



# НОВОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ БИОНАНОСКОПИИ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ОПТИЧЕСКИХ МИКРОЛИНЗ

## NEW SOLUTION FOR BIONANOSCOPY BASED ON THE OPTICAL MICROLENS TECHNOLOGY

И.В.Яминский<sup>1,2,3,4</sup>, д.ф.-м.н., проф. физического и химического факультетов МГУ имени М.В.Ломоносова, вед. науч. сотр. ИНЭОС РАН, директор Центра перспективных технологий, (ORCID: 0000-0001-8731-3947), А.И.Ахметова<sup>1,2,3</sup>, инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, вед. специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0002-5115-8030), С.А.Сенотрусова<sup>1,2</sup>, инженер (ORCID 0000-0003-0960-8920), З.Ван<sup>5</sup>, PhD, ст. преп., (ORCID: 0000-0002-3282-1052), Ю.Бинз<sup>5</sup>, PhD, науч. сотр., (ORCID: 0000-0003-4944-6735), Б.С.Лукьянчук<sup>1</sup>, гл. науч. сотр. физического факультета МГУ (ORCID: 0000-0002-3282-1052), Е.В.Бармина<sup>1</sup>, д.ф.-м.н., зав. лаб. Института общей физики имени А.М.Прохорова РАН, (ORCID: 0000-0003-0735-2896), А.В.Симакин<sup>6</sup>, к.ф.-м.н., вед. науч. сотр. Института общей физики имени А.М. Прохорова РАН, (ORCID: 0000-0003-3124-9119), Г.А.Шафеев<sup>6</sup>, д.ф.-м.н., гл. науч. сотр. Института общей физики имени А.М.Прохорова РАН, (ORCID: 0000-0002-9230-1542) / yaminskiy@nanoscopy.ru

I.V.Yaminskiy<sup>1,2,3,4</sup>, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center and Energy Efficient Technologies, Leading Sci. of INEOS RAS, A.I.Akhmetova<sup>1,2,3</sup>, Engineer of A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies, S.A.Senotrusova<sup>1,2</sup>, Engineer, Z.Wang<sup>5</sup>, PhD, Senior Lecturer, Yu.Bing<sup>5</sup>, PhD, Researcher, B.S.Luk'yanchuk<sup>1</sup>, Senior Researcher, E.V.Barmina<sup>1</sup>, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Head of Laboratory, A.V.Simakin<sup>6</sup>, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Leading Researcher, G.A.Shafeyev<sup>6</sup>, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Senior Researcher

DOI: 10.22184/1993-8578.2021.14.5.292.297

Получено: 06.08.2021 г.

Микролинзовая микроскопия – это относительно новое и многообещающее решение для преодоления дифракционного предела в оптической микроскопии. Благодаря использованию сфер из титаната бария возможно получение оптических изображений с разрешением в десятки нанометров. Совмещенная зондовая и микролинзовая микроскопия позволяет осуществлять регистрацию широкого спектра физических и биохимических параметров изучаемых образцов. Существенным достоинством метода является возможность наблюдения биоматерии как с использованием меток и маркеров, а также, что очень существенно, и без них. Это недостижимо для многих других традиционных методов исследования. Использование лазера на парах меди в оптической установке дает возможность исследовать биологические объекты с низкой интенсивностью света.

The microlens microscopy is a relatively new and promising solution to overcome the optical microscopy diffraction limit. It is possible to obtain the optical images with a resolution of tens nanometers using the spheres made of barium titanate. Moreover, combining the probe and microlens microscopy makes it possible to register a wide range of physical and biochemical parameters of the studied samples spectra. The great advantage of this method is a possibility to study a biomaterial either using labels and markers or not, which is essential. This is unattainable by many other conventional research methods. The use of a copper-vapour laser in an optical scheme, makes it possible to study biological objects at low light intensity.

<sup>1</sup> МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia.

<sup>2</sup> ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia.

<sup>3</sup> ООО "Энергоэффективные технологии", Москва, Россия / Energy Efficient Technologies.

<sup>4</sup> ИНЭОС РАН, Москва, Россия / INEOS RAS, Russia.

<sup>5</sup> Бангорский университет, Бангор, Великобритания / Bangor University, Bangor, United Kingdom.

<sup>6</sup> Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН / Prokhorov General Physics Institute RAS.



## ВВЕДЕНИЕ

Включение микролинзы в систему оптического микроскопа позволяет получить изображение объекта с преодолением дифракционного предела. В настоящее время эта возможность реализована в традиционной оптической микроскопии проходящего и отраженного света [1–3], интерференционной микроскопии [4], флуоресцентной микроскопии [5], конфокальной микроскопии [6] и рамановской микроскопии [7].

Микролинзовая микроскопия открывает новые возможности наблюдения процессов в живой природе с разрешением в десятки нанометров. При этом, в отличие от оптической микроскопии сверхвысокого разрешения на основе применения флуоресцентных меток, в микролинзовой микроскопии необходимость применения меток и красителей полностью отпадает. Однако, при достижении достаточной яркости и контраста изображения, сами объекты освещаются оптическим излучением высокой интенсивности. Это не всегда является допустимым при наблюдении биологических объектов. Многие процессы в живой природе необходимо наблюдать при невысоком уровне освещенности. Такую возможность дает представленное в настоящей статье инновационное решение за счет совмещения микролинзовой

микроскопии с оптической схемой на основе лазера на парах меди. В этом решении отраженный от биообъекта свет проходит через активную среду лазера и получает многократное усиление яркости. Благодаря этому получается яркое изображение при щадящем освещении биологического объекта. Применение дополнительной микролинзы в схеме позволяет получить оптическое изображение, не ограниченное дифракционным пределом. При этом сама микролинза действует как оптический элемент, который преобразует затухающие волны в ближней зоне в распространяющиеся волны в дальней зоне.

Ранее на базе оптического микроскопа Zeiss AxioScope 40 с апертурой 0,9 и микролинзы из титаната бария нами были проведены измерения топографии микросхемы и были получены изображения с различным паттерном в 150 нм [8]. Геометрические и оптические параметры системы визуализации оказывают существенное влияние на качество формирования изображения. Определено, что поле обзора системы визуализации с использованием микросфер пропорционально квадратному корню из диаметра микролинзы. Например, при освещении светом с длиной волны 500 нм линзы размером в 25 мкм, диаметр поля обзора составляет величину около 5 мкм [9].

## INTRODUCTION

In order to obtain an image of the object passing the diffraction limit, it is necessary to include a microlens in a microscope optical scheme. Nowadays, it is realized in the traditional transmitted and reflected light optical microscopy [1–3], interference microscopy [4], fluorescent microscopy [5], confocal microscopy [6] and Raman microscopy [7].

The microlens microscopy offers new opportunities to watch the live nature processes with a resolution of tens nanometers. In this case, in contrast to super resolution optical microscopy based on the fluorescent marks, the microlens microscopy does not need the markers and dyes at all. However,

when brightness and contrast of an image become sufficiently high, the objects are illuminated by the optical irradiation of high intensity. It is not always acceptable when observing biological objects. There are a number of processes in nature which are necessary to observe at low radiation level. In this paper, we present an innovative solution to realize this possibility combining the microlens microscopy and a copper-vapour laser in one optical scheme. The idea is to pass the light reflected from a biological object through the laser active media and receive a multiple brightness gain. Due to this fact we obtain a bright image using a low level gently irradiation of the biological object. Application of an additional

microlens permits to obtain an optical image that is not limited by the diffraction limit. Besides, the microlens itself acts as an optical element that converts the decaying waves in the near zone into the propagating waves in the far zone.

Earlier we conducted measurements of the microchip topography using Zeiss AxioScope 40 optical microscope with the 0.9 aperture and microlens made of titanate barium to obtain images of visible pattern of 150 nm [8]. The geometric and optical parameters of the visualization imaging system produce a significant impact on the image quality to be obtained. It is determined that the visualization system field of view is proportional to the square root of the microlens

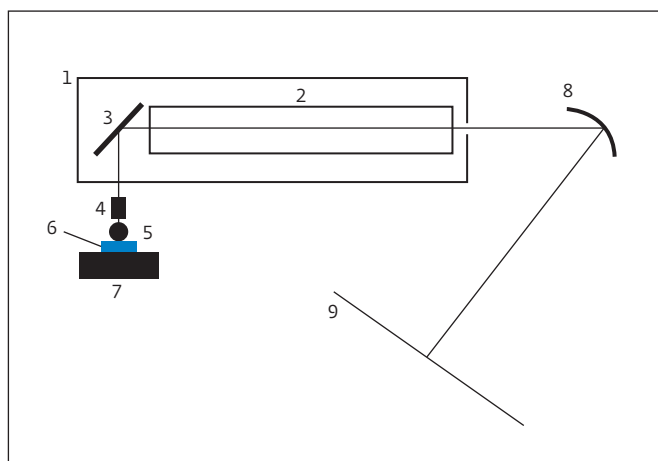


Рис.1. Оптическая схема лазерного проекционного микроскопа на основе ЛПМ с использованием дополнительной микролинзы: 1 – корпус активного элемента, 2 – активный элемент, 3 – поворотное зеркало, 4 – микрообъектив, 5 – микролинза, 6 – объект, 7 – трехкоординатный стол для перемещения образца, 8 – внеосевое параболическое зеркало, 9 – экран

Fig.1. Optical scheme of a laser projective microscope based on LPM using a microlens: 1 – active element case, 2 – active element, 3 – deflecting mirror, 4 – micro objective, 5 – microlens, 6 – object, 7 – three-axis table for displacement of a sample, 8 – off-axis parabolic mirror, 9 – screen

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе нами была реализована оптическая схема на основе совмещения микролинзы и лазерного проекционного микроскопа на основе

diameter. For example, using the 25  $\mu\text{m}$  microlens and light wavelength of 500 nm the diameter of the field of view is about 5  $\mu\text{m}$  [9].

## RESEARCH METHODS

In this paper, we present the optical scheme consisting of a combination of microlens and laser projecting microscope based on copper-vapour laser optical amplifier (LOA) [10]. The optical scheme is shown in Fig.1. The active element super luminous density radiation of the average power about a few tens milliwatts is directed onto a test object (chromium coating on glass or a microchip with nanotopography)

using the object lens objective with a NA=0.65 numeric aperture. The characteristic dimension of the field of view is 10–20  $\mu\text{m}$ . After reflection from the object, the radiation comes back into the active medium and its brightness is amplified by approximately one thousand times in a single-pass. Depending on the object reflectivity, we obtain a light beam that carries the enlarged object image with an average power output of already 1 watt and more. This device allows you to achieve a bright object image on a 1 square meter screen at a low power at the low power density on the object itself. This is the reflection LOA scheme.

оптического усилителя лазера на парах меди (ЛПМ) [10]. Оптическая схема установки представлена на рис.1. Излучение сверхсветимости активного элемента средней мощностью порядка нескольких десятков милливольт с помощью объектива с числовой апертурой NA=0,65 направляется на тестовый объект – хромовое покрытие на стекле либо микросхему с нанометровой топографией. Характерный размер поля обзора установки – 10–20  $\mu\text{m}$ . После отражения от объекта излучение возвращается в активную среду и усиливается по яркости за один проход примерно в 1000 раз. На выходе получается световой пучок, несущий увеличенное изображение объекта, со средней мощностью уже 1 Вт и более, в зависимости от отражательной способности объекта. Установка позволяет получить яркое изображение объекта на экране площадью порядка 1 кв. м при малой плотности энергии на самом объекте. Это схема ЛПМ на отражение. Впервые оптическая схема просвечивающего лазерного проекционного микроскопа на основе активной среды лазера на парах меди была реализована в работе [11]. Данная схема была применена для визуализации изменения структуры нейронов виноградной улитки в процессе генерации ими электрических импульсов [12].

На базе данной установки с помощью микро-сферы диаметром 12  $\mu\text{m}$  получено изображение образца калибровочной решетки.

При использовании микро-сферы диаметром 12  $\mu\text{m}$  и с показателем преломления 1,9

The optical scheme of a laser projective microscope based on the copper-vapour laser active medium was firstly realized in [11]. This scheme was applied to visualize the French snail neurons structure changes during its electrical pulses generation [12]. An image of a calibration grid was obtained with the use of this device and a 12  $\mu\text{m}$  dia. microsphere.

The focus distance of the 12  $\mu\text{m}$  dia. microsphere at the refraction index 1.9 is determined by the formula [13]:

$$f = \frac{R}{2} \cdot \frac{n}{n-1} = 6,3 \mu\text{m}. \quad (1)$$

фокусное расстояние составляет в соответствии с формулой [13]:

$$f = \frac{R}{2} \cdot \frac{n}{n-1} = 6,3 \text{ мкм}. \quad (1)$$

Фокусное расстояние  $f$  измеряется от центра микролинзы,  $n$  – показатель преломления. В соответствии с формулой (1) фокус располагается на расстоянии в 0,3 мкм от поверхности микролинзы.

Дальнейшее увеличение разрешающей способности установки возможно при использовании атомно-силовой микроскопии. В настоящее время нами осуществлено моделирование оптимального совмещения схемы традиционного оптического микроскопа, микролинзовой оптики, системы прецизионных перемещений и зондового микроскопа. Проведены расчеты разрешающей способности микролинз [14]. Метрологическая поверка платформы бионаноскопии осуществлена с помощью параллельных измерений на зондовом микроскопе.

Синхронизация оптических, зондовых измерений проводилась с помощью высокопроизводительного цифрового контроллера (на базе FPGA – field programmable gate array – Xilinx Spartan 6). Разработана цифровая система сбора данных и управления параметрами с адаптивной обратной связью на базе "ПО ФемтоСкан Онлайн" [15-16].

Объединение зондовой и микролинзовой микроскопии в единой установке позволяет

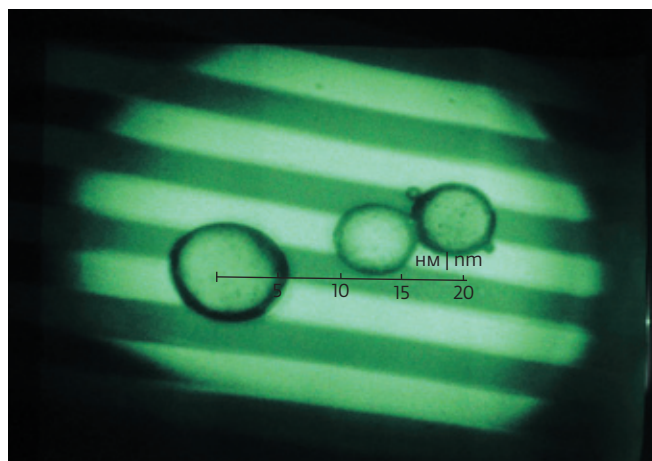


Рис.2. Изображения микросфер из титаната бария на поверхности тестового объекта. Период решетки 6 мкм  
Fig.2. The titanate barium microsphere images on the test object surface. Grid period is 6  $\mu\text{m}$

добиться значительного результата: временного быстрого действия на уровне долей мкс, большого поля обзора в сотни микрон, эффективного манипулирования с биообъектами. Использование установки в биомедицинских исследованиях открывает новые уникальные возможности по непосредственному наблюдению молекулярных механизмов функционирования живой материи, изучению развития вирусной инфекции, скрининга лекарств и др.

Использование в оптической системе лазера на парах меди дает существенное преимущество

The focus distance  $f$  is measured from the center of the microlens,  $n$  – refraction index. According to the formula (1), the focus is located at a distance of 0.3  $\mu\text{m}$  from the microlens surface.

Further increase of the device resolution ability is possible due to using the atomic force microscopy. Presently we have simulated the optimal alignment of the scheme consisted of the traditional optical microscope, microlens optics, precision displacement system, and probe microscope.

Calculation of the microlens resolution ability has also been made [14]. Metrological calibration

of the bionanoscopy platform was carried out by making parallel measurements using a probe microscope.

The high-performing digital controller (based on FPGA – field programmable gate array – Xilinx Spartan 6) was used to synchronize the optical and probe measurements. The digital data collection system, which also controls parameters and has an adaptive feedback based on FemtoScan Online software, has been developed [15-16].

The substantive result was achieved by combining the probe and microlens microscopy in a single

device to obtain a high response time of microseconds fractions, wide field view of hundreds of micrometers, and efficient manipulations with the biological objects.

The use of the device in biological research opens new unique opportunities for the direct observation of live nature molecular mechanisms, study of the viral infection development of a screening of drugs, etc.

## CONCLUSIONS

The significant advantage in the biological objects observation is provided by including a copper-vapour laser into the optical

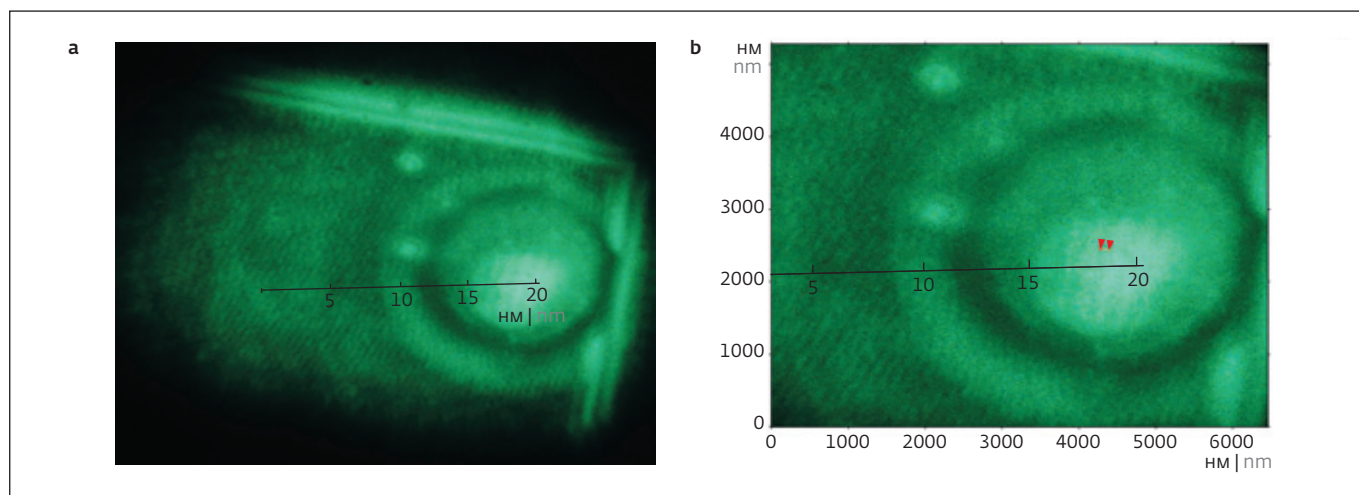


Рис. 3. Изображение топографии микросхемы с расположенной на ней микролинзой: а – микролинза дает увеличенное изображение периодического рельефа, размер микролинзы 12 мкм; б – различное расстояние между полосами составляет около 150 нм (отмечено красными метками)

Fig.3. Topography image of a chip with a microlens: a – microlens forms the enlarged image of the periodic relief. Dimension of a microlens is 12  $\mu\text{m}$ ; б – distinguished distance between the strips about 150 nm (shown by red marks)

в наблюдении биологических объектов. Их визуализация может проводиться в условиях слабой освещенности. В традиционной микролинзовой оптике для достижения необходимого контраста интенсивность света из-за образования фотонной струи достигает больших значений. При наблюдении биологических объектов это может приводить к их повреждению и даже сгоранию. При использовании лазера на парах меди в оптической системе удастся получить

высокий контраст при существенно меньшей степени освещенности образца. Это, безусловно, благотворно влияет на весь ход наблюдений процессов в живой природе при высоком пространственном разрешении на уровне  $1/4$ – $1/8$  длины волны.

Полноценное совмещение микролинзовой технологии, оптического усилителя на основе лазера на парах меди и атомно-силового микроскопа позволяет получить рекордные параметры

scheme. The visualization of these objects can be carried out at low illumination. In traditional microlens optics, when the required contrast is to be achieved, the light intensity reaches high values due to the photonic jet formation. In case of biological objects this phenomenon can lead to their damage or even combustion. It is possible to obtain a high contrast at low sample illumination using a copper-vapour laser in the optical system. It produces a good effect on the observation process of the biological objects in vivo at high spatial resolution on the  $1/4$ – $1/8$  wavelength.

Integral combination of the microlens technology, an optical amplifier based on a copper-vapour laser and an atomic force microscope permits to obtain the highest parameters to observe the biological object not only in air, but also in liquids. The reachable technical parameters are:

- optical resolution of 25–50 nm,
- spatial resolution of atomic force microscopy in three coordinates X-Y-Z is 1–0.1 nm,
- temporary resolution of atomic force microscopy of 1 ms,
- microlens microscopy temporary resolution of 1 ms.

Prospective models of combined microscopy are: a high-speed FemtoScan X atomic force microscope and a copper-vapour laser as an optical amplifier.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The study was completed with the financial support of the RFBR and the London Royal Society No. 21-58-10005. ■

#### Declaration of Competing Interest.

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

по наблюдению за биологическими жидкостями не только на воздухе, но и в жидкости. Достижимые технические параметры:

- оптическое разрешение 25–50 нм,
- пространственное разрешение атомно-силовой микроскопии по трем координатам X-Y-Z – 1–1–0,1 нм,
- временное разрешение атомно-силовой микроскопии – 1 мс,
- временное разрешение микролинзовой микроскопии – 1 мс.

Перспективными моделями для совмещенной установки микроскопии являются быстродействующий атомно-силовой микроскоп "ФемтоСкан X" и лазер на парах меди в качестве оптического усилителя.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества № 21-58-10005.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wang Z., Guo W., Li L., Luk'yanchuk B., Khan A., Liu Z., Chen Z., Hong M. Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope, *Nature Communications* (2011) 2, p. Article No. 218. <https://doi.org/10.1038/ncomms1211>.
2. Monks J., Yan B., Hawkins N., Vollrath F., Wang Z. Spider Silk: Mother Nature's Bio-Superlens, *Nano Letters*. (2016) 16, 5842–5845. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b02641>.
3. Fan W., Yan B., Wang Z.B., Wu L. Three-dimensional all-dielectric metamaterial solid immersion lens for subwavelength imaging at visible frequencies, *Sci. Adv.* (2016) 2, e1600901. <http://dx.doi.org/10.1126/sciad.v.1600901>.
4. Perrin S., Lecler S., Montgomery P. Microsphere-Assisted Interference Microscopy. In: Astratov V. (eds) *Label-Free Super-Resolution Microscopy. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. Springer, Cham. (2019) [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21722-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21722-8_17).
5. Wang F., Liu L. et al. Scanning superlens microscopy for non-invasive large field-of-view visible light nanoscale imaging. *Nat. Commun.* 7, 13748 (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms13748>.
6. Chen Z., Taflove A., Backman V. Photonic nanojet enhancement of backscattering of light by nanoparticles: a potential novel visible-light ultramicroscopy technique. *Opt. Express* 12(7), 1214–1220 (2004). <https://doi.org/10.1364/OPEX.12.001214>.
7. Kasim J., Yu T. et al. Near-field Raman imaging using optically trapped dielectric microsphere. *Opt. Express* 16 (11), 7976–7984 (2008). <https://doi.org/10.1364/OE.16.007976>.
8. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Senotrusova S.A. Optical microscopy using microlenses. *Nanoindustry*, 14 (3–4) 22–25 (2021). doi: 10.22184/1993-8578.2021.14.3-4.184.187
9. Lin Q., Wang D. et al. Super-resolution imaging by microsphere-assisted optical microscopy. *Opt. Quant. Electron.* 48, 557 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11082-016-0833-2>.
10. Zemskov K.I., Isaev A.A., Kazaryan M.A., Petrash G.G. Laser Projection Microscope. *Quantum Electronics* 1, 14–15 (1974). <https://doi.org/10.1070%2FQE1974v004n01ABEH005659>.
11. Zemskov K.I., Kazaryan M., Savranskiĭ V.V., Shafeev G.A. Transmitted-light laser projection microscope. *Soviet Journal of Quantum Electronics*, 9 (11), 1464 (1979). <https://doi.org/10.1070%2FQE1979v009n11ABEH009767>.
12. Morozova E.A., Prokhorov A.M., Savransky V.V., Shafeev G.A. High-speed frame-by-frame registration of images of biological objects using a laser projection microscope, *Reports of the USSR Academy of Sciences*, 261. No. 6. 1460 (1981).
13. Luk'yanchuk B.S., Paniagua-Domínguez R., Minin I., Minin O., Wang Z. Refractive index less than two: photonic nanojets yesterday, today and tomorrow. *Opt. Mater. Express* 7, 1820–1847 (2017). <https://doi.org/10.1364/OME.7.001820>.
14. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Senotrusova S.A. Microlens microscopy opens up new possibilities in the visualization of biological objects. *Medicine and high technologies*, 1, 51–55 (2021). <http://dx.doi.org/10.34219/2306-3645-2021-11-1-51-55>.
15. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. FemtoScan Online software for virus research. *Nanoindustry*, 14 (1 (103)), 62–67 (2021). <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2021.14.1.62.67>
16. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. FemtoScan Online software for solving problems in biology and medicine. *Medicine and high technologies*, (1), 16–22 (2019).

*Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.*