

На правах рукописи

Няпшаев Илья Александрович

**Атомно-силовая микроскопия механических свойств
различных наносистем**

специальность

01.04.07 - физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

- Научный руководитель: кандидат физико-математических наук, с. н. с.,
ФТИ им. А.Ф. Иоффе
Анкудинов Александр Витальевич
- Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор,
зав. кафедрой Нанотехнологий и материаловедения
НИУ ИТМО
Голубок Александр Олегович
- доктор физико-математических наук, в. н. с.
ФТИ им. А.Ф. Иоффе
Марихин Вячеслав Александрович
- Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
высшего профессионального образования и науки
Санкт-Петербургский Академический университет —
научно-образовательный центр нанотехнологий
Российской Академии наук

Защита состоится «17» октября 2013 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.205.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, расположенном по адресу: 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФТИ им. А.Ф. Иоффе.

Автореферат разослан «10» сентября 2013 г.

Отзывы и замечания по автореферату в двух экземплярах, заверенные печатью, направлять по вышеуказанному адресу на имя ученого секретаря диссертационного совета.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.205.01,
кандидат физико-математических наук



А.А. Петров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Атомно-силовой микроскоп (АСМ) с самого своего появления стал важнейшим научно-исследовательским инструментом в физике поверхности. Большая востребованность инструмента объясняется широким спектром АСМ методик исследования разнообразных локальных свойств поверхности образца с нанометровым пространственным разрешением. Кроме того, изучать объекты можно в разных контролируемых условиях: вакууме, обычной атмосфере, жидкости. Такой выбор не доступен для растровой электронной микроскопии, конкурирующей с АСМ по разрешению. АСМ, по сути своей, может позволять точный контроль силового взаимодействия зонда с образцом и, потому уникальным образом прекрасно подходит для исследования механических свойств нано- и микрообъектов. Реализация измерений, однако, не тривиальна и зависит от формы и размеров объектов.

Для количественно точных исследований механических свойств одномерных объектов наиболее популярна так называемая «трех-точечная» АСМ методика, в которой исследуются подвешенные нанообъекты [1, 2]. Методика успешно применялась при измерении модуля Юнга серебряных, золотых нанопроводов, полупроводниковых нановискеров на основе GaAs, полипирролловых и углеродных нанотрубок. Несмотря на то, что в этих работах отмечался большой разброс значений модуля Юнга материала в нанообъектах, систематическое изучение и анализ факторов разброса не проводился. Он может, например, быть связан с погрешностью калибровки жесткости кантилеверного датчика силы, с ошибкой в определении геометрических параметров нанообъектов, с условиями закрепления подвешенных нанообъектов.

При определении с помощью АСМ механических свойств двух- и трехмерных наносистем, к которым можно отнести полимерные пленки субмикронной толщины и биологические объекты, важную роль играет информация о форме и размерах кончика зонда, от которой прямо зависит количественный уровень данных. Для повышения точности и надежности измерений, необходимы не стандартные коммерчески доступные зонды нанометровой остроты, а АСМ зонды с гарантированной калиброванной формой и возможностью выбрать оптимальный размер кончика. Например, для адекватной реализации измерений механических свойств методом АСМ индентирования, размеры кончика должны быть сопоставимы с толщиной исследуемых пленок, то есть лежать в субмикронном диапазоне. Принципиальная возможность работы в жидких средах с нанометровым пространственным разрешением делает АСМ уникальным прибором для биологических исследований. Из биологических образцов выделяются живые клетки, так как их изучение, без сомнения, чрезвычайно интересная задача современной науки. Особенно актуальны исследования по точной характеристике индивидуальных механических свойств, которые могут служить важнейшими индикаторами злокачественного перерождения и трансформации клетки [3]. Например, возможное изменение морфологии рельефа и механических свойств кровяных клеток, вызванное применением лекарственных препаратов, может нарушить естественный кровоток в организме человека. Как и в случае двумерных объектов, при АСМ исследовании трехмерных биологических клеток возникают трудности количественной характеристики мембранных и субмембранных структур нанометровых размеров, отвечающих за важные химико-биологические процессы, и определяющих рельеф и механические свойства клетки. Дополнительно возникает проблема сохранения целостности мягкого живого объекта. Использование доступных на рынке микроколлоидных АСМ зондов сохраняет ее целостность, но тестирование нанометровых клеточных структур становится невозможным из-за

существенного ухудшения разрешения прибора до уровня школьного оптического микроскопа. Применение же стандартных острых зондов обычно приводит к разрушению клеток [4].

Суммируя, отметим, что АСМ исследования механических свойств материалов все еще недостаточно надежны и количественны, и состояние дел в этой области требует совершенствования. С другой стороны существуют актуальные задачи, для решения которых требуется точная информация о механических свойствах нанобъектов. Например, при изучении механизмов гидротермального синтеза наноструктур [5], интересно исследовать методами АСМ индивидуальные свойства нанокристаллических продуктов, образующихся на различных стадиях синтеза. Традиционные методы определения структуры, состава, упругих постоянных решетки наноматериалов (рентгеноструктурный анализ, Рамановская спектроскопия) могут, если исследование оказывается возможным, дать только интегральную информацию. Проведение количественных АСМ исследований очень уместно при определении влияния различных дорогих микродобавок на механические свойства мягких полимерных пленок, с характерным модулем Юнга несколько мегапаскалей, когда стандартные испытания не применимы. Как было изложено выше, чрезвычайно заманчивы неразрушающие тактильные исследования живых клеток, которые можно реализовать в АСМ. В свете сказанного проведение исследований по теме «Атомно-силовая микроскопия механических свойств различных наносистем» представляется в достаточной степени актуальным.

Цель диссертационной работы заключалась в разработке количественного подхода в АСМ измерениях механических свойств нано- и микросистем, создании необходимого инструментария, применении развитого подхода для исследования механических свойств хризотилловых нанотрубок, ультратонких полисилоксановых покрытий, живых клеток эукариот.

Для достижения цели работы решались следующие **задачи**:

- Реализация «трех-точечного» метода измерений жесткости подвешенных нанобъектов на примере природных и синтезированных нанотрубок хризотила. Сравнительные исследования изгибной жёсткости этих нанотрубок. Анализ основных факторов, влияющих на точность измерений. Определение значений модуля Юнга у природных и синтетических нанотрубок хризотила.

- Разработка надежного и воспроизводимого способа создания специализированных сферических зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны для АСМ. Исследование износоустойчивости изготовленных зондов.

- Количественные исследования ультратонких пленок полисилоксановых блок-сополимеров с помощью изготовленных специальных калиброванных сферических АСМ зондов субмикронного радиуса кривизны. Изучение роли микродобавок фуллеренов в упруго-прочностных свойствах пленок.

- Апробирование изготовленных специализированных сферических АСМ зондов в сравнительном исследовании топографии и механических свойств живых биологических клеток L41 и A549.

- Исследование влияние холестерина на механические свойства живых кровяных клеток K562 с помощью специализированных сферических АСМ зондов.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- «Трех-точечный» АСМ метод подвешенного нанобъекта впервые применен для измерения изгибной жесткости и модуля Юнга природных и синтезированных нанотрубок хризотила, осажденных на трековую лавсановую мембрану. Обнаружено более чем трехкратное возрастание среднего модуля Юнга синтетического хризотила по сравнению с природным.

- Предложен и разработан новый способ создания специализированных сферических зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны для количественных АСМ исследований.

- Выявлено улучшение упругости тонких (субмикронных) поверхностных слоев блок-сополимера при введении в его объем вместе со сшивающим агентом микродобавок фуллеренов.

- Специализированные сферические АСМ зонды субмикронного калиброванного радиуса кривизны применены для исследования рельефа и механических свойств живых клеток L41 и A549.

- Проведены первые прямые количественные АСМ измерения механических свойств кровяных клеток K562 в зависимости от уровня мембранного холестерина клеток.

Научную и практическую значимость имеет представленный и обоснованный в работе результат несовпадения модуля Юнга у нанотрубок синтезированного и природного хризотила, который интересен для дальнейшей оптимизации условий синтеза. Данные, свидетельствующие о значительном улучшении относительной неупругой деформации блок-сополимеров при введении в его объем микродобавок фуллеренов, интересны для понимания и анализа катализирующих и координационных свойствах наноструктурированных аллотропных форм углерода. Результат по изменению механических свойств кровяных клеток K562 в зависимости от уровня содержания холестерина крайне важен для понимания роли холестерина во внутриклеточных процессах. До данной работы механические свойства клеток и ее мембранных и субмембранных структур в зависимости от уровня холестерина изучались только косвенными методами. В АСМ можно прямо измерить механические параметры клеток. Специализированные сферические АСМ зонды субмикронного калиброванного радиуса кривизны открывают исследователю доступ к анализу механического отклика мембранных и субмембранных структур клетки, где происходят важные химико-биологические процессы. Результаты проведенных АСМ экспериментов с живыми клетками важны для прогнозирования побочных эффектов терапии, направленной на модификацию липидного бислоя и снижение уровня холестерина. Новая информация по клеткам A549 и L41 представляет интерес для изучения влияния комплекса C₆₀/ПВП на механические свойства клеток и, как следствие, более глубокого понимания его роли в подавлении фототоксичности.

Практическая значимость диссертационной работы выражена следующим образом:

- Произведен анализ основных факторов, определяющих точность измерения механических характеристик в «трех-точечном» методе подвешенного одномерного нанообъекта цилиндрической геометрии (наностержня).

- Разработана технология, позволяющая изготавливать сферические АСМ зонды субмикронного калиброванного радиуса кривизны, которые могут быть использованы для количественных исследований механических свойств мягких объектов. Изготовленные зонды успешно применены для диагностики механических свойств ультратонких пленок полисилоксановых блок-сополимеров и биологических клеток A549, L41 и K562.

- Разработанная технология позволяет закреплять на кончике АСМ зонда частицы, диаметр которых лежит в диапазоне 50-1000 нм. Потенциально, используя данную технологию, можно создавать зонды для локальной нанометровой диагностики магнитных свойств (частицы из магнитных материалов), для регистрации отдельных спинов с помощью эффекта оптического детектирования магнитного резонанса (частицы наноалмазов с азотными вакансиями), для усиления оптического сигнала в конфокальном микроскопе интегрированном

с АСМ с помощью эффекта гигантского усиления комбинационного рассеяния света (золотые или серебряные частицы).

- Результаты данной работы использованы как фундамент для налаживания мелкосерийного производства специализированных АСМ зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны. В сотрудничестве с фирмами НТ СПб и НТ-МДТ осуществлены поставки более 500 зондов пользователям АСМ.

На защиту выносятся следующие основные **положения**:

1) Предложен способ создания износостойких и антикоррозийных АСМ зондов калиброванной геометрии и радиуса кривизны. Такие специализированные зонды позволяют проводить неразрушающие количественные АСМ исследования рельефа и механических свойств объектов малой жесткости (модуль Юнга в диапазоне 1 кПа–100 МПа), с субмикронным пространственным разрешением, и, в частности, диагностику живых биологических клеток в естественной для них жидкой среде.

2) В «трех-точечном» АСМ методе измерения жесткости подвешенных одномерных нанообъектов цилиндрической формы основной вклад в погрешность определения модуля Юнга материала дают ошибки определения диаметра нанотрубки и калибровки жесткости кантилевера.

3) Большая, по сравнению с природными (минеральными) нанотрубками, дефектность и неоднородность нанотрубок хризотила, синтезированных в гидротермальных условиях, приводит к увеличению модуля Юнга материала нанотрубки.

4) Значительное улучшение упругости тонких (субмикронных) поверхностных слоев блок-сополимера (лестничный фенилсилсеквиоксан - полидиметилсилоксан) достигается при введении в его объем, дополнительно к сшивающему агенту «винилоксиму», более 0.01% фуллеренов. Такая концентрация соответствует нахождению в характерной ячейке межблочной доменной структуры полимера нескольких молекул фуллеренов.

5) Значительный дефицит (10-20% от нормы) уровня мембранного холестерина живых клеток K562 приводит к увеличению упругого модуля поверхностных слоев клетки в 1.5 раза, что связано со снижением активности механочувствительных каналов и последующей перестройкой актиновых структур кортикального цитоскелета.

Достоверность и надежность результатов. Надежность полученных экспериментальных результатов была в существенной степени обеспечена возможностями использованного современного оборудования (АСМ, СЭМ, ФИП), а также признанным в России и за рубежом общим высоким уровнем АСМ исследований, проводимых в Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе. Достоверность результатов экспериментов обеспечена продемонстрированной воспроизводимостью измерительных данных, а также достаточно исчерпывающим анализом ошибок АСМ измерений, представленным в диссертации. Достоверность расчетных результатов механических свойств исследуемых объектов обеспечивается достаточно убедительным анализом правомерности применения модели Герца при использовании калиброванных сферических АСМ зондов с малой дисперсией размеров и формы (менее 8%), а также других использованных моделей физики упругости. Большинство полученных в работе результатов согласуются с литературными данными.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на XIII и XV международных симпозиумах «Нанофизика и Наноэлектроника» (Нижний Новгород, 2009 и 2011); на конференциях по физике и астрономии для молодых ученых Санкт-Петербурга и Северо-запада «Физика СПб» (Санкт Петербург, 2009, 2010, 2011); XXXVII Summer School “Advanced

Problems in Mechanics”(Saint Petersburg, 2009); на международной зимней школе по физике полупроводников (Санкт-Петербург, 2010); XXIII российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 2010); на международной школе-конференции молодых учёных и специалистов "Современные проблемы физики" (Минск, 2010); 2-ой Уральской школе «Современные Нанотехнологии. Сканирующая Зондовая Микроскопия» (Екатеринбург, 2011); на международной зимней школе по физике полупроводников (Санкт-Петербург, 2012, приглашенный доклад) и обсуждались на семинарах в ФТИ им. А. Ф. Иоффе и НИУ ИТМО.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК, список статей приведен в конце автореферата.

Технология специализированных сферических зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны для АСМ **запатентована**: патент RU 2481590 «Способ изготовления коллоидного зондового датчика для атомно-силового микроскопа» (авторы: Анкудинов А.В., Быков В.А., Няпшаев И.А., Шубин А.Б., Сафронова О.В.), дата приоритета 17.08.2010.

Методы исследования. Все АСМ результаты получены на отечественном оборудовании фирмы НТ-МДТ, сканирующей зондовой лаборатории NTEGRA AURA. Из вспомогательного оборудования в работе использовались растровый сканирующий и просвечивающий микроскопы (СЭМ и ПЭМ, соответственно), фокусируемый ионный пучок (ФИП), а также установка для проведения рентгеноструктурного микроанализа (РСМА). СЭМ тестирование и ФИП обработка были произведены в Научно-образовательном центре НИУ ИТМО по направлению нанотехнологий. ПЭМ снимки были сделаны в лаборатории Конникова С.Г. ФТИ им. А.Ф. Иоффе, РСМА проводился в лаборатории Гусарова В.В. ФТИ им. А.Ф. Иоффе.

Личный вклад автора заключался в проведении всех АСМ экспериментов, результаты которых приведены в данной работе. Автор - один из разработчиков способа создания специализированных сферических АСМ зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны - активно участвовал в обсуждении, анализе полученных результатов, а также в написании и подготовке статей и патента.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и библиографического списка из 164 наименований. Основной текст работы изложен на 156 страницах, включает в себя 6 таблиц и 50 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение содержит обоснование актуальности, научной новизны и практической ценности работы, формулировку цели и задач исследования. Также изложены основные положения, выносимые на защиту, кратко описана структура диссертации.

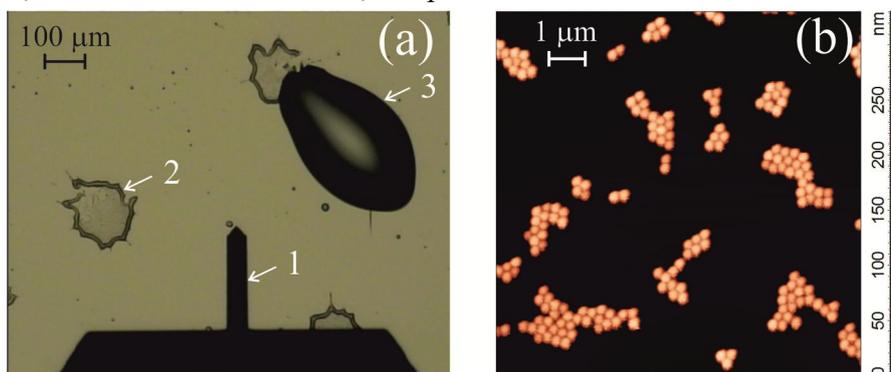
В первой главе, литературном обзоре, отражено современное состояние дел по измерению механических свойств мягких объектов с помощью АСМ, подробно описаны варианты измерений механических свойств нано- и микрообъектов, преимущества АСМ перед другими методами, трудности АСМ измерений механических характеристик. Глава завершается постановкой задач для диссертационной работы.

Во второй главе приведено подробное описание способа изготовления специализированных сферических АСМ зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны. Альтернативные варианты изготовления похожих зондов, например, путем затупления во время сканирования или с помощью ионного пучка, не позволяют гарантировать калиброванную форму и размеры. Наиболее близок к нашему метод создания зондов с калиброванной сферической частицей диаметром более 3 мкм, [6]. В этом методе используется оптический микроскоп для точного контроля позиционирования и закрепления частицы.

Дифракционный предел накладывает соответствующие ограничения на радиус прикрепляемых частиц. Рассмотренный в нашей работе способ позволяет прикреплять частицы с радиусом существенно меньшим дифракционного предела, а именно в диапазоне 50-250 нм. Основная идея заключается в закреплении субмикронной частицы на кончик иглы АСМ зонда с помощью самого АСМ. В качестве частиц в работе использовались SiO₂ гранулы, с дисперсией размеров менее 5-8%, водные коллоиды которых были изготовлены в ФТИ им. А.Ф. Иоффе, [7].

Чтобы закрепить субмикронную гранулу на кончик иглы АСМ зонда, нужно осуществить четырех - стадийный процесс. На первой стадии водный коллоид с гранулами (для примера выбраны монодисперсные сферические гранулы из α-SiO₂ радиусом 125 нм) распылялся на Si очищенную подложку с естественным окислом. Массовая доля водного коллоида с гранулами составляла 0.5%; делалось это для того, чтобы гранулы распылялись на подложку, преимущественно, не плотным монослоем, см. рис.1.

Рис.1. а) «Рабочее место». Стрелками указаны: 1 – АСМ кантилевер; 2 - агломерат SiO₂ гранул радиусом 125 нм на Si подложку; 3 - жидкая капля клея. б) Полуконтактное АСМ изображение участка поверхности с гранулами.



На второй стадии происходит обработка кончика АСМ зонда в клеящем материале. Используются небольшие капли клея, например указанные стрелкой 3, рис.1а. Обработку кончика АСМ зонда можно контролировать с помощью оптического микроскопа и по сигналу DFL горизонтального отклонения консоли АСМ. Необходимое время обработки немного зависит от жесткости консоли используемого зонда и от размера капли, и составляет около 10 секунд, для контактных, и около 20 секунд для полуконтактных зондов.

Необходимо, чтобы обработанный зонд оставался работоспособным, что выявляется по последующим успешным АСМ измерениям на третьей стадии, см. 125 нм гранулы на рис. 2а. В правом углу этого изображения подходящая для закрепления одиночная гранула. Кончик зонда в полуконтактном режиме помещался в начало штриховой стрелки, указанной на рисунке. Затем АСМ переводился в контактный режим с уровнем силы прижима более 100 нН и производилось перемещение зонда вдоль штриховой стрелки (через гранулу). Полуконтактное АСМ изображение того же участка сканирования, полученное после манипуляции, позволяет предположить, что выбранная гранула приклеилась к передней грани пирамиды зонда, см. рис. 2б. Есть, в частности, два свидетельства: во-первых, гранула с которой производилась манипуляция, исчезла; во-вторых, появилось характерное двойное изображение гранул в изображении.

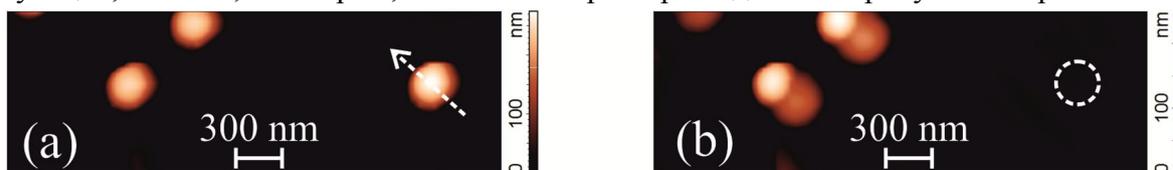


Рис.2. 3 стадии, крепление субмикронной гранулы на кончик АСМ зонда: полуконтактные изображения участков поверхности с гранулами до манипуляции (а), и после манипуляции, (б). Траектория зонда во время манипуляции задана стрелкой на (а). На (б) штриховой окружностью показано местоположение гранулы до прикрепления.

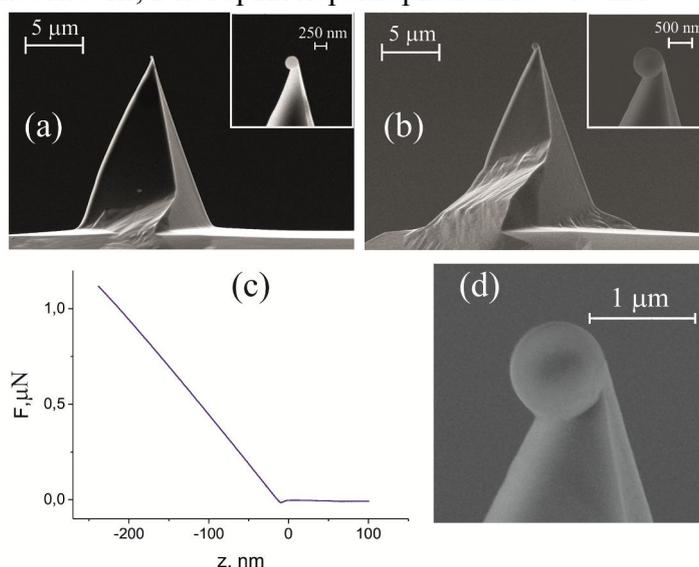
На заключительной стадии зонд отводится от поверхности, и осуществляется отверждение клея. Оптический клей UV 50, который использовался в данной работе, по

паспортным данным затвердевает под воздействием ультрафиолетового излучения с длиной волны 365 нм при интенсивности 10 мВт/см² менее чем за 10 секунд.

Способ создания специализированных сферических зондов с калиброванным радиусом кончика в диапазоне 250-500 нм отличается по сравнению с гранулами радиусом 50-250 нм только ходом первой стадии. С ростом размера увеличиваются силы сцепления гранул с подложкой и друг с другом. Последнее существенно, так создает проблемы при манипуляции гранулами. Поэтому водный коллоид с гранулами дополнительно разбавлялся чистой дистиллированной водой до массовой доли гранул в растворе 0.2%, что позволяло осаждать одиночно стоящие гранулы, см. рис.2b.

После завершения всех стадий проводились СЭМ исследования, подтверждающие, что гранулы радиусом 125 нм, 325 нм и 450 нм, действительно прикрепились на самые кончики передней части пирамид зондов, см. рис.3а, b и d, соответственно. Такие зонды тестировались на износостойчивость. Зонд вдавливался в поверхность Si или поликарбоната с нагрузкой более 1000 нН, см. рис.3с. СЭМ изображения, сделанные после теста, см. рис.3d, подтверждали сохранность и надежное закрепление гранулы на кончике зонда при прогнозируемых нагрузках. Такого запаса прочности изготавливаемых зондов с избытком хватало для проведения механических измерений объектов малой жесткости, в которых характерная сила <10 нН.

Рис.3. СЭМ фотографии специализированных зондов с коллоидной SiO₂ гранулой радиусом 125 нм (а) и 325 нм (b). На вставках приведены увеличенные СЭМ изображения кончиков зондов с гранулами. с) Кривая индентации специализированного зонда с гранулой радиусом 450 нм на Si; d) СЭМ фотография кончика этого зонда после проведения индентационного теста (с).



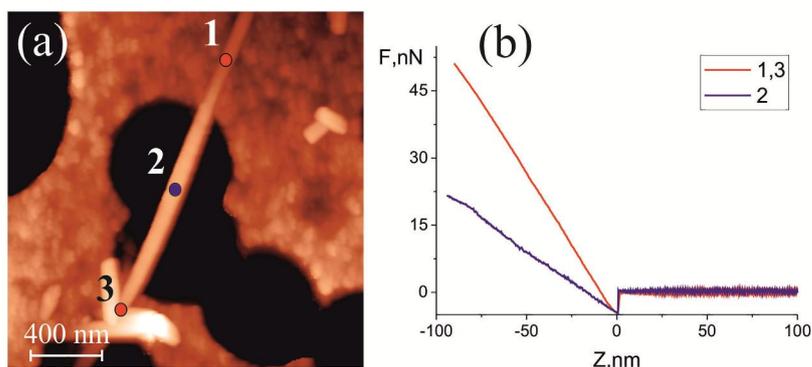
По сравнению с микроколлоидными зондами, основным очевидным преимуществом специализированных зондов являются их на порядок меньшие размеры. Это позволяет сохранять пространственное разрешение АСМ на наноуровне. Незначительная дисперсия размеров, <8%, и калиброванная форма использованных SiO₂ гранул гарантирует одинаковые параметры зондов-инденторов. Сферическая форма индентора отвечает требованиям простой модели Герца. Субмикронный диапазон радиусов 50-500 нм предоставляет возможность исключить влияние подложки в исследовании ультратонких пленок. Варьирование размера гранулы в субмикронном диапазоне позволяет осознанно настраивать инструмент для неразрушающих исследований рельефа и механических свойств живых клеток, модуль Юнга которых может лежать в диапазонах 1-100 кПа. Информативное тестирование клеток таким зондом происходит при субмикронной глубине индентации, что открывает доступ к субмембранным структурам, интерес к которым в клеточной биологии и вирусологии чрезвычайно высок.

В третьей главе представлены результаты измерений механических свойств синтезированных и природных нанотрубок хризотила Mg₃Si₂O₅(OH)₄ с помощью «трех-

точечного» АСМ метода подвешенного нанобъекта. Такие исследования актуальны, так как хризотилловые нанотрубки имеют перспективы в разработке новых нанокompозитов. Интересно также сравнение механических свойств синтезированных и природных нанотрубок.

Механические свойства хризотилловых наносвитков определялись «трех-точечной» методикой. Простая реализация методики получалась на трековой лавсановой мембране со средним диаметром пор 0.6 мкм. На эти мембраны аэрозольным способом распылялись водные суспензии с нанотрубками двух видов. 1) Природные нанотрубки изготавливались расщеплением пучков минерала хризотила по методике, описанной в [8]. 2) Синтезированные нанотрубки получались гидротермальным методом в водном растворе, условия синтеза выбирались на основе результатов работы [5], исходя из принципа формирования наиболее совершенных по строению наносвитков цилиндрической формы. После нанесения суспензии образцы сушились в течение суток в обычных атмосферных условиях при относительной влажности около 40%.

Рис.4. АСМ изображение синтетической нанотрубки хризотила (а), сформировавшей мостик над порой. Цифрами указаны точки измерения локальной жесткости, по значениям которой определялась изгибная жесткость мостика; б) Силовые зависимости, измеренные в указанных на (а) точках.



После нанесения часть нанотрубок перекрывала субмикронные поры в трековой мембране, образуя тем самым «наномостики» (нанотрубка полностью перекрывает пору в мембране), см. рис.4, или «консоли» (один конец свободно свисает над порой, другой на мембране). Вдоль таких «консолей» или «наномостиков» измерялась серия АСМ силовых кривых (зависимость силы F , с которой зонд давит на нанобъект, прогибая его, от вертикальной z координаты образца). Локальная изгибная жесткость подвешенного нанобъекта вычислялась по следующему выражению:

$$k_s = k_c \cdot \frac{S}{S_0 - S}, \quad (1)$$

где S – тангенс наклона $F(z)$ на участке нанотрубки над порой, см. точку 2 на рис.4б; S_0 – тангенс наклона $F(z)$ на твердой подложке (или на участке нанотрубки над твердой подложкой, при условии, что деформация нанотрубки при этом отсутствует), см. точки 1 и 3 на рис.4б; k_c – жесткость зонда, определяемая по алгоритму Садера [9].

Модуль Юнга нанотрубок кольцевого сечения рассчитывался по теории упругости [10] и значению изгибной контактной жесткости k_s в середине наномостика или на конце консоли:

$$E_s = \alpha \cdot \frac{k_s}{3\pi} \cdot \frac{L^3}{D^4}, \quad (2)$$

где $\alpha = 1$ для мостика и $\alpha = 64$ для консоли; L – длина, D – внешний диаметр нанотрубки.

Измерения среднего диаметра и модуля Юнга различных нанотрубок представлены в таблице 1 на рис.5. У природных нанотрубок хризотила наблюдается меньший разброс величины внешнего диаметра, что можно связать со значительно большим временем формирования минерального материала по сравнению с синтезированным. Отметим, что статистический разброс значений модуля Юнга превышает 50%, хотя инструментальная погрешность одного измерения, как будет показано ниже, не превышала 25-35%.

Таблица 1 – Данные РСМА и результаты измерений размерных и механических свойств нанотрубок						
Объект	Элементный состав, %				Механические характеристики	
	O	Mg	Si	Mg:Si	D, нм	E _s , ГПа
Природные нанотрубки	59.3±0.4	23.9±0.4	16.8±0.1	1.42±0.03	30±3	100±60
Синтезированные нанотрубки	57.6±0.5	24.5±0.3	17.9±0.2	1.37±0.02	29±8	370±190
Теоретическая формула Mg ₃ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	64.28	21.43	14.29	1.50		

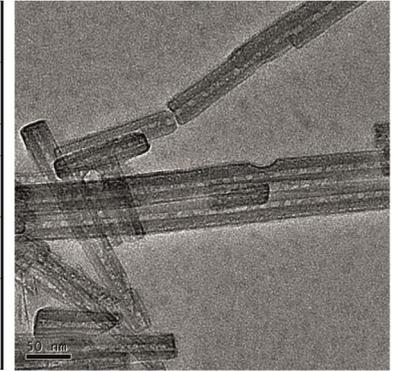


Рис.5. Таблица 1 и ПЭМ фотография синтезированных нанотрубок с дефектами.

Погрешность определения жёсткости нанотрубки связана с ошибками измерений параметров жесткости зонда - k_C , и наклонов силовых кривых - S_0 и S (см. выражение (1)). Используя (1) и формулу для абсолютной погрешности функции от нескольких независимых измеряемых величин, а также полагая абсолютные ошибки $\sigma_{S_0} = \sigma_S = \sigma$ (в обоих случаях ошибка определяется шумами сигнала отклонения кантилевера, DFL, пропорционального силе взаимодействия), было получено соотношение для относительной ошибки σ_{k_s}/k_s измерений k_s :

$$\frac{\sigma_{k_s}}{k_s} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{k_C}}{k_C}\right)^2 + \Phi(s) \cdot \left(\frac{\sigma}{S_0}\right)^2}, \quad (3)$$

где $s = S/S_0$, $\Phi(s) = \frac{1+s^2}{(s-1) \cdot s^2}$. Функция $\Phi(s)$ минимальна при значении $s \cong 0.4534$ ($\Phi_{\text{MIN}} \cong 19.63$), при этом также минимальна и относительная ошибка. Интересно, что в этой точке S примерно в два раза меньше S_0 , что соответствует близости значений контактной жесткости и жесткости кантилевера, см. (1). Это согласуется с интуитивным представлением, что наиболее точные измерения реализуются при соизмеримых жесткостях кантилевера и объекта.

Согласно (3), в относительную ошибку измерений жесткости нанообъекта вносят вклад: ошибка калибровки и ошибка в определении крутизны силовых кривых. Работы [11, 12] дают для алгоритма Садера неопределенность σ_{k_C}/k_C на уровне 20%. Относительная ошибка измерений крутизны σ/S_0 обычно существенно меньше. Действительно, при шуме DFL сигнала 0.2 нм, уровень относительной ошибки в 2% при определении крутизны DFL(z) достигается для смещения образца на расстояние $z=10$ нм. Оба вклада создают суммарную ошибку не более 25% на отрезке значений $s \in [0.17; 0.78]$, когда $\Phi(s) \leq 56$. В соответствии с выражением (1), этот отрезок задает область значений $k_s \in [0.2 \cdot k_C; 3.5 \cdot k_C]$, внутри которой относительная точность измерений не превосходит 25% и, в основном, определяется ошибкой калибровки.

По аналогии с анализом ошибки измерений k_s , было получено соотношение для относительной ошибки единичного измерения модуля Юнга, σ_{E_s}/E_s :

$$\frac{\sigma_{E_s}}{E_s} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{k_s}}{k_s}\right)^2 + 9 \cdot \left(\frac{\sigma_L}{L}\right)^2 + 16 \cdot \left(\frac{\sigma_D}{D}\right)^2}. \quad (4)$$

Относительная ошибка в измерении локальной жесткости $\sigma_{k_s}/k_s = 0.25$, как это было показано выше. Тогда сохранение σ_{E_s}/E_s приблизительно на том же уровне требует выполнения двух условий: $\sigma_L/L \ll 1/9$ и $\sigma_D/D \ll 1/16$, см. выражение (4). Характерный диаметр поры, над которой располагается изучаемая нанотрубка, составляет около 600 нм, и точность в измерении длины лучше 60 нм легко достигается - относительная ошибка измерения длины σ_L/L в проводимых экспериментах не превышала 5 %. Значения поперечного размера

нанотрубки (диаметра) определялось по его высоте на подложке. Плоские участки трековой мембраны имеют среднеквадратичное отклонение по высоте несколько нанометров и зернистую структуру с характерным размером зерна около 50 нм. Поскольку типичный диаметр нанотрубки 30 нм, выполнить второе условие было значительно сложнее. Измерения диаметра необходимой точности (погрешность около 1 нм) были возможны у неизогнутых прямых нанотрубок, обладающих участком по крайней мере микронной длины, опирающимся на подложку. В проводимых экспериментах относительная ошибка измерения диаметра σ_D/D была не хуже 5%. Таким образом, можно заключить, что точность определения модуля Юнга хризотилловых нанотрубок составляет 25-35% в основном из-за погрешности измерения изгибной жёсткости нанотрубки, а также ошибки измерений его диаметра, вносящей второстепенный вклад в общую инструментальную погрешность.

Анализ экспериментальных данных показывает, что статистический разброс значений модуля Юнга нанотрубок, как правило, существенно превышает инструментальную погрешность измерений. Как видно из таблицы 1 на рис.5, разброс значений модуля Юнга меньше у природных нанотрубок, которые более однородны и по величине наружного диаметра. Также хорошо видно, что синтезированные нанотрубки имеют среднее значение модуля упругости более чем в 3 раза превышающее значение модуля Юнга у природных нанотрубок. Возможно, различия в величине и разбросе значений модуля Юнга определяются структурными особенностями отдельных нанотрубок. В частности, существенное влияние на механические характеристики вещества, находящегося в наноразмерном состоянии, может оказывать плотность дефектов. Известно о повышении механической прочности многостенных углеродных нанотрубок, подвергнутых воздействию высокоэнергетического электронного пучка [13]. Различная степень дефектности натуральных нанотрубок, возможно, возникает при разделении макрообразца на волокна (дезагрегация). Синтезированные нанотрубки могут иметь в среднем большую плотность дефектов вследствие менее продолжительного времени формирования (синтеза), по сравнению с природными асбестовыми нанотрубками. Действительно, данные рентгеноструктурного микроанализа (РСМА), см. левую часть таблицы 1 на рис.5, показывают, что состав, более близкий к теоретической формуле, характерен для образцов нанотрубок, полученных дезагрегацией природного минерала. У синтезированных нанотрубок наблюдаются более существенные отклонения стехиометрического состава от теоретической формулы. Это подтверждает наличие большей неоднородности в их строении и значениях морфологических параметров, а также большей дефектности структуры синтезированных нанотрубок (см. также наличие дефектных структур в синтезированных нанотрубках на ПЭМ изображении на рис.5).

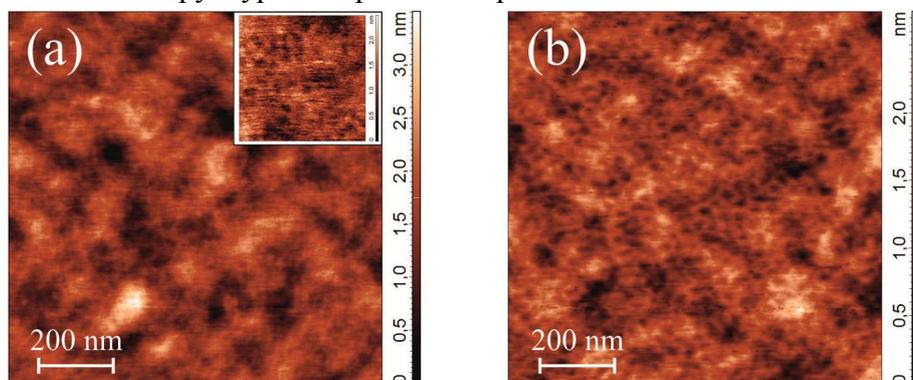
Четвертая глава посвящена результатам исследования рельефа и механических свойств ультратонких блок-сополимерных пленок. Блок-сополимеры вызывают интерес как материал для формирования тонких и ультратонких пленок, которые могут использоваться в качестве гидрофобных защитных покрытий изделий микроэлектроники, весьма перспективным считается их применение в мембранной технологии [14]. Исследовался полиблочный полисилоксановый сополимер лестничного фенилсилсеквиоксана (ЛФС) и полидиметилсилоксана (ПДМС), выпускаемый ВНИИСК им. Лебедева.

Номер образца	Содержание C_{60} в ЛФС–ПДМС, wt. %	Наличие «Винилоксима»
1	0.000	Нет
1+	0.000	Да
2+	0.001	Да
3+	0.003	Да
4+	0.01	Да
5+	0.03	Да

Изучалось влияние модифицирующих добавок C_{60} на прочностные параметры блок-сополимера. Образцы для исследований приготавливались следующим образом: 1 г смеси ЛФС-ПДМС с разным количеством модификатора C_{60} растворялся в 5.5 г толуола; для химической сшивки в приготовленный раствор добавлялось 0.33 г сшивающего агента (торговая марка «Винилоксим»). Раствор распылялся аэрографом на твердую очищенную от органических загрязнений кремниевую подложку. Такое формирование пленок хорошо моделирует реальный процесс формирования пленок полимера. После высыхания растворителя размер распыленных капель составлял десятки микрон при высоте 0.5-1 мкм. Изучалось шесть образцов, описание которых приведено в таблице 2.

С помощью острого стандартного АСМ зонда изучался рельеф пленок блок-сополимера. На рис.6 показаны два изображения, зарегистрированные такого зонда на поверхностях образца 1 без сшивающего агента и образца 4+ содержащего сшивающий агент. На обоих изображениях хорошо видны элементы супрамолекулярной структуры полимера с плавно меняющимся рельефом и характерным размером элемента структуры около 100 нм. На рис.6b дополнительно четко проявляется также и элементы структуры со средним периодом около 35 нм.

Рис.6. Полуcontactные АСМ изображения рельефа поверхностей: (а) образец 1, (b) образец 4+. В правый верхний угол изображения (а) вставлена АСМ топография образца 1, измеренная с более высоким планарным разрешением.



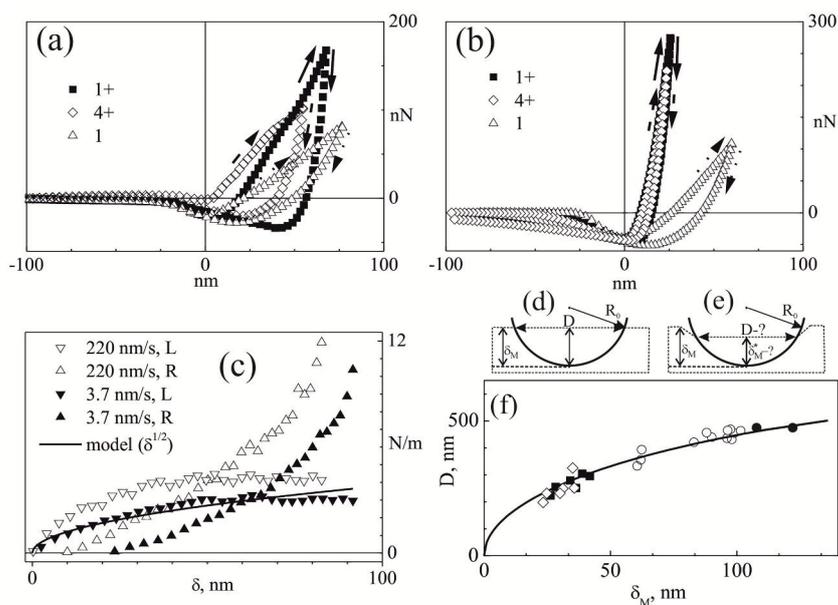
Наблюдаемая супрамолекулярная структура, так называемая «пространственная сетка» так же детектировалась в ПЭМ-исследованиях. Период сетки хорошо согласовывался с теоретическими расчетами длин гибких и жестких блоков сополимеров. Для воспроизводимой идентификации в АСМ элементов структуры размером 35 нм требовалось, чтобы средняя сила не превышала некоторого порога. Уровень порога для образцов без сшивающего агента оказывался примерно на порядок ниже, чем в противном случае. Введение сшивающего агента и микродобавок C_{60} в объем полимера не сказывались заметным образом на супрамолекулярной структуре.

Для диагностики локальных механических свойств использовался метод индентирования. Контактная локальная жесткость и модуль Юнга определялась по теории Герца [10], описывающей силу взаимодействия сфера-плоскость F следующим образом:

$$F = \frac{4}{3} \cdot E_s \cdot \frac{\sqrt{R_0}}{(1-\nu^2)} \cdot \delta^{\frac{3}{2}}, \quad (5)$$

где R_0 – радиус зонда-индентора, δ – деформация полимера, ν – коэффициент Пуассона (для большинства мягких полимерных материалов ≈ 0.5). Для нахождения контактной локальной жесткости k_s выражение (5) дифференцировалась по δ . Далее экспериментальная зависимость сила-деформация $F(\delta)$ подгонялась методом наименьших квадратов к теоретической зависимости (5), подгоночным параметром служил модуль Юнга образца E_s . Значение E_s , при котором теоретическая и экспериментальная кривые максимально совпадали, считался локальным модулем Юнга мягкого полимерного материала.

Рис.7. Измерения значений силы, F , как функции полной деформации, δ , для образцов 1, 1+ и 4+ с помощью стандартного и специализированного зонда, представлены на (a) и (b), соответственно. Стрелки, указывающие вверх, идут вдоль нагрузочных кривых, а стрелки, направленные вниз, - вдоль разгрузочных. На (c) показаны изменения нагрузочной (L) и разгрузочной (R) жесткости образца 1 при разных скоростях индентации. Значения жесткости получены путем численного дифференцирования кривых сила-деформация $F(\delta)$. На (c) нижняя зависимость нагрузочной жесткости аппроксимирована кривой $\sim \delta^{1/2}$. Возможные варианты контакта сферического зонда радиусом $R_0=325$ нм с поверхностью полимерной пленки во время индентации: (d) - «простой» вариант, полимер полностью соприкасается с поверхностью зонда (параметры D - диаметр контакта, δ_M - глубина индентации известны); (e) - «сложный» вариант, полимер деформируется вне области контакта с зондом (параметры D и δ_M^* - фактическая глубина индентации не известны). Зависимость среднего диаметра D отпечатка от полной деформации (индентации) образца δ_M для различных образцов (f); сплошной линией показана кривая $D = 2\sqrt{2R_0 \cdot (\chi\delta_M) - (\chi\delta_M)^2}$, оптимально описывающая экспериментальные данные при значении параметра аппроксимации $\chi = \delta_M^*/\delta_M = 0.91$, где δ_M^* - фактическая глубина индентации, см. также (d) и (e).



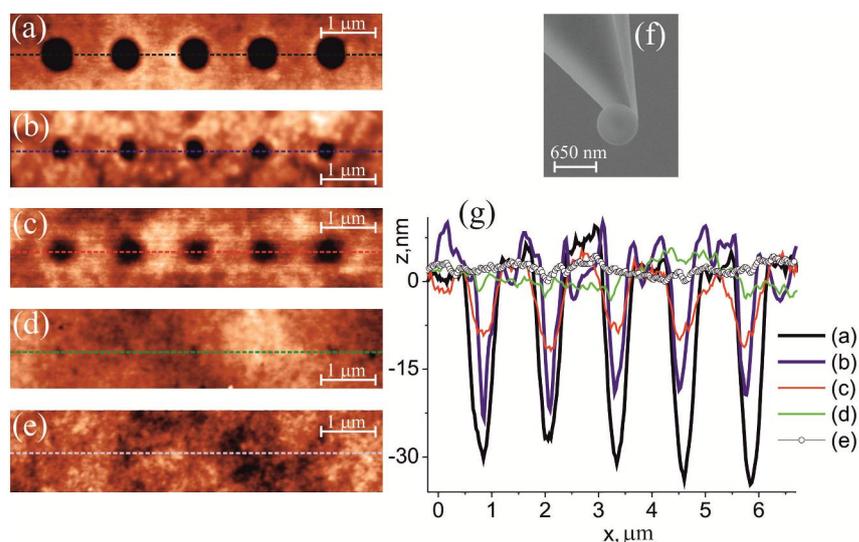
При проведении индентационных тестов несимметричными пирамидами стандартных зондов регистрировались нагрузочно-разгрузочные кривые сила-деформация $F(\delta)$ с множеством изломов, см. рис.7а, не удовлетворяющие зависимости $F \sim \delta^{3/2}$, необходимой для применения модели Герца. К тому же, при использовании некалиброванных по форме и размерам стандартных зондов не всегда оставались отпечатки, необходимые для оценки упругой и неупругой релаксации. Другая картина наблюдалась при использовании специализированных сферических зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны, при индентировании которыми получались хорошо воспроизводимые и плавные, удобные для анализа, нагрузочно-разгрузочные зависимости $F(\delta)$, при этом поведение нагрузочной силовой кривой (или нагрузочной жесткости) хорошо описывалось зависимостью $F \sim \delta^{3/2}$ (или $k_s \sim \delta^{1/2}$), см. рис.7б и 7с.

Для исследования упруго-прочностных параметров полисилоксановых пленок использовался специализированный зонд с радиусом кончика 325 нм, см. рис.8f. При АСМ индентации такой зонд формировал на поверхностях различных образцов отпечатки почти круглой формы диаметром несколько сотен нанометров, см. рис.8а-8е. Измеряемая после индентации глубина отпечатков δ_R была по величине примерно на порядок меньше глубины индентации δ_M , что указывает на существенную релаксацию сополимера. У образцов 4+ и 5+ наблюдалась наименьшая δ_R (фактически равная 0), т.е. почти полная релаксация, см. профили всех трех отпечатков на рис.8g. Глубина отпечатков на образцах 4+ и 5+ сравнима с амплитудой неровностей окружающей поверхности сополимера, что еще раз подтверждает полную релаксацию поверхности полимера после снятия нагрузки у образцов содержащих 0.01% (4+) и 0.03% (5+) добавки фуллеренов. Связь относительной неупругой деформации, Δ , $(100\% \cdot \delta_R / \delta_M)$ полимеров с содержанием фуллеренов приведена в таблице 3.

Как специализированный зонд индентирует поверхность полимера? Рассмотрим два сценария, см. рис. 7d, e. В первом варианте деформация полимера происходит только в области

контакта с индентором, что очень удобно, так как все параметры: диаметр контакта, D , глубина индентации, деформации δ_M , - известны, см. рис. 7d. Во втором варианте деформируется не только область контакта, но и рядом лежащие области. Такой сценарий сложнее, так как известной остается только величина δ_M , а остальные параметры такие как: D и фактическая глубина индентации, δ_M^* , становятся не известными, см. рис. 7e. Проведенные эксперименты показали, что размеры отпечатков от специализированного зонда плавно зависели от глубины индентации. Предполагая погружение сферы радиуса R_0 в материал на глубину контакта δ_M^* , можно вычислить диаметр контакта как длину хорды, которая, по теореме Пифагора, выражается через высоту соответствующего сегмента δ_M^* в окружности радиуса R_0 : $D = 2\sqrt{2R_0 \cdot \delta_M^* - (\delta_M^*)^2}$. В двадцати пяти индентационных тестах были определены средние диаметры отпечатков, D , и соответствующие им значения δ_M , глубины деформации образца. Полученные данные, см. рис.7f, были методом наименьших квадратов аппроксимированы плавной кривой $D = 2\sqrt{2R_0 \cdot (\chi\delta_M) - (\chi\delta_M)^2}$, в которой $2R_0=650$ нм, а параметр аппроксимации $\chi = \delta_M^*/\delta_M = 0.91$. Близость к единице единственного варьируемого параметра служит важным аргументом в пользу малости деформации образца (всего 9%) вне области индентационного контакта. Это подтверждает наиболее простой сценарий формирования отпечатка, рис.7d.

Рис.8. Наноиндентационные испытания образцов специализированным зондом. Полуcontactные АСМ изображения участков поверхности образцов 1, 2+, 3+, 4+ и 5+ после действия максимальной силы (на глубине индентации): 523 нН (249 нм) (a), 953 нН (141 нм) (b), 951 нН (136 нм) (c), 932 нН (128 нм) (d) и 886 нН (127 нм) (e) соответственно. Горизонтальные сечения в области индентационных отпечатков, представлены на (g). И визуализация и индентирование проводились с помощью специализированного зонда NSG01, $k_C=2.8$ Н/м с калиброванным радиусом кривизны кончика $2R_0=650$ нм, СЭМ изображение зонда приведено на (f).



Проанализируем фактор скорости индентирования. Нагрузочная кривая на рис.7с, измеренная при более высокой (на два порядка) скорости деформации, демонстрирует незначительное увеличение жесткости, по сравнению с нагрузочной кривой, измеренной медленно. Увеличение нагрузочной жесткости при быстрой деформации можно связать с ростом силы вязкого трения, пропорциональной скорости движения зонда в полимере. Подробный анализ зависимости механических параметров полимера от скорости индентации выходит за рамки данной работы, во всех проведенных измерениях скорость индентации поддерживалась постоянной, приблизительно на уровне 10^{-8} м/с (10 нм/с).

Анализ результатов АСМ индентирования приведен в таблице 2. Твердость по Бриннелю вычислялась как: $H = F_{max}/S$, где S это площадь отпечатка, а F_{max} определялась с учетом адгезии. Для образцов 4+ и 5+ большая ошибка H обусловлена сложностью измерения площади отпечатка, которая у этих образцов стремилась к 0. Согласно таблице 2, наилучшие механические параметры обнаруживаются у образцов 4+ и 5+. При сопоставимых с образцом 1+, 2+ и 3+ прочностных параметрах, поверхностные слои образцов 4+ и 5+ (полимер с

добавкой 0.01% C₆₀ и 0.03% C₆₀, соответственно) оказываются более упругими. Значение коэффициента относительной неупругой деформации, Δ, у образцов 4+ и 5+ близки к 0 (учитывая среднюю шероховатость поверхности), что означает, что полимер практически полностью восстанавливается после снятия нагрузки, см. рис. 9d, e и обсуждение к нему. У образца 3+ (полимер с добавкой 0.003% C₆₀) упругие свойства (Δ) оказываются лучше, чем у образцов 1, 1+ и 2+, но значительно уступают образцам 4+ и 5+. Образец 2+ (полимер с добавкой 0.001% C₆₀) имеет коэффициент Δ, сравнимый по значению с Δ у образцов 1 и 1+, то есть влияние добавки C₆₀ в данном количестве не существенно. Средний модуль Юнга, E_s, у образцов 3+, 4+ и 5+ превосходит E_s у 1+ и 2+, но, учитывая разброс, это не существенно. Интересно, что связывающий агент во всех образцах (кроме чистого блок-сополимера №1), приводит к значительному увеличению модуля Юнга, E_s, и твердости, Н.

Модифицирующая добавка C₆₀, во-первых, приводит к более однородному распределению упругих параметров (значение Δ у образцов с C₆₀ имеет меньший разброс, чем у полимера со связывающим агентом, см. таблицу 3). Во-вторых, улучшаются упругие свойства полимера: это становится заметно уже при концентрации 0.003 % в его объеме, а при концентрации 0.01% и 0.03 % остаточная неупругая деформация практически отсутствует.

Таблица 3 – Упруго-прочностные параметры образцов, определенные с помощью АСМ						
№ образца	1	1+	2+	3+	4+	5+
E _s , модуль Юнга сжатия, [МПа]	11±2	106±31	103±24	116±22	122±16	123±19
Н, твердость по Бриннелю, [МПа]	0.6±0.2	3.1±0.9	3.2±0.7	3.7±1.1	11.1±3.7	60±30
Δ, относительная остаточная неупругая деформация, [%]	12.2±1.9	17±2.6	15.5±1.2	10±1.5	1.9±0.6	0.9±0.6

Механизм такого улучшения упруго-деформационных свойств сополимера пока представляется не до конца ясным. Можно предположить, например, координационную (каталитическую) роль фуллерена, приводящую к дополнительной агрегации жёстких блоков дисперсионной среды и упрочнению межмолекулярных связей полимера. Будем, для простоты оценки, считать растворы с микродобавками C₆₀ в сополимере истинно молекулярными. Учитывая плотность материала 1.05 г/см³, вычислим концентрацию C₆₀ в 1 см³ для всех образцов с микродобавками: $n_{2+} = N_A \cdot m / \mu$, где N_A – число Авогадро, m/μ_{C₆₀} – число молей молекул C₆₀ в 1 см³ полимера. Значит: $n_{2+} = 6.022 \cdot 10^{23} \cdot (1.05 \cdot 10^{-5} / 720) \approx 8.8 \cdot 10^{15} \cdot 10^{15} \text{ см}^{-3}$, $n_{3+} \approx 2.6 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-3}$, $n_{4+} \approx 8.8 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-3}$, $n_{5+} \approx 2.6 \cdot 10^{17} \text{ см}^{-3}$. Далее оценим соответствующие средние расстояния между C₆₀: $a_{2+} = n^{-1/3} \approx 48 \text{ нм}$, $a_{3+} \approx 34 \text{ нм}$, $a_{4+} \approx 22 \text{ нм}$, $a_{5+} \approx 15 \text{ нм}$. Сравнивая эти значения с размерами ячейки сетки доменов жестких блоков, 35 нм, можно подсчитать, что в образцах 4+ и 5+ на каждую ячейку сетки блок-сополимера приходится в среднем 4 и, соответственно, 12 молекул C₆₀. В образце 3+ на каждую ячейку приходится примерно 1 молекула C₆₀, а в образце 2+ одна молекула примерно на 2-3 ячейки. Эксперимент демонстрирует, что при переходе от образца 3+ к образцу 4+ наблюдается существенное подавление относительной неупругой деформации. Именно в этот момент на одну ячейку пространственной сетки начинает приходиться несколько и более молекул фуллеренов, что, действительно, может указывать на качественное изменение роли C₆₀ в упрочнении межмолекулярных связей в образцах 4+ и 5+.

Пятая глава содержит оригинальные результаты АСМ исследования живых биологических клеток. Информация о механическом портрете живой клетки важна в исследованиях изменений содержания липидных компонентов [15], при изучении механизмов действия различных лекарственных препаратов. Особенный интерес вызывают изучения

механических свойств кровяных клеток миелоидной лейкемии человека K562. Изменение упруго-механических свойств этих клеток влияет на общий кровоток в сосудах и капиллярах организма человека. В локальном отклике клетки на механическое воздействие ведущую роль играет кортикальный цитоскелет (вблизи клеточной мембраны). Трансформации, перестройки цитоскелета могут быть инициированы отклонениями от нормы концентраций различных важных компонент в липидном бислое [15]. Примером такой важной компоненты липидного бислоя считается холестерин. В данной работе, чтобы вызвать изменения механических свойств клетки, уровень холестерина специально варьировался. Изучение механических свойств субмембранных структур клетки, в том числе холестериновых микродоменов, кортикального цитоскелета потенциально становится возможным только при субмикронном радиусе кривизны зондов, которые позволяют информативное индентационное субмикронное тестирование, исключаящее «паразитное» влияние более глубоко расположенных ядер клеток.

Клетки миелоидной лейкемии человека K562 культивировались в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина, см. подробнее в [15]. K562 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Для снижения уровня мембранного холестерина использовали метил-бета-циклодекстрин (МБЦД) – циклический олигосахарид, являющийся селективным акцептором стиролов. Клетки инкубировали с МБЦД в питательной среде в течение 40 минут.

В качестве объектов для апробации специализированных сферических зондов субмикронного калиброванного радиуса кривизны были также исследованы живые клетки следующих линий: 1) L41, лимфобластоидная клеточная линия лейкемического происхождения, 2) A549, эпителиальные клетки карциномы легкого человека. Клетки культивировались по стандартной методике для монослойных культур в пластиковых чашках Петри диаметром 40 мм. Использовалась стандартная ростовая среда, и среда с комплексом C₆₀/ПВП (фуллерен/поливинилпирролидон), добавленным с целью выявить влияние фуллерена на механические свойства клеток. Ранее было показано, что в малых концентрациях C₆₀/ПВП не токсичен для клеток в культуре, и даже защищает клетки от УФ облучения [16]. L41 и A549 были получены из Российской коллекции клеточных культур (НИИ Гриппа, Санкт-Петербург). Зрелые клетки транспортировались в ФТИ в герметичном термостатируемом контейнере. Все культуры выращивались в чашках Петри, обработанных полилизинном для лучшего закрепления клеток на дне чашки. Непосредственно перед АСМ исследованиями питательный раствор замещался физиологическим раствором при комнатной температуре. Все АСМ эксперименты с клетками выполнялись в течение 8 часов после замены питательного раствора.

Для исследования живых клеток A549 и L41 использовался зонд CSC12_C с 650 нм SiO₂ гранулой на кончике, см. рис.3b, жесткость кантилевера измерялась по алгоритму Садера [9], $k_c=0.4$ Н/м. Полученные с помощью такого зонда полуконтактные АСМ изображения живых клеток двух различных линий приводятся на рис.10.

На рис.10a и 10b показаны АСМ изображения рельефа группы (около десяти) живых клеток L41 культивированных в стандартной ростовой среде. Выявляется плавный рельеф, наиболее высокие области, по-видимому, сформированы ядрами, более жесткими образованиями по сравнению с остальными частями клетки. Соответствующие ядрам области определяются, однако не всегда однозначно. Использование зонда с 650 нм гранулой также позволило исследовать клетки линии A549. Одиночная клетка A549 выглядит в АСМ изображении на рис.10e и 10f распластанной, в самой высокой части ее рельефа можно выделить ядро диаметром 3-4 микрона. На периферии клетки наблюдаются вытянутые

особенности, соответствующие, как можно предположить, актиновым псевдоподиям. Псевдоподии отвечают за движение и образуются преимущественно в направлении перемещения клетки. Подчеркнем, что в данных на рис.10е, а также других аналогичных, но не представленных здесь, изображениях клеток A549, каких-либо специфических особенностей рельефа, проявляющих разные условия культивирования клеток, замечено не было.

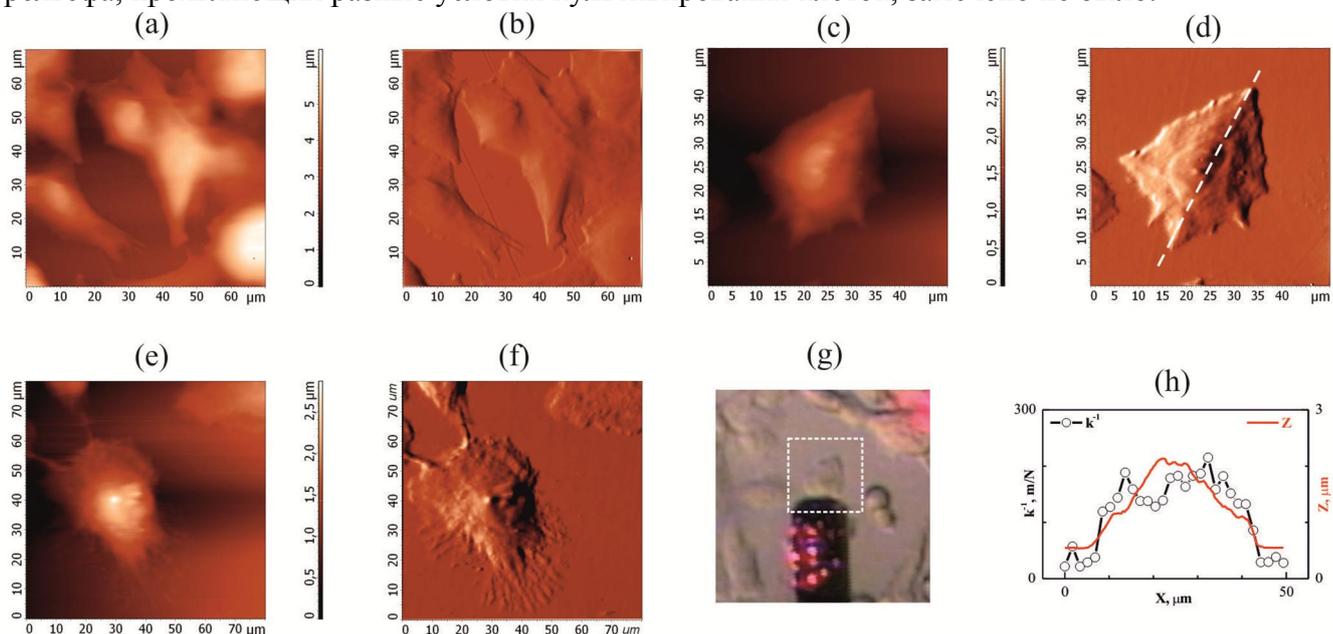


Рис.10. АСМ изображения рельефа живых клеток. Клетки L41, (а) и (b), а также клетки A549, (е) и (f), выращенные в стандартной среде; клетки L41, (с) и (d), выращены в среде с добавкой C_{60} /ПВП. Тоновым топографиям (а), (с) и (е) соответствуют градиентные изображения (b), (d) и (f), полученные подсветкой слева. Оптическая фотография АСМ кантилевера над колонией клеток (g). Профили высоты (Z) и податливости (k^{-1}) клетки, снятые вдоль линии на рис. (d), (h). АСМ изображения регистрировались в полуконтактном режиме с помощью зонда CSC12_C с 650 нм SiO_2 ранулой. АСМ кадр (с) указан на оптическом изображении (g) пунктирным квадратом.

Рассмотрим на рис.10с,d,g,h результаты исследования механических свойств живых клеток L41, культивировавшихся в среде C_{60} /ПВП. Наблюдается хорошее соответствие контуров клетки в АСМ изображениях на рис.10с и 10d с контурами клетки в области АСМ сканирования, выделенной на оптической фотографии на рис. 10g. Оптическая фотография была получена после АСМ измерений и дополнительно свидетельствует в пользу того, что АСМ воздействие использованного 650 нм зонда сохраняет целостность клетки и не открепляет ее от поверхности подложки. При анализе механических свойств, профиль обратной жесткости (податливости, котангенс угла наклона $F(\delta)$ кривых) можно сопоставить с соответствующим профилем высоты рельефа клетки, см. рис.10h. При измерении силовых кривых глубина индентации была меньше радиуса гранулы, 325 нм. Поскольку высота клетки ~ 2 мкм, паразитный вклад в измеряемые значения жесткости от твердой подложки мал. Более того благодаря субмикронной величине индентации на воздействие откликается сравнительно тонкий поверхностный слой, и как видно на рис.10h, податливость клетки слабо меняется от места к месту. Можно отметить, однако, что максимальной высоте рельефа соответствует область несколько пониженной податливости - повышенной жесткости. Это согласуется с предположением, что наиболее высокие области содержат более жесткие, по сравнению с остальными частями клетки, образования, например, ядро. Такие измерения на других образцах использовались для определения средних значений модуля Юнга живых клеток, см. таблицу 4.

Модуль Юнга определялся способом, ранее описанным для мягких полимерных пленок; коэффициент Пуассона брался $\nu=0.5$, радиус прикрепленной гранулы $R_0=325$ нм.

Согласно данным таблицы 4, присутствие фуллеренов в ростовой среде действует только на клетки A549. Они упрочняются почти в два раза.

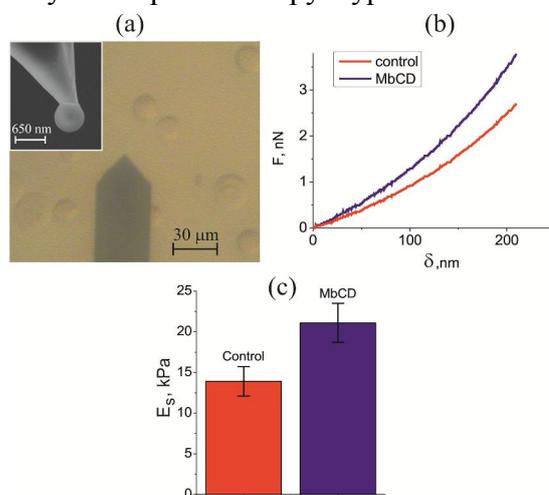
Можно, предположить, например, координационную роль фуллерена, см. главу 4, приводящую к возникновению дополнительных связей в актиновых или микротубулиновых полимерных сетях. Это подразумевает, что фуллерен проникает внутрь клетки. В силу известной гидрофобности фуллерена представляется вероятным ожидать его следы в липидном слое межклеточной мембраны, механические свойства которой он может модифицировать, хотя гидрофильный комплекс C_{60} /ПВП скорее оказывался внутри клетки. Вполне возможно, что изменение механических свойств клетки в присутствии C_{60} /ПВП в ростовой среде проявляет разную проницаемость межклеточных мембран у двух изученных линий. Достаточных оснований для такого вывода, однако, пока нет, так как L41 почти на порядок жестче, чем A549, и эффект упрочнения в L41 может нивелироваться на фоне ошибки измерений. Для уточнения результатов наиболее важно исключить воздействие на живые клетки условий транспортировки. Для этого, требуется проводить АСМ исследования в непосредственной близости от места культивирования клеток.

Образец	Число проанализированных клеток	E_s , модуль Юнга
L41 контроль	4	17.9±1.3 кПа
L41+C ₆₀ /ПВП	2	17.5±1 кПа
A549 контроль	3	3.8±1.9 кПа
A549+C ₆₀ /ПВП	4	7.7±2.8 кПа
K562 контроль	11	13.9±1.8 кПа
K562+МБЦД	11	21.1±2.4 кПа

В конце главы рассмотрено АСМ исследование влияния уровня холестерина на механические свойства кровяных клеток K562. Механические свойства K562 измерялись в режиме силовой спектроскопии специализированным АСМ зондом CSG30 с 650 нм гранулой на кончике, см. вставку на рис.11а, $k_c=0.8$ Н/м. Положение зонда над клеткой фиксировалось в оптическом микроскопе, см. рис.11а. Глубина индентирования при измерении механических параметров была меньше радиуса гранулы, 325 нм. При реальной высоте клеток более 10 мкм, такая индентация гарантировала, что исследовался лишь сравнительно тонкий слой клетки, включающий в себя мембранные и субмембранные структуры (липидный бислой, холестеринные микродомены, цитоскелет), исключая паразитный вклад от глубоко лежащих клеточных ядер и от еще более далекой твердой подложки. Проведенные измерения показали, что локальная жесткость, пример зависимостей $F(\delta)$, приведен на рис.11b, и модуль Юнга клеток K562 после обработки МБЦД увеличились в 1.5 раза, см. рис.11b,c и таблицу 4, соответственно. Стоит отметить, что полученные абсолютные значения модуля Юнга для клеток K562 хорошо согласуются с данными по другим линиям клеток, см. таблицу 4. Известно, что обработка МБЦД приводит к повышенной экстракции холестерина из липидных бислоев и мембран клеток, при этом содержание холестерина в субмембранных структурах клеток снижается на 80-90% [17]. Согласно современным модельным представлениям, экстракция холестерина из липидного бислоя инициирует последующую перестройку и сборку актинового цитоскелета клеток, которые в свою очередь, приводят к увеличению упруго-механических свойств клетки и ее субмембранных структур. Такие представления косвенно подтверждаются данными биологических исследований [15]. В частности, в этой работе методом patch-clamp, было выявлено, что после обработки МБЦД уровень давления необходимый для активации

ионных каналов клеток K562 возрастал примерно в 1.7 раза, по сравнению с контрольными клетками, что близко к обнаруженному в АСМ возрастанию жесткости мембранных структур обработанных клеток в 1.5 раза. Это позволяет сделать вывод, что при повышенной экстракции холестерина из липидного бислоя мембраны, вызванной МБЦД, действительно, происходит увеличение локальной жесткости и модуля упругости субмембранных структур клетки.

Рис.11. а) Оптическая фотография специализированного АСМ зонда и исследуемых клеток K562 в питательном растворе. На вставке приведена СЭМ фотография используемого в исследованиях специализированного АСМ зонда CSG30 с SiO₂ гранулой на кончике, радиус гранулы 325 нм, $k_C=0.8$ Н/м. б) Зависимости сила-деформация $F(\delta)$ измеренные на контрольных клетках (красная кривая) и после обработки МБЦД (синяя кривая). в) Результаты измерений модуля Юнга контрольных (красный столбик) и обработанных МБЦД (синий столбик) клеток K562.



В заключении сделаны выводы и представлены основные результаты работы:

1) Реализована «трех-точечная» АСМ методика количественного тестирования механических свойств одномерных объектов, а именно хризотилевых нанотрубок.

2) Показано, что в «трех-точечном» АСМ методе измерения жесткости подвешенных нанообъектов основной вклад в погрешность определения модуля Юнга нанотрубок дают ошибки в определении диаметра наносветка и в калибровке жесткости АСМ кантилевера.

3) Выявлено, что у нанотрубок хризотила, синтезированных в гидротермальных условиях, модуль Юнга в более чем 3 раза превосходит модуль Юнга нанотрубок натурального минерала, что связано с большей дефектностью и неоднородностью первых.

4) Разработана технология специализированных сферических зондов АСМ субмикронного калиброванного радиуса кривизны, необходимых для количественных исследований механических свойств двумерных и трехмерных объектов.

5) Предложенная технология позволяет изготавливать специализированные, стойкие к износу и коррозии зонды калиброванного радиуса кривизны для проведения с субмикронным пространственным разрешением количественных неразрушающих исследований рельефа и механических свойств объектов малой жесткости (модуль Юнга 10^3 - 10^6 Па).

6) Выявлено значительное улучшение упругости тонких (субмикронных) поверхностных слоев полисилоксановых блок-сополимеров при введении в их объем, дополнительно к сшивающему агенту «винилоксиму», более 0.01% фуллеренов.

7) Проведены количественные неразрушающие исследования топографии и механических свойств живых биологических клеток L41 и A549. Обнаружена существенная разница в морфологии рельефа и модуле Юнга клеток. Результат показывает перспективность использования специализированных зондов в новых диагностиках клеточной биологии.

8) Показано, что значительное (на 80-90%) снижение уровня мембранного холестерина клеток K562 приводит к увеличению модуля Юнга субмембранных структур клетки в 1.5 раза.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих печатных работах:

1. Няпшаев И.А., Щербин Б.О., Анкудинов А.В., Кумзеров Ю.А., Неведомский В.Н., Красилин А.А., Альмяшева О.В., Гусаров В.В. Механические свойства наносвитков на основе $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ // Наносистемы: Физика, химия, математика. – 2011. – 2(2). – С. 45-57.
2. Няпшаев И.А., Анкудинов А.В., Возняковский А.П. Атомно-силовая микроскопия супрамолекулярной организации и прочностных свойств ультратонких пленок полисилоксановых блоксополимеров // ФТТ. – 2011. – 53. – С. 1783-1790.
3. Ankudinov A. V., Nyapshaev I. A., Voznyakovskii A. P. Nanocarbons-induced hardening of ultrathin polysiloxane block copolymer films // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2012. – 20. – P. 487–495.
4. Няпшаев И.А., Анкудинов А.В., Стовпяга А.В., Трофимова Е.Ю., Еропкин М.Ю. Диагностика живых клеток в атомно-силовом микроскопе, используя субмикронный сферический зонд калиброванного радиуса кривизны // ЖТФ. – 2012. – 82(10). – С. 109-116.
5. Анкудинов А.В., Быков В.А., Няпшаев И.А., Шубин А.Б., Сафронова О.В. Способ изготовления коллоидного зондового датчика для атомно-силового микроскопа // Патент RU 2481590. – Приоритет от 17.08.2010. – Опубл. 10.05.2013. – Бюл. №13.

Благодарности

Автор очень признателен своему научному руководителю и другу А.В. Анкудинову. Автор благодарит А.Н. Титкова, М.С. Дунаевского, П.А. Алексеева, П.А. Дементьева, В.Г. Голубева, Е.Ю. Трофимову, Д.А. Курдюкова, Е.И. Терукова, В.Е. Корсукова, А.В. Савельева, И.И. Новикова, М.В. Филатова, В.В. Исаева-Иванова, М.Ю. Еропкина, О.И. Киселева, В.И. Чубинского-Надеждина, Ю.А. Негуляева, М.Ф. Кудоярова, В.Н. Неведомского, В.В. Гусарова, А.А. Красилина, Б.О. Щербина, Ю.А. Кумзерова, А.П. Возняковского, Ф.А. Шумилова, А.В. Стовпягу, А.А. Феклистова, А.О. Голубка, сотрудников компании НТ-МДТ. Автор особенно благодарен своей семье и любимой невесте Наташе Сухих за терпение, помощь и поддержку.

Список цитированной литературы:

1. Salvétat J.-P. et.al. // Applied Physics. – 1999. – A 69. – P. 255-260.
2. Cuenot S. et.al. // Phys. Rev. Lett. – 2000. – 85. – P. 1690–1693.
3. Vanapalli S.A. et.al. // Biomicrofluidics. – 2009. – 3. – P. 012006 (1-15).
4. Moreno-Herrero F. et.al. // Phys. Rev. – 2004. – E 69. – P. 031915 (1-9).
5. Корыткова Э.Н. и др. // Физ. и хим. стекла. – 2004. – 30. – С. 72-78.
6. Gan Y. // Rev.Sci.Instrum. – 2007. – 78. – P. 081101 (1-8).
7. Трофимова Е.Ю. и др. // Коллоид. журн. – 2011. – 73. – С. 535–539.
8. Kumzerov Y., Vakrushev S. Nanostructures Within Porous Materials / Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. – American Scientific Publishers. – 2004. – P. 811-849.
9. Sader J.E. // J. Appl. Phys. – 1998. – 84. – P. 64-76.
10. Ландау Л.Д., Лившиц Е.М. Теоретическая физика: Учеб. пособ.: Для вузов. В 10 т. // ФИЗМАТЛИТ, М. 5-е изд., стереот. – 2003. – том VII. Теория упругости. – 264 с.
11. Bhushan B. et.al. Applied scanning probe methods VII: Scanning probe microscopy techniques / ed. by Bhushan B., Fuchs H., Tomitori M. – Springer Berlin Heidelberg. – 2008. – 465 p.
12. Matei G.A. et.al // Rev. Sci. Instrum. – 2006. – 77. – P. 083703 (1-6).
13. Kis A./ PhD Thesis – Ecole Polytechnique Federale de Lausanne. – 2003. – 166 p.
14. Ямпольский Ю.П. и др. // Высокомолек.соед. А. – 1996. – 18(3), – С.837.
15. Chubinskiy-Nadezhdin V. I. et.al //BBRC. – 2011 – 412. – P. 80–85.
16. Еропкин М.Ю. и др. // Эксп. клинич. фармакол. – 2011. – 74. – С. 28-31.
17. Zidovetzki R. et.al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – 1768. – P. 1311-1324.