A.A., Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Ovchinnikov D.V.* // *Phys. Low-Dim. Struc.* 2003. V. 3/4. P. 31–38.
- [5] *Kurihara K.* // *Adv. in Colloid and Interface Sci.* 1997. V. 71–72. P. 243–258.
- [6] *Cappella B.* // *Surf. Sci. Rep.* 1999. V. 34. P. 1–104.
- [7] *Butt J.-J., Cappella B., Kappl M.* // *Surf. Sci. Rep.* 2005. V. 59. P. 1–152.
- [8] *Gan Y.* // *Microscopy Today.* 2005. V. 13. P. 48–49.
- [9] *Abu-Elteen K.H., Whittaker P.A.* // *Mycopathologia.* 1998. V. 140. P. 69–76.
- [10] *Audus K.L., Tavakoli-Saberi M.R., Zheng H., Boyce E.N.* // *J. Dent. Res.* 1992. V. 71 (6). P. 1298–1303.
- [11] *Стробыкина О.С., Файзуллин Д.А., Скоринкин А.И.* // Структура и динамика молекулярных систем: Сб. статей. Йошкар-Ола: МарГТУ, 2005. В. XII. Ч. 2. С. 229–232.