



# МИКРОСКОПИЯ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

## SUPER-RESOLUTION MICROSCOPY IN BIOMEDICINE AND BIOLOGY

И.В. Яминский<sup>1,2,3</sup>, д.ф.-м.н., профессор МГУ имени М.В. Ломоносова, физический и химический факультеты, генеральный директор Центра перспективных технологий, директор Энергоэффективных технологий, вед. науч. сотр. ИНЭОС РАН (ORCID: 0000-0001-8731-3947), А.И. Ахметова<sup>1,2,3</sup>, инженер НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0002-5115-8030), С.А. Сенотруsova<sup>1,2</sup>, студент, (ORCID: 0000-0003-0960-8920) / [yaminsky@anoscropy.ru](mailto:yaminsky@anoscropy.ru)

I.V. Yaminskiy<sup>1,2,3</sup>, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center, 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>, student

DOI: 10.22184/1993-8578.2021.14.7-8.424.428

Получено: 26.11.2021 г.

Оптический микроскоп – это один из самых распространенных и простых приборов для изучения объектов в микромасштабе, особенно в области биологических наук, биомедицины, химии. Значительное ограничение в использовании оптической микроскопии – предел оптической дифракции, который составляет примерно 250 нм в белом свете при длине волны около 550 нм и числовой апертуре микроскопа 1,0. Этого разрешения зачастую недостаточно для решения задач визуализации клеточных органелл, тканей, вирусных и бактериальных частиц. Микросфера, помещенная на поверхность образца, может преодолеть это ограничение и визуализировать структуры размером до 25 нм.

The optical microscope is one of the most common and simple tools for studying objects on the microscale, especially in the biological sciences, biomedicine, and chemistry. A significant limitation for use of the optical microscopy is the optical diffraction limit, which is about 250 nm in white light at a wavelength of about 550 nm and a microscope numerical aperture of 1.0. This resolution is often insufficient for imaging tasks of cell organelles, tissue, viral and bacterial particles. A microsphere placed on the sample surface can overcome this limitation and visualise structures as small as 25 nm.

### ВВЕДЕНИЕ

Предел разрешающей способности в оптике был обнаружен немецким физиком Эрнстом Аббе в 1873 году, когда он определил минимальное расстояние между двумя объектами по формуле:

$$d = \lambda / (2NA), \quad (1)$$

где  $d$  – минимальное расстояние между двумя структурными элементами,  $\lambda$  – длина волны освещения и  $NA$  – числовая апертура используемого объектива [1]. Дифракционный предел Аббе предсказывает размер объектов, различимых в объективе оптического микроскопа. Физическая причина дифракционного предела возникает из-за экспоненциально затухающих волн ближнего

<sup>1</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, физический и химический факультеты, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, 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, Moscow, Russia.

поля, которые несут информацию высокого разрешения об объекте и не могут распространяться в дальнем поле [2]. Это ограничивает визуализацию наноразмерных структур.

В медицине и биологии чрезвычайно требуется прибор, который позволит получать оптические изображения с высоким разрешением, превышающим дифракционный предел. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) часто используются для изображения вирусных и бактериальных частиц с очень высоким разрешением ( $< 10$  нм) в вакууме (рис.1), но они не подходят для изучения живых объектов или взаимодействий вируса с клеткой.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Флуоресцентная оптическая микроскопия – это метод визуализации клеточных структур, бактерий и вирусов с разрешением до 6 нм [3]. Недостаток флуоресцентной оптической визуализации заключается в фотообесцвечивании, которое ограничивает максимальное время воздействия света до десятков секунд [4]. Кроме того, методы флуоресцентной оптической микроскопии зачастую требуют конъюгации флуоресцентных молекул с белками объекта исследования, и одновременно можно визуализировать только один тип окрашенного белка, тогда как в каждой клетке существует множество типов

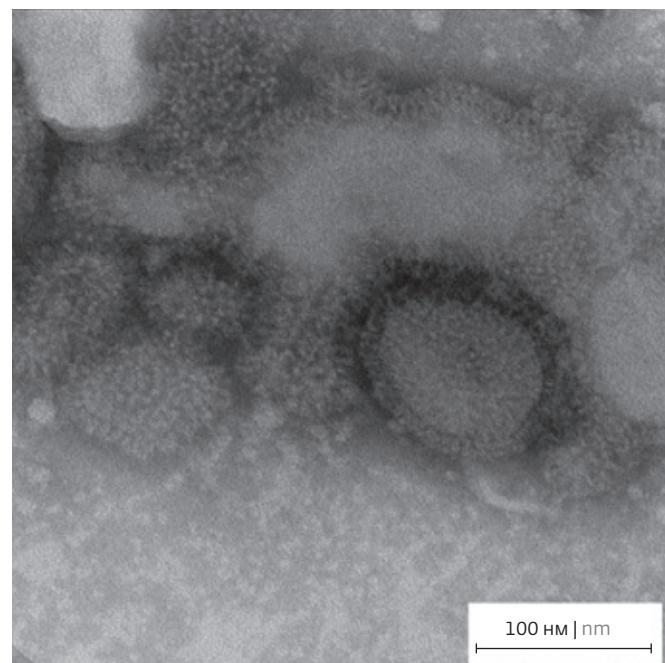


Рис.1. Просвечивающая электронная микроскопия вируса утиного гриппа H3N6

Fig.1. Transmission electron microscopy of H3N6 duck influenza virus

интересующих исследователей белков. Недостаток сканирующей ближнепольной оптической микроскопии заключается в продолжительном снятии кадра, необходимого для получения полного

## INTRODUCTION

The resolution limit in optics was discovered by the German physicist Ernst Abbe in 1873, when he determined the minimum distance between two objects using the formula:

$$d = \lambda / (2NA), \quad (1)$$

where  $d$  is the minimum distance between two structural elements,  $\lambda$  is the wavelength of illumination and  $NA$  is the numerical aperture of the lens used [1]. The Abbe diffraction limit predicts the size of the objects distinguishable in an optical microscope lens. The physical reason for the diffraction limit arises from exponentially evanescent

near-field waves, which carry high resolution information about an object and cannot propagate in the far field [2]. This fact limits the imaging of nanoscale structures.

In medicine and biology, there is an enormous need for an instrument that can produce optical images at high resolution that exceeds the diffraction limit. Transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) are often used to image viral and bacterial particles at very high resolution ( $< 10$  nm) in a vacuum (see Fig.1), but they are not suitable for studying living objects or virus-cell interactions.

## RESEARCH METHODS

Fluorescence optical microscopy is a method of imaging cellular structures, bacteria and viruses at resolutions up to 6 nm [3]. A disadvantage of fluorescence optical imaging is photobleaching, which limits the maximum exposure time to tens of seconds [4]. In addition, fluorescence optical microscopy techniques often require a conjugation of fluorescent molecules with the proteins of the studied subject, and only one type of stained protein can be visualised at a time, whereas in every cell there are many types of proteins of interest to researchers. A disadvantage of the scanning near-field optical microscopy is the long time it takes to

изображения, что затрудняет изучение биологических объектов в динамике.

В связи с этими ограничениями оптической микроскопии были предприняты попытки, позволяющие обойти дифракционный предел путем преобразования затухающих волн ближнего поля в распространяющиеся волны, достигающие дальнего поля. Возможность передачи информации из ближнего поля в дальнее, где она собирается с помощью обычного оптического микроскопа, осуществима благодаря размещению на поверхности образца наноразмерных линз [5], микрокапель полимера [6] или диэлектрических микросфер [7]. Также было предложено использовать микросфера с высоким показателем преломления ( $n > 1,8$ ), которые полностью погружаются в жидкость или в пластины эластомера [8]. Использование иммерсионных жидкостей позволило получить изображения клеток, субклеточных структур и белков. В работе [9] с помощью линзы из  $\text{BaTiO}_3$  диаметром 100 мкм и установки для оптической микроскопии получили изображение частиц аденоно-вируса диаметром 75 нм. Микролинзы использовали для визуализации актина [10], для определения флуоресцентно окрашенных центриолей, митохондрий, хромосом, для изучения влияния лечения доксициклином на экспрессию митохондриально-кодируемого белка в клеточной линии печени мыши [11].

В работе [12] сообщается об оптической визуализации объектов с латеральным разрешением 25 нм ( $\sim \lambda / 17$ ) при освещении с длиной

волны 408 нм путем комбинирования микросфер из плавленого кварца и полистирола с помощью обычного сканирующего лазерного конфокального микроскопа.

Недостатком микролинзовой микроскопии является ограниченное поле зрения, которое не может превышать диаметра линзы или другого объекта, помещенного на образец. Другим ограничивающим фактором является то, что микросфера размещаются на поверхности случайным образом, поэтому только определенная часть объектов может быть визуализирована, а положение линз на образце трудно изменить. Но уже ведутся работы по созданию установок для непрерывного сканирования большого поля обзора изучаемого пространства. Для создания изображений со сверхвысоким разрешением на больших участках микросферу установили на рамке, прикрепленной к объективу микроскопа, которая автоматически шаг за шагом сканирует образец [13].

## ВЫВОДЫ

Нашей научной группой также ведутся работы по совершенствованию системы микролинзовой микроскопии, в частности, разрабатывается установка для совмещенной атомно-силовой и микролинзовой микроскопии на базе сканирующего зондового микроскопа "ФемтоСкан Xi" [14]. Микролинза фиксируется на кантileвере для атомно-силовой микроскопии, а сканирование осуществляется параллельно в двух

acquire a complete image, making it difficult to study biological objects in dynamics.

Because of these optical microscopy limitations, attempts have been made to circumvent the diffraction limit by converting near-field evanescent waves into propagating waves that reach the far field. The possibility of transmitting information from the near field to the far field, where it is collected using a conventional optical microscope is made possible by placing nanoscale lenses [5], polymer microdroplets [6] or dielectric microspheres [7] on the surface of the sample. The use of

microspheres with a high refractive index ( $n > 1.8$ ), that are completely immersed in the liquid or in elastomeric plates, has also been proposed [8]. The use of immersion liquids has made it possible to obtain images of cells, subcellular structures and proteins.

In [9], a 100  $\mu\text{m}$  diameter  $\text{BaTiO}_3$  lens and an optical microscopy unit were used to image adenovirus particles with a diameter of 75 nm. Microlenses have been used to visualize actin [10], to detect fluorescently stained centrioles, mitochondria, chromosomes, and to study the effect of doxycycline treatment on the expression of

mitochondrial-encoded protein in a mouse liver cell line [11].

In [12], optical imaging of objects at a lateral resolution of 25 nm ( $\sim \lambda / 17$ ) under 408 nm illumination is reported by combining fused quartz and polystyrene microspheres using a conventional scanning laser confocal microscope.

A disadvantage of the micro-lens microscopy is the limited field of view, which cannot exceed the diameter of the lens or other object placed on the sample. Another limiting factor is that the microspheres are randomly placed on the surface, so only a



режимах – в ПО отображается топография поверхности и изображение через микролинзу. Получены изображения тестовых образцов с помощью оптического микроскопа и микролинз из оксида титана  $TiO_2$ . Расстояние между красными метками соответствует примерно 100 нм (рис.2).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества № 21-58-10005, РФФИ, проект № 20-32-90036. Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям, проект № 71108, договор 0071108.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Archiv. Mikrosk. Anat. 1873, 9, 413–418.
2. Yan B., Wang Z., Parker A.L., Lai Y.K., Thomas P.J., Yue L., Monks J.N. Superlensing microscope objective lens. Appl. Opt. 56, 3142 (2017). <https://doi.org/10.1364/AO.56.003142>
3. Huang B., Wang W., Bates M., Zhuang X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic

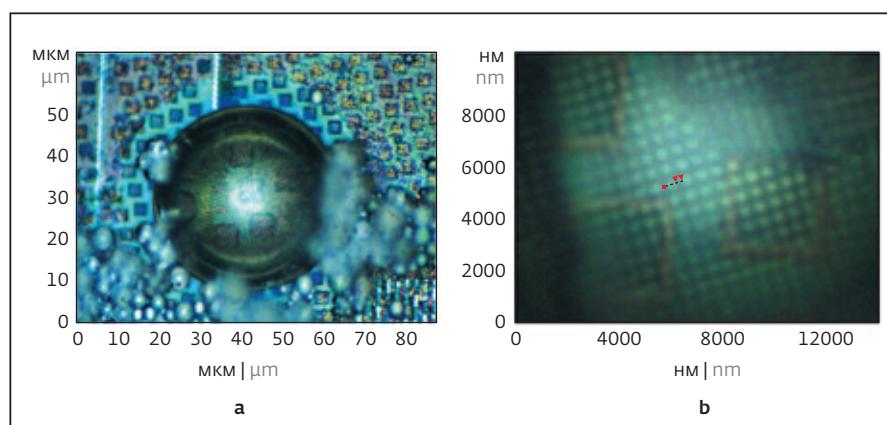


Рис.2. а – изображение тестового образца сквозь микролинзу из оксида титана  $TiO_2$ ; б – крупный план изображения. Расстояние между красными метками соответствует примерно 100 нм

Fig.2. a – image of a sample through a  $TiO_2$  titanium oxide microlens; b – detailed view of the image. The distance between the red labels corresponds to approximately 100 nm

tic optical reconstruction microscopy. Science 319, 810–813 (2008). <https://doi.org/10.1126/science.1153529>

4. Renn A., Seelig J., Sandoghdar V. Oxygen-dependent photochemistry of fluorescent dyes studied at the single molecule level. Mol Phys 104, 409–414 (2006).
5. Gambin Y., Legrand O., Quake S.R. Micro-fabricated rubber microscope using soft solid immersion lenses, Appl. Phys. Lett. 88, 174102 (2006). <https://doi.org/10.1063/1.2194477>.

certain portion of the objects can be visualised and the position of the lenses on the sample is difficult to change.

However, the work is already underway to create installations for continuous scanning of a large view field of the studied space. To create ultra-high resolution images over large areas, a microsphere is mounted on the frame attached to the microscope objective, which automatically scans the sample step by step [13].

### CONCLUSIONS

Our research group is also working on improving the microlens

microscopy system, in particular, we are developing a facility for combined atomic force microscopy and microlens microscopy based on the FemtoScan Xi scanning probe microscope [14]. A microlens is fixed on the cantilever for the atomic force microscopy and scanning is performed in parallel in two modes – the software displays the surface topography and the image through the microlens. Images of test specimens are obtained using an optical microscope and titanium  $TiO_2$  oxide microlenses. The distance between the red marks

corresponds to approximately 100 nm (see Fig.2).

### ACKNOWLEDGEMENTS

The study was completed with the financial support of the RFBR and the London Royal Society No. 21-58-10005, and RFBR, Project No. 20-32-90036. This research was carried out with financial support from the FASIE, Project No. 71108, and Agreement No. 0071108.

**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.



6. Darafsheh A., Walsh G.F., Dal Negro L., Astratov V.N. Optical super-resolution by high-index liquid immersed microspheres. *Appl. Phys. Lett.* 101, 141128 (2012). <https://doi.org/10.1063/1.4757600>
7. Darafsheh A., Limberopoulos N.I., Derov J.S., Walker D.E., Astratov V.N. Advantages of microsphere-assisted super-resolution imaging technique over solid immersion lens and confocal microscopies. *Appl. Phys. Lett.* 104, 061117 (2014). <https://doi.org/10.1063/1.4864760>
8. Darafsheh A., Guardiola C., Palovcak A., Finlay J.C., Carabe A. Optical super-resolution imaging by high-index microspheres embedded in elastomers. *Opt. Lett.* 40, 5 (2015). <https://doi.org/10.1364/OL.40.000005>
9. Li L., Guo W., Yan Y. et al. Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy. *Light Sci Appl* 2, e104 (2013). <https://doi.org/10.1038/lsa.2013.60>
10. Brettin A., Blanchette K.F., et al. Microsphere nanoscopy for imaging of actin proteins, IEEE National Aerospace and Electronics Conference (NAECON) and Ohio Innovation Summit (OIS) 269-271 (2016). <https://doi.org/10.1109/NAECON.2016.7856811>.
11. Yang H., Moullan N., Auwerx J., Gijs M.A.M. Superresolution biological microscopy using virtual imaging by a microsphere nanoscope. *Small* 10, 1712 (2014). <https://doi.org/10.1002/smll.201302942>
12. Yan Y., Li L., Feng C., Guo W., Lee S., Hong M. Microsphere-coupled scanning laser confocal nanoscope for sub-diffraction-limited imaging at 25 nm lateral resolution in the visible spectrum. *ACS Nano* 8, 1809 (2014). <https://doi.org/10.1021/nn406201q>
13. Huszka G., Yang H., Gijs M.A.M. Microsphere-based super-resolution scanning optical microscope. *Optics Express* Vol. 25, Issue 13, pp. 15079-15092 (2017) <https://doi.org/10.1364/OE.25.015079>
14. Akhmetova A.I., Gukasov V.M., Rybakov Y.L., Yaminsky I.V. High-speed scanning probe microscopy in biomedicine. *Bio-Medical Engineering*, 54(6) 434-437 (2021). <http://dx.doi.org/10.1007/s10527-021-10056-4>

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



## ИЗДАТЕЛЬСТВО «ТЕХНОСФЕРА» ПРЕДСТАВЛЯЕТ КНИГУ:



### Юрген Бёккер СПЕКТРОСКОПИЯ

Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2021. – 528 с., ISBN 978-5-94836-220-5

Цена 760 руб.

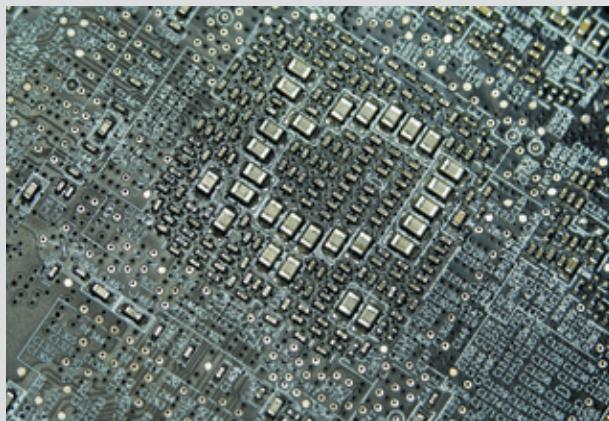
Спектроскопия как средство описания атомов, ионов и молекул с помощью типовых длин волн, измеряемых при возбуждении, принадлежит сегодня к важнейшим и самым распространенным методам инструментальной аналитики. Специальные измерительные устройства, в том числе абсорбционные и эмиссионные спектрометры, обеспечивают точное определение количественного и качественного состава газообразных, жидких и твердых веществ.

В книге дается обзор разных методов атомной и молекулярной спектрометрии и рассматриваются многие аналитические проблемы, решаемые в лабораториях промышленных предприятий, в естественнонаучных и технических учреждениях, а также проблемы изучения и защиты объектов окружающей среды. В книге представлена широкая гамма существующих методов исследования, а также перечень приборов с руководством по их применению.

### КАК ЗАКАЗАТЬ НАШИ КНИГИ?

125319, Москва, а/я 91; тел.: +7 495 234-0110; факс: +7 495 956-3346; e-mail: knigi@technosphera.ru; sales@technosphera.ru

## ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ ЕМКОСТЬ В ТОПОЛОГИЧЕСКИХ ТРАНЗИСТОРАХ СНИЗИТ ЭНЕРГОПОТРЕБЛЕНИЕ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ ТЕХНИКИ



Австралийские исследователи обнаружили, что отрицательная емкость может снизить энергопотребление в электронике и вычислительной технике, на которую приходится 8% мирового спроса на электроэнергию. Исследователи в рамках Центра передового опыта ARC в области будущих технологий низкоэнергетической электроники (FLEET) использовали отрицательную емкость, чтобы заставить топологические транзисторы переключаться при более низком напряжении, потенциально снижая потери энергии в десять и более раз. И хотя на пути к созданию рабочего настольного устройства остаются нерешенные задачи, работа защищена патентной заявкой.

Для включения и выключения транзистора каждый раз затрачивается небольшое количество электрической энергии. Поскольку компьютерные чипы, на которых работают все электронные устройства, содержат миллионы и миллиарды транзисторов, переключающихся миллиарды раз в секунду (на гигагерцовых частотах), большое количество питающей их энергии расходуется в виде тепла. В целом, информационно-коммуникационные технологии потребляют около 8% мирового электроснабжения, и это количество удваивается каждое десятилетие. В будущем дисбаланс между растущими потребностями вычислительной техники в энергии и доступной сейчас энергией "сильно ограничит" будущий рост вычислительной техники.

### ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗОЛЯТОРЫ

Вместо кремния исследователи FLEET работают с новыми видами квантовых материалов, называемых топологическими изоляторами. Внутренняя часть этих материалов изолирована, а внешние части обладают проводимостью. Если они трехмерны, то проводят ток на своих двумерных поверхностях, а если изделия из них очень тонкие (двумерные), то проводимостью обладают их одномерные края.

### ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ТРАНЗИСТОРЫ

Исследователи FLEET обнаружили, что с помощью электрического поля можно переключить материал из топологического изолятора (который проводит электричество вдоль своих краев) в обычный изолятор (который вообще не проводит). Это позволяет использовать топологический

материал в качестве транзистора, называемого топологическим квантовым полевым транзистором (TQFET).

Ранее в FLEET обнаружили, что TQFET может переключаться при более низком напряжении, чем обычный FET, преодолевая так называемый предел Больцмана, который устанавливает нижний предел напряжения, необходимого для переключения тока при комнатной температуре. Переключение при низком напряжении происходит благодаря спин-орбитальной связи, которая сильнее в более тяжелых элементах (например, висмут). Обнаружено, что TQFET на основе висмута могут переключаться при вдвое меньшем напряжении и используют для этого на четверть меньше энергии, чем обычные FET аналогичного размера. Недавно было обнаружено, что можно еще больше снизить используемые напряжение и энергию при применении отрицательной емкости для подключения топологического материала к выводу затвора.

### КАК ЕМКОСТЬ МОЖЕТ БЫТЬ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ?

Если бы емкость была отрицательной, конденсатор был бы по своей природе нестабильным и стремился бы зарядиться без приложения внешнего напряжения. Но именно это делает ферроэлектрический материал, обладающий спонтанной поляризацией, заряжающей его поверхность. Таким образом, ферроэлектрический материал можно рассматривать как имеющий отрицательную емкость в определенном режиме, как правило, недоступном из-за своей нестабильности. Однако, отрицательная емкость может повысить эффективность топологических транзисторов. Недавно группа исследователей FLEET показала, что для TQFET это не так. Добавление отрицательной емкости (ферроэлектрического материала) для создания TQFET с отрицательной емкостью (NC-TQFET) усиливает электрическое поле, что позволяет осуществлять переключение при гораздо меньших напряжениях и энергиях. TQFET использует электрическое поле для переключения, поэтому может напрямую воспользоваться усилением электрического поля, которое обеспечивается отрицательной емкостью. По расчетам ученых, NC-TQFET на основе висмута, использующий в качестве ферроэлектрика  $\text{HfO}_2$ , легированный лантаном (этот ферроэлектрический материал был успешно интегрирован в кремний), может достичь в десять раз меньшей энергии переключения, чем современный кремниевый FET. Более совершенные ферроэлектрики с большей остаточной поляризацией могут обеспечить переключение при еще более низких энергиях.

Однако на пути к созданию рабочего NC-TQFET на уровне промышленных устройств остается много проблем. Топологические изоляторы на основе висмута с нужной структурой еще не созданы, а интеграция этих материалов с ферроэлектрическими слоями пока проблематична. Тем не менее, такие структуры значительно снижают энергопотребление в будущих транзисторах, а исследователи из FLEET уже подали заявку на получение патента на концепцию NC-TQFET, а FLEET ищет возможности сотрудничества с партнерами для дальнейшего развития этой перспективной технологии.

По материалам: <https://www.nanowerk.com>