

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВЕТИ КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
ФИЗИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



ДИПЛОМНА РАБОТА

На тема: “Изследване на наночастици от SiO_2 с атомно-силов
микроскоп (AFM)”

Дипломант:

Мариям Ел Дали

Ф № 50113

Специалност Медицинска Физика

Научен ръководител:

гл. ас. д-р Николай Зографов

Nikolay Zografov

Digitally signed by Nikolay
Zografov

Date: 2026.09.07 19:03:12 +03'00'

Катедра „Физика на кондензираната материя и микроелектроника“

2026

СОФИЯ

СЪДЪРЖАНИЕ

1	Увод.....	3
2	Обзорна част.....	4
2.1	Атомно-силова микроскопия (AFM).....	4
2.1.1	Кантилевер.....	6
2.1.2	Фотодетектор.....	16
2.1.3	Електроника и хардуер.....	18
2.1.4	Режими на работа.....	19
2.1.5	Влияние на влажността на околната среда.....	21
2.2	Наночастици SiO ₂	22
2.2.1	Характеристики.....	22
2.2.2	Свойства.....	23
2.2.3	Приложения в медицината.....	25
3	Експериментална част.....	26
3.1	Експериментална постановка.....	26
3.2	Използвани материали - наночастици SiO ₂ NG01EM3007.....	31
3.3	Метод за подготовка на препаратите и експерименталните образци.....	32
3.4	Експериментални резултати.....	35
3.4.1	Измерване на чиста стъклена подложка.....	36
3.4.2	Препарат 1.....	37
3.4.3	Препарат 2.....	38
3.4.4	Препарат 3.....	40
3.4.5	Препарат 4.....	43
3.4.6	Препарат 5.....	45
4	Заключение.....	47
5	Списък на използваните съкращения.....	48
6	Списък на означенията и физичните величини.....	49
7	Използвана литература.....	50
8	Благодарности.....	51

1 УВОД

Атомно-силовите микроскопи (AFM) са революционни изследователски инструменти в съвременната наука, защото позволяват сканиране и триизмерно изобразяване на повърхности с нанометрова разделителна способност. За разлика от конвенционалните оптични или електронни микроскопи, AFM работи на принципа на „осезанието“ действащо в атомарен мащаб. Изключително фина сонда (наносонда) преминава по повърхността на образца и отчита и най-малките релефни промени. Това ни позволява да наблюдаваме обекти с размерите на отделни молекули без необходимост от сложна и увреждаща подготовка на пробите. В съвременната медицина това уникално свойство превръща AFM във важен метод за развитието на наномедицината. Инструментът е незаменим при проектирането, тестването и анализа на наночастици, които се използват като интелигентни системи за прецизно доставяне на лекарства директно в целевите клетки на организмите.

Важна роля на атомно-силовата микроскопия има и при изследването на медицински наночастици с цел определяне на точния размер и топография, които са важни за определяне на ефективността на една наночастица, и дали изобщо тя може да премине през биологичните мембрани. Всичко това зависи изцяло от нейния мащаб и форма.

AFM технологията предоставя триизмерни изображения с висока резолюция, позволявайки ни да изследваме наноструктурите с точност до нанометър и дори по-точно. Поради тази причина поставихме целта на дипломната работа: да демонстрираме особеностите и възможностите на AFM за медицински научноизследователски цели, както го използваме за изследване на топологията на различни препарати от наночастици.

За постигане на целта на дипломната работа са поставени три основни задачи:

- 1) Обзорно представяне на AFM технологията
- 2) Проучване и представяне на информация за наночастиците от SiO_2
- 3) Провеждане на AFM изследване за получаване на изображения демонстриращи топологията на наноструктури в образци от различни препарати на наночастици SiO_2 нанесени върху предметно стъкло.

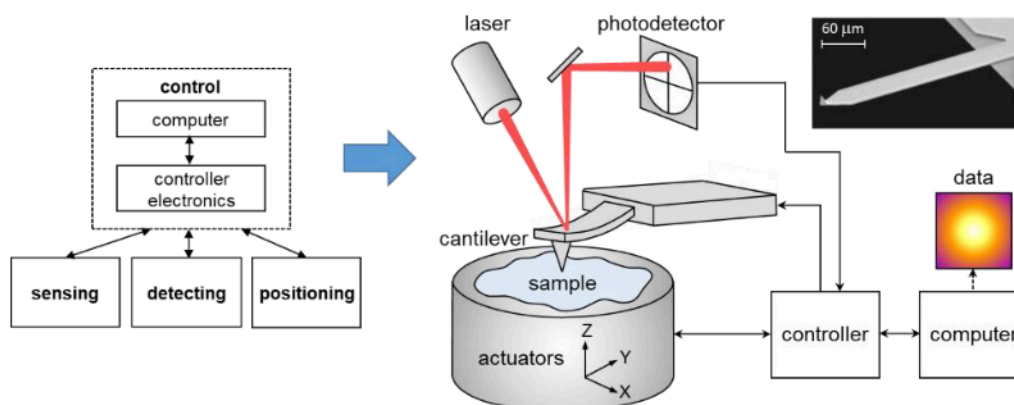
Изборът на наночастици от SiO_2 е свързан с техните възможни приложения в медицината като преносители на лекарствени вещества в клетката.

2 ОБЗОРНА ЧАСТ

2.1 Атомно-силова микроскопия (AFM)

Атомно-силовата микроскопия (AFM) е изключително мощен метод за изобразяване и анализ с висока разделителна способност, представляващ основен клон от фамилията на сканиращите сондови микроскопи (SPM). Технологията е изобретена през 1986 г. от Герд Биниг, Калвин Кует и Кристоф Гербер, като скоро след това революционизира нанотехнологиите чрез способността си да измерва и визуализира материали на нанониво. Принципът на действие се основава на механично докосване на повърхността чрез изключително остър връх, наречено сонда, прикрепен към гъвкаво рамо, наречено кантилевер, което позволява постигането на разделителна способност от порядъка на части от нанометра – над 1000 пъти по-прецизно от лимита на оптичната дифракция. Функционирането на микроскопа се управлява от фините сили на взаимодействие (привличащи и отблъскващи) между атомите на върха и тези на повърхността на образца, които причиняват огъване на кантилевера, регистрирано в реално време чрез прецизна лазерна система и фотодиоден детектор. Едно от най-значимите предимства на AFM пред електронната микроскопия е способността му да работи не само във вакуум, но и в атмосферни условия и в течна среда, което го прави незаменим инструмент в медицината за изследване на биологични макромолекули, клетки и наночастици в тяхното натурално състояние и при физиологични условия. [1]

За разлика от традиционните микроскопи, AFM не използва лещи или лъчево облъчване, а разчита на физическото взаимодействие между върха на сондата и атомите на повърхността. За тази цел устройството има специфична конструкция показана на фигура 1.

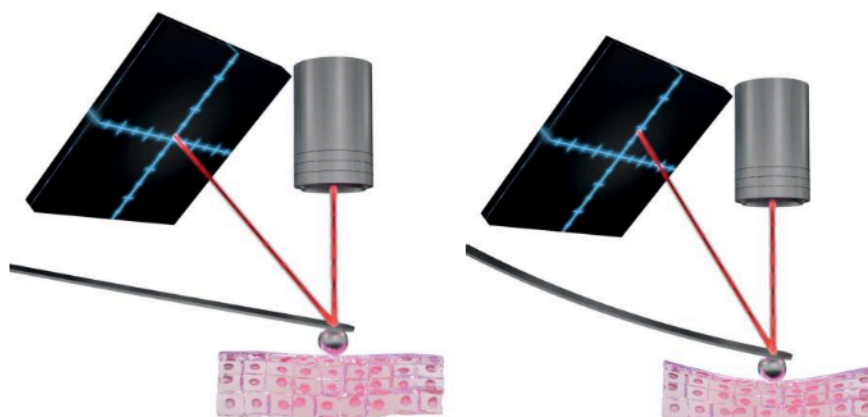


Фигура 1. Схема на атомно-силов микроскоп. Върхът на кантилевера взаимодейства физически с образца, като това взаимодействие се измерва от фотодетектор, регистриращ лазерния сигнал, отразен от горната част на конзолата [13].

Както е показано на **фигура 1**, взаимодействието между върха на кантилевера и образеца се регистрира чрез оптична система за детекция. Лазерният лъч се насочва към задната повърхност на кантилевера и се отразява към позиционно-чувствителен фотодетектор. При огъване или трептене на кантилевера ъгълът на отражение на лазерния лъч се променя. По този начин много малките механични отклонения на кантилевера се преобразуват в измерим електрически сигнал от фотодетектора. Този принцип позволява да бъдат регистрирани изключително малки изменения в положението на сондата.

По време на измерването образецът и сондата се позиционират прецизно една спрямо друга посредством пиезоелектрични актуатори, обозначени на **фигура 1** по координатите X, Y и Z. Те осигуряват прецизно движение в хоризонталната равнина и във вертикална посока. При сканиране върхът преминава последователно през различни точки от изследваната област, като системата регистрира промяната в сигнала от фотодетектора.

За поддържане на подходящо взаимодействие между върха и повърхността се използва система за обратна връзка. Полученият от фотодетектора сигнал се подава към управляващата електроника и компютъра. В зависимост от регистрираното отклонение системата коригира положението на пиезоелектричния актуатор по Z, така че относителното разстояние между върха и повърхността да се поддържа около зададената стойност. По този начин движението на актуатора следва релефа на повърхността. Получените данни за положението на сондата се записват от компютъра и се преобразуват в топографско изображение на повърхността. [23]



Фигура 2. AFM се основава на регистрирането на силите на взаимодействие между повърхността на образца и кантилевера. [23]

2.1.1 Кантилевер

Материали и размери

Кантилеверът е микроскопичен гъвкав лост, който служи като механичен датчик за силите, действащи между върха и образеца. Кантилеверите се изработват чрез микротехнологии предимно от силиций Si или силициев нитрид Si_3N_4 .

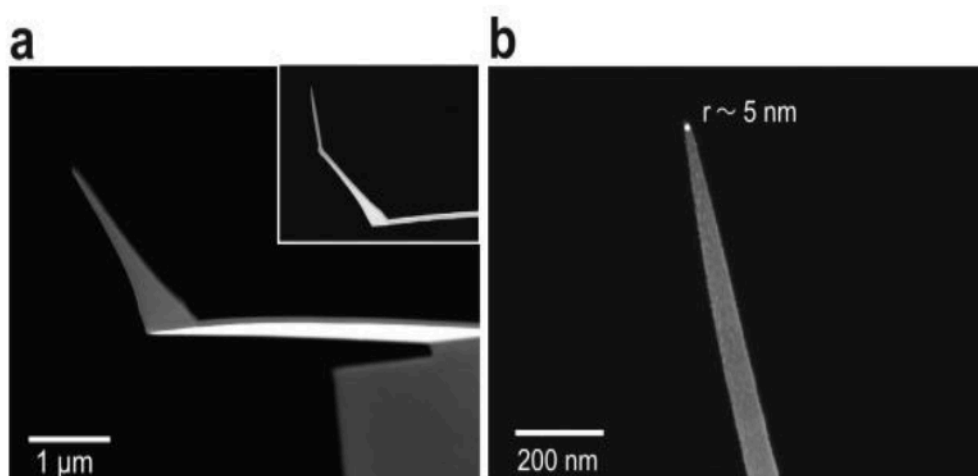
Изборът между силиций Si и силициев нитрид Si_3N_4 за изработка на кантилевери директно определя коравината и приложението на сондата. Силицият Si се счита за стандартен материал в атомно-силовата микроскопия и обикновено се използва за изработка на по-твърди кантилевери с по-високи константи на еластичност. Благодарение на своята кристална структура, силициевите сонди позволяват формирането на изключително остри върхове с радиус на закръгление под 10 нанометра, което ги прави първи избор за топографско изобразяване на твърди повърхности с висока разделителна способност [14].

За разлика от тях, силициевият нитрид Si_3N_4 материалът, който обикновено се използва за производство на по-меки и гъвкави кантилевери с ниски константи на еластичност. Тази характеристика е от значение при изследването на биологични проби, като живи клетки, протеини или ДНК, където е необходимо да се работи с минимални сили на натиск (често под 1 nN), за да се избегне деформация или разрушаване на структурата на обекта. Чрез микротехнологии от силициев нитрид могат да се създават изключително тънки слоеве, което позволява постигането на желаната ниска коравина, подходяща за меки материали. Кантилевери изработени от силициев нитрид са с дебелина 140 nm, ширина 2 μm и дължина 9–11 μm .

За високоскоростни изследвания (HS-AFM) се използват специални малки кантилевери с дължина под 10 μm , които позволяват работа при много високи честоти. Размерите им варират от десетки до стотици микрометри. Стандартен V-образен кантилевер може да има дължина около 200–210 μm и ширина на рамото 20–30 μm .

Тяхната цел е да съчетаят висока резонансна честота за бързо сканиране с ниска константа на еластичност за минимизиране на силата върху пробата. Типичните им размери могат да бъдат например 6–7 μm дължина, 2 μm ширина и дебелина само 90–140 nm. Изборът на конкретна геометрия и размер зависи от вида на изследвания обект. Например, за меки биологични проби се търсят кантилевери с ниска коравина, за да не се деформира или повреди повърхността на клетката. [3]

Основната разлика между стандартните кантилевери и тези, използвани за високоскоростна атомно-силова микроскопия (HS-AFM) е в техните геометрични размери. Докато стандартните кантилевери обикновено имат дължина и ширина от десетки до стотици микрометри, специализираните сонди за HS-AFM са многократно по-малки, често с дължина под 10 μm , ширина около 2 μm и дебелина само 90–140 nm. По-малките размери на рамото позволяват на микроскопа да заснема изображения с честота от няколко кадъра в секунда, достигайки до интервали от 80 ms за изображение, което е невъзможно при използването на стандартни сонди, изискващи минути за едно изображение.

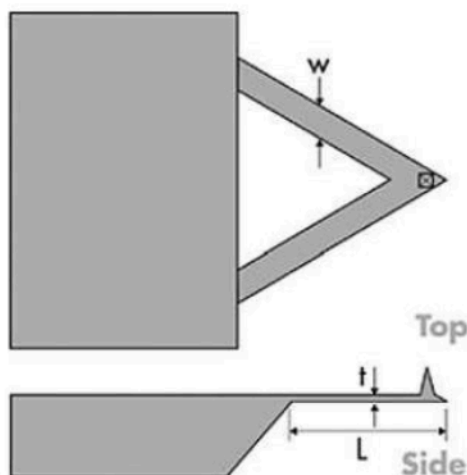


Фигура 3. Малък кантилевер. (а) Изображение от сканираща електронна микроскопия (Scanning electron microscopy SEM) на малък кантилевер. Снимката показва връх, отложен чрез електронен сноп (electron-beam-deposited EBD), с форма на птичи клон. (б) Увеличено SEM изображение на EBD връх [21].

Механичните свойства на тези два типа сонди са оптимизирани за различни цели, като при HS-AFM е постигането на висока резонансна честота при запазване на ниска константа на еластичност. Стандартните кантилевери имат сравнително ниски резонансни честоти, докато малките кантилевери за високоскоростни изследвания достигат от 400 kHz до 1.2 MHz в течна среда и до 3.5 MHz във въздух.

По отношение на инвазивността, HS-AFM кантилеверите са проектирани да бъдат значително по-щадящи за пробата. Поради високата честота на трептене, времето за физически контакт между върха и повърхността е изключително кратко (около 100 ps или по-малко), което означава, че пренесеният импулс на силата е твърде малък, за да наруши структурата или функцията на обекти като протеини или ДНК. Използването на стандартни кантилевери за динамични процеси често води до деформация или повреда на образца поради по-големите сили и по-бавната реакция на системата. Затова малките

кантилевери от силициев нитрид, често оборудвани с изключително остри върхове, отгледани чрез електронен сноп (EBD), са предпочитаният инструмент за заснемане на биомолекулярни процеси в оригиналното им състояние [21].



Фигура 4. Диаграма на кантилеверът използван за закрепване на колоидна сонда, където $W = 20\text{--}30\text{ }\mu\text{m}$, $L = 200\text{--}210\text{ }\mu\text{m}$, $T = 0.55\text{--}0.65\text{ }\mu\text{m}$ [6].

Геометрия

Геометрията на кантилевера (гъвкавото рамо) директно определя механичните му свойства, като коравина (константа на еластичност) и резонансна честота. В атомно-силовата микроскопия кантилеверът се разглежда като идеална пружина, която се подчинява на закона на Хук, където силата на взаимодействие F е правопропорционална на механичното отклонение d на рамото.

$$F = k_c d \quad (1)$$

Където k_c е коравината на кантилевера.

Коефициентът на пропорционалност, известен като константа на еластичност k , дефинира механичната коравина на сондата и е от фундаментално значение за точното определяне на силите, действащи върху пробата. Основното уравнение, което описва връзката между физическите характеристики на кантилевера и неговата коравина, е

$$k = \frac{Ewt^3}{4L^3} \quad (2)$$

Където w е ширината, t е дебелината, L е дължината, а E е модулът на Юнг на материала, от който е изработена сондата (силиций или силициев нитрид). От формулата (2) е видно, че малки промени в дебелината t или дължината L оказват огромно влияние върху чувствителността на сондата.

Прецизното измерване на дебелината на нанониво е изключително трудно, което прави стойностите от производителите недостатъчно точни за количествени измервания, затова се прилага експериментално калибриране чрез метода на термично калибриране (thermal tune), който се основава на теоремата за равномерно разпределение (equipartition theorem) на енергията. В този случай кантилеверът се разглежда като хармоничен осцилатор в термодинамично равновесие, чиято средна потенциална енергия е свързана с температурата, което може да се опише чрез хамилтониана (Hamiltonian).

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}mw_0^2x^2 \quad (3)$$

Където m е масата на осцилатора, p е неговият импулс, w_0 е резонансната кръгова честота и x е вертикалното преместване на осцилатора. Съгласно теоремата за равномерно разпределение на енергията, всеки квадратичен член в Хамилтониана има средна стойност от

$$\frac{1}{2}k_B T \quad (3)$$

Където k_B е константата на Болцман, а T е абсолютната температура. Следователно:

$$\langle \frac{1}{2}mw_0^2x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (4)$$

Чрез заместване на $w_0^2 = k/m$ в **формула 4** константата на еластичност може да бъде получена чрез измерване на средноквадратичното отклонение на осцилатора (в този случай на кантилевера) по формулата:

$$k = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (5)$$

Получената зависимост показва теоретичната основа на термичното калибриране, при която константата на кантилевера се свързва със средноквадратичното му отклонение. На практика обаче това отклонение не се определя чрез директно измерване, а се извлича от регистрираните топлинни флуктуации на кантилевера. За тази цел се анализира спектърът на термичните колебания, чрез който експериментално се определя движението на сондата и съответно нейната константа на еластичност.

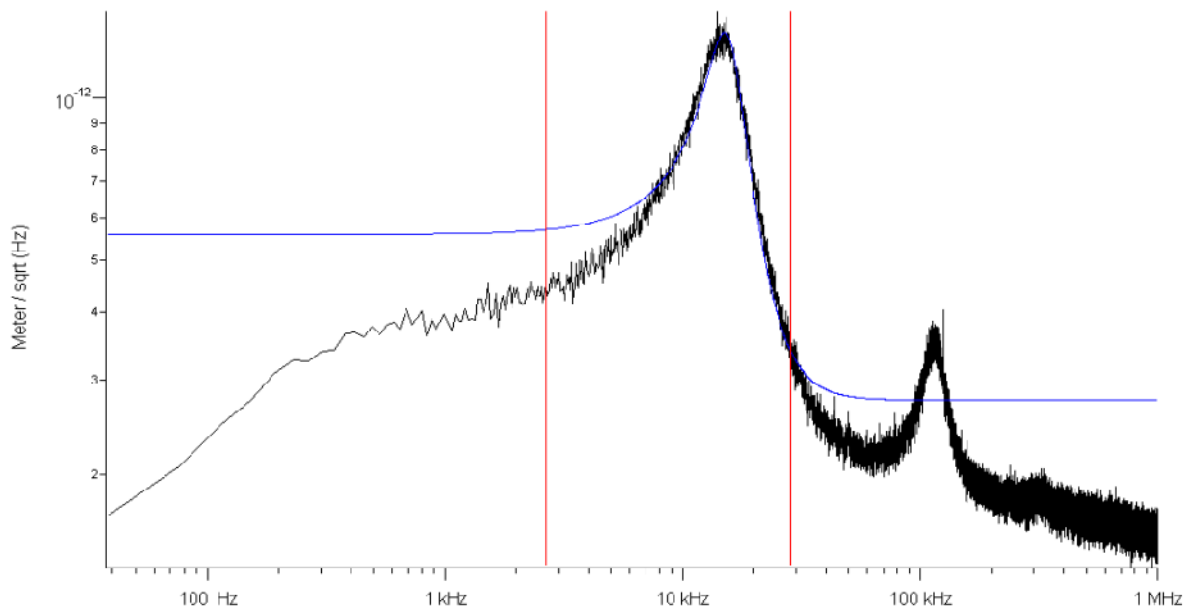
За експерименталното определяне на средноквадратичното отклонение се използват топлинните флуктуации на AFM кантилевера, възникващи вследствие на взаимодействието му с околната среда. При стайна температура тези флуктуации са достатъчно малки, за да позволят апроксимацията на рамото като прост хармоничен осцилатор. При това условие пружинната константа може да бъде изчислена чрез

измерване на спектралната плътност на мощността при преместването на кантилевера, която притежава характерна Лоренцова форма представена на фигура 5. През интегриране на този силов спектър се получава общата мощност на топлинните колебания P , която е еквивалентна на средноквадратичното отклонение на рамото. По този начин стойността на пружинната константа се определя чрез израза:

$$k = \frac{k_B T}{P} \quad (6)$$

където P представлява площта под Лоренцовата крива. Методът на термично калибриране е най-разпространеният подход за калибриране на AFM сонди, тъй като е технически достъпен и не крие риск от механично увреждане на острия връх на сондата [7].

Методът на термично калибриране позволява експериментално да бъде определена константата на еластичност на кантилевера (фигура 5), която е свързана с неговите механични характеристики. Тези характеристики от своя страна зависят не само от свойствата на материала, но и от геометрията на самия кантилевер. В зависимост от конструкцията и предназначението на сондата се използват различни геометрични форми, всяка от които притежава специфични механични характеристики и области на приложение.



Фигура 5. Термично калибриране (thermal tune) на кантилевер за контактен режим в течност. Синята линия е Лоренцовата апроксимация (fit) към първия резонансен пик [17].

Двете най-често използвани геометрии са правоъгълна (diving-board) и Триъгълна (V-образна). Правоъгълната е най-разпространената и лесна за теоретично моделиране форма. Триъгълната (V-образна) представлява две рамена, съединени при върха. Този дизайн често се избира, за да се осигури по-голяма стабилност. Двата вида са показани във Фигура 4.

Правоъгълната геометрия на кантилеверите, често описвана като diving-board, е една от най-често използваните форми в атомно-силовата микроскопия. Те се състоят от дълго и тясно рамо, изработено обикновено от силиций или силициев нитрид чрез микротехнологии, като в неговия свободен край е разположен острият връх. Този дизайн позволява на кантилевера да функционира като чувствителна пружина, която регистрира минималните сили на взаимодействие с повърхността на образеца. Благодарение на своята форма, правоъгълните кантилевери са лесни за теоретично моделиране и са предпочитани за широк спектър от приложения като топографско картографиране и силова спектроскопия. Механичните характеристики на тези структури, и по-точно техният коефициент на еластичност (константа на еластичност k), са пряко определени от геометричните им размери съгласно зависимостта в формула 1. Типични размери за правоъгълни кантилевери, използвани при колоидни сонди, са дължина около 200–210 μm и дебелина едва 0.55–0.65 μm [6, 14].

Едно от ключовите предимства на правоъгълните кантилевери е възможността за прецизно калибриране на техните свойства чрез метода на Садер (Sader method). Този подход се основава на измерване на термичните флуктуации на рамото и анализиране на неговия резонансен пик, отчитайки хидродинамичното съпротивление на околната среда. Освен това, правоъгълната форма е изключително подходяща за създаване на специализирани сонди, като например безвърхови кантилевери (tip-less), към които се прикрепят микросфери от полистирен или боросиликатно стъкло за изследване на механичните свойства на живи клетки без риск от повреда на мембраната [14].

В областта на високоскоростната атомно-силова микроскопия (HS-AFM) се използват силно умалени версии на правоъгълните кантилевери, които притежават много по-високи резонансни честоти – често над 1 MHz във въздух и до 650 kHz в течности. Тези малки кантилевери (дълги 9–11 μm) са проектирани да реагират бързо на промените в релефа, което е необходимо за заснемането на динамични процеси на биомолекулярно ниво в реално време. Въпреки малките си размери, те запазват предимствата на правоъгълната геометрия, като осигуряват по-висока детекционна

чувствителност и намален термичен шум (thermal noise), което е критично за постигане на висока разделителна способност при деликатни образци.

V-образните кантилевери, известни още като триъгълни кантилевери, се характеризират с две рамена, които излизат от макроскопичния чип и се съединяват в общ свободен край, където е разположен острият връх на сондата. Основното предимство на тази форма е осигуряването на по-голяма механична стабилност, особено по отношение на устойчивостта срещу усукване и странични (латерални) сили, което е от съществено значение при определени режими на измерване и сканиране. В биологичните изследвания и при работа с изключително меки материали V-образните кантилевери често са предпочитаният избор поради възможността за постигане на много ниски константи на еластичност (коравина). При изобразяването на живи клетки в контактен режим стандартно се използват триъгълни кантилевери с коравина от порядъка на 0.01 N/m. Тази изключителна гъвкавост позволява на сондата да усеща деликатната повърхност на клетката с минимален натиск, което намалява триенето и предотвратява механичното повреждане на клетката по време на сканиране. Друго приложение на V-образната геометрия е при изработката на специализирани колоидни сонди за силова спектроскопия и картографиране на еластичността. Към тези кантилевери се прикрепят микросфери от полистирен или боросиликатно стъкло (обикновено с диаметър около 10 μm), разположени директно зад оригиналния връх. Този подход позволява измерването на множествени (bulk) механичните свойства на клетките, като приложената сила се разпределя върху по-голяма контактна площ, което улеснява прилагането на теоретични модели като този на Херц за изчисляване на модула на Юнг. В областта на единично-клетъчната силова спектроскопия (SCFS) V-образните кантилевери (например от типа MLCT с коравина 0.03 N/m) служат като основа за закрепване на цели живи клетки. При тези експерименти клетката се превръща в активна „биологична сонда“, която взаимодейства с други повърхности, за да се определят силите на адхезия и специфичните молекулярни събития на развързване. Стабилността на триъгълната конструкция помага за поддържането на прецизен контрол върху сондата по време на дългите цикли на подход и оттегляне, които в тези случаи могат да достигнат десетки микрометри [7].

Въпреки механичната стабилност на триъгълните кантилевери, тяхното прецизно калибриране често е по-сложно в сравнение с правоъгълните модели. позицията на лазерното петно върху гърба на V-образното рамо е критична, тъй като дори малки отклонения от позицията точно над върха могат да доведат до сериозни грешки в

изчислената константа на еластичност и силовата чувствителност. Независимо от това, V-образните сонди остават стандарт за приложения като колоидна силова спектроскопия и единично-клетъчна спектроскопия (SCFS), където тяхната здравина служи за прикрепване на микросфери или цели живи клетки към кантилевера. В крайна сметка изборът между двете форми се диктува от баланса между нуждата от лесно калибриране (в полза на правоъгълните) и изискването за устойчивост на латерални сили (в полза на V-образните) [7].

Механични свойства

Кантилевера в атомно-силовия микроскоп служи като основен сензор, който преобразува фините сили на взаимодействие с повърхността в измерим сигнал. Кантилеверът действа като пружина, която се огъва под влияние на привличащи или отблъскващи сили. Това огъване следва закона на Хук - формула 7.

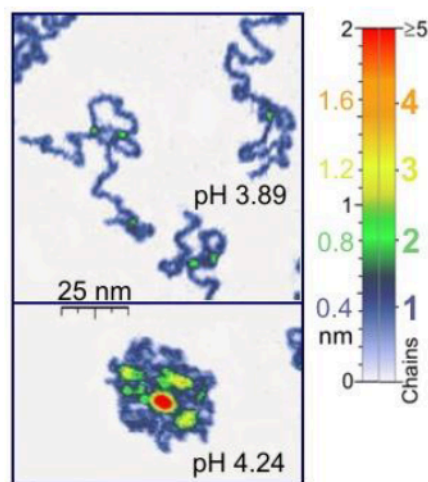
$$F = k \cdot d \quad (7)$$

където силата F е пропорционална на отклонението d на пружината и нейната константа на еластичност k .

Коравина или константа на еластичност k е механичен параметър, който определя колко мек или твърд е кантилеверът. То дефинира силата, необходима за огъването на рамото на определено разстояние. За правоъгълен кантилевер константата се изчислява по формула 1.

Резонансната честота f_0 на кантилевера е естествената честота, с която кантилеверът вибрира в свободно пространство. Тя определя скоростта на сканиране и е критична за динамичните режими като чукащия режим (Tapping mode). Високата резонансна честота позволява по-бързо заснемане на изображения. В течности резонансната честота значително намалява поради вискозното съпротивление и затихването в средата.

Кантилеверът се разглежда като еластичен хармоничен осцилатор, чиято собствена резонансна честота зависи от вътрешната еластичност на материала (модул на Юнг) и неговите геометрични размери като дължина, ширина и дебелина. При работа в динамични режими, като почукващ режим (Tapping Mode) или режима на честотна модулация (FM-AFM), кантилеверът се задвижва периодично с фиксирана честота на възбуждане, която е близка или равна на неговата първа резонантна честота.



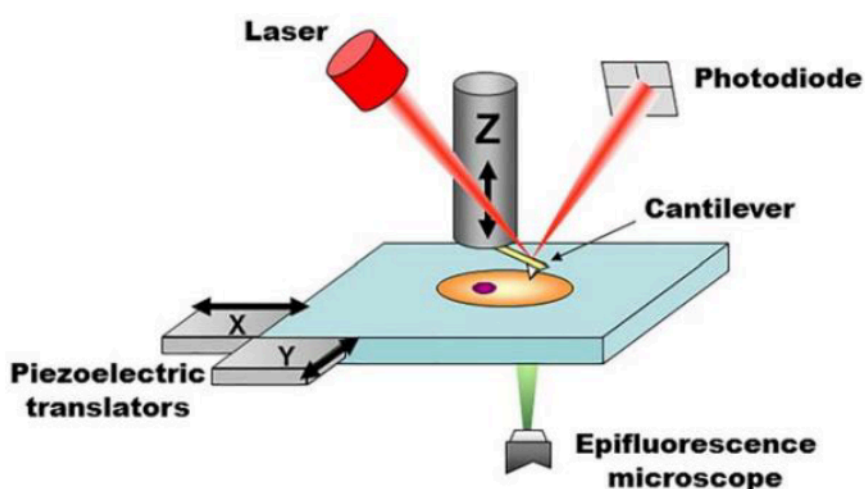
Фигура 6. Единични полимерни вериги (с дебелина 0,4 nm), заснети в режим на почукване (tapping mode) във водна среда с различно pH [13].

Това трептене се предизвиква механично чрез малък пиезоелектричен елемент в държача. Когато вибриращата сонда се приближи в близост до повърхността на образца (на разстояние под 10 nm), върху острия връх започват да действат далечни привличащи сили на Ван дер Ваалс и близки отблъскващи сили. Тези междуатомни сили променят ефективната коравина на кантилевера, което директно води до изместване на неговата резонантна честота от първоначалната ѝ стойност в свободно пространство. Силите на привличане водят до изместване на резонантната честота към по-ниски стойности, докато отблъскващите сили я изместват към по-високи честоти. В стандартния почукващ режим това честотно изместване се усеща индиректно като спад в амплитудата на трептене на кантилевера, което служи за обратна връзка на Z-скенера за регистриране на топографията. В безконтактния режим (FM-AFM) промяната в резонантната честота се следи и измерва директно от затворена система за обратна връзка с висока силова чувствителност [21].

Връх

Върхът е елементът, който осъществява реалното докосване на повърхността. Върхът е изключително остър, като неговият радиус на закръгление определя хоризонталната разделителна способност на микроскопа. При стандартните търговски сонди този радиус е между 5 и 10 нанометра. Стандартните върхове са пирамидални или конични, но съществуват и колоидни сонди, функционализирани и дори сонди с прикрепени живи клетки.

Стандартните върхове в атомно-силовата микроскопия, които обикновено имат пирамидална или конична геометрия, работят като механични сензори, които докосват повърхността на пробата на атомно ниво. Те са разположени в свободния край на микроскопично гъвкаво рамо, наречено кантилевер, показано в фигура 4. Когато върхът се доближи изключително близо до пробата, между атомите на върха и тези на повърхността възникват сили на взаимодействие (привличащи сили на Ван дер Ваалс или отблъскващи сили поради застъпване на електронните облаци). Тези фини сили причиняват огъване на кантилевера. Лазерен лъч се отразява от гърба на кантилевера към фотодиоден детектор.



Фигура 7. Основни елементи на био-AFM система. Сондата взаимодейства с изследвания образец, а силите на привличане или отблъскване предизвикват огъване на кантилевера [1].

Колоидните сонди работят като заменят стандартния остър връх на атомно-силовия микроскоп с микросфера с добре дефинирана геометрия и размер, обикновено в диапазона от 1 до 50 μm . Тези сонди се използват предимно за измерване на механичните свойства на меки биологични обекти, като живи клетки и тъкани, вместо за генериране на изображения с висока разделителна способност. При стандартните остри върхове (с радиус под 10 nm) се генерира изключително високо локално напрежение, което може да пробие или повреди меката повърхност на клетката. Колоидната сонда, благодарение на големия си радиус, разпределя приложената сила върху много по-голяма контактна площ. Това позволява минимално увреждане на образца и измерване на голямо количество свойства.

Функционализираните върхове работят чрез модифициране на повърхността на стандартната сонда със специфични химични групи, биологични молекули или физични

покрития. Това позволява на микроскопа не просто да заснема релефа, а да разпознава и измерва конкретни взаимодействия между върха и образа на нанониво. Най-честото приложение на функционализираните върхове е в единично-молекулната силова спектроскопия (SMFS). Върхът на сондата се покрива със специфични молекули като антитела, лиганди или рецептори. При отдръпване на кантилевера се регистрира силата, необходима за разкъсване на тази връзка, известна като сила на развързване (unbinding force). Тези измервания позволяват количествена оценка на афинитета и кинетиката на свързване между молекулите.

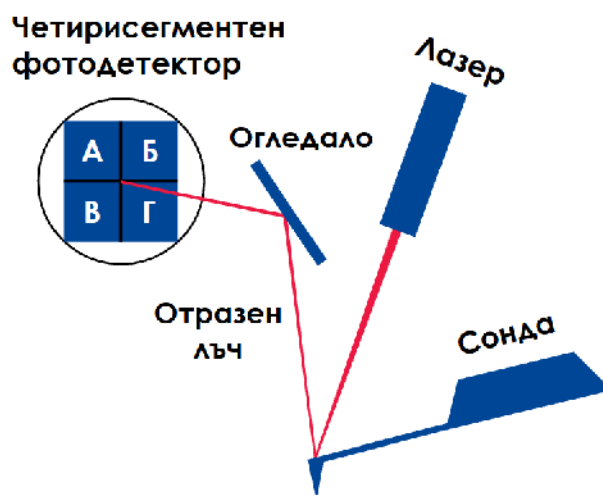
Сондите с прикрепени живи клетки се използват в специализиран AFM метод, наречен единично-клетъчна силова спектроскопия (SCFS). При този подход вместо стандартен остър връх, към кантилевера се прикрепя цяла жива клетка, която се превръща в „биологична сонда“ за изследване на взаимодействията с други клетки или повърхности. За да може клетката да се закрепя за кантилевера (който обикновено е без връх или V-образен), той първо се почиства и покрива с адхезивен агент, най-често протеина конканавалин-A (con-A). С помощта на интегрирания оптичен микроскоп се избира подходяща жива клетка от дъното на петритото. Кантилеверът се спуска върху нея и се притиска с малка сила (около 1 pN) за период от около 30 секунди, за да се стимулира прилепването. След като бъде вдигната от петритото, прикрепената клетка се оставя да се успокои и да се фиксира здраво за кантилевера за около 10 минути, преди да започне експериментът. Кантилеверът с прикрепената клетка се придвижва към целевата повърхност (например слой от други живи клетки като остеобласти или ендотелни клетки). След като двете клетки влязат в контакт за определено време (dwell time), кантилеверът започва да се движи нагоре. AFM следи неговото огъване, което е пропорционално на силите на привличане между клетките. Основният параметър, който се измерва, е максималната сила, необходима за пълното разделяне на клетката на сондата от целевата повърхност [7].

2.1.2 Фотодетектор

Оптичната система за регистрация на деформацията на кантилевера (също наречена метод на оптичния лост или optical beam deflection) е основният измервателен уред в атомно-силовата микроскопия. Нейният фундаментален принцип се базира на геометричното усилване на движението: изключително малко механично огъване или усукване на микроскопичния кантилевер се преобразува в голямо пространствено

изместване на отразения светлинен лъч върху повърхността на отдалечения фотодетектор. Поради значителното разстояние между конзолата и плоскостта на детектора (обикновено от порядъка на няколко сантиметра), оптичката система действа като лост без масово инертно натоварване, постигайки изключителна чувствителност, която позволява регистрирането на деформации на рамото на сондата в субнанометровия и пикометровия диапазон. Този безконтактен метод за детекция напълно елиминира нуждата от електрически връзки към самата сонда, улеснявайки работата в широк диапазон от среди, включително въздух и течности. [1,5]

В техническата конфигурация на ACM MFP-3D Origin (използван в експерименталната част), светлинният източник е реализиран под формата на суперлуминесцентен диод (SLD), излъчващ в близката инфрачервена област при дължина на вълната ~ 860 nm. Изборът на този диод осигурява висока пространствена кохерентност и стабилност на лъча, което предотвратява нежелани интерференчни шумове по време на измерването. За целта на прецизното фокусиране, излъченият лъч се насочва през система от лещи и огледала и се концентрира в ярко петно с минимален диаметър върху свободния край на кантилевера, непосредствено над разположения отдолу остър връх. За постигане на максимална отражателна способност и предотвратяване на преминаването на светлина през силициевия или силициевонитридния материал на конзолата, гърбът на кантилеверите стандартно се покрива с изключително тънък рефлексен слой от злато (Au) или алуминий (Al). Правилното фокусиране и центриране на лазерното петно се контролират визуално от оператора с помощта на вградения оптичен микроскоп с CCD видеокамера, като интензивността на отразения лъч се записва като сумарен сигнал в софтуера. [5]



Фигура 8. Взаимодействие между лазерния лъч, сондата и фотодетектора [5].

2.1.3 Електроника и хардуер

Основната електроника на атомно-силовия микроскоп (като MFP-3D Origin) е затворената електронна обратна връзка (EOB / feedback loop), управлявана от пропорционално-интегрално-диференциален (PID) алгоритъм. Този електронен блок непрекъснато сравнява сигнала за реалното огъване на кантилевера с дефинираната от оператора референтна стойност (setpoint) и при всяко отклонение генерира компенсиращ сигнал за грешка. Високоволтовите усилватели в контролера увеличават тези управляващи напрежения до нива между 150 V и 165 V DC, необходими за задвижване на пиезоактуатора. При работа в динамичен режим (AC Mode), в електронния тракт се интегрира и заключващ усилвател (Lock-in Amplifier), който демодулира сигналите за амплитуда и фаза от четириsegmentния фотодетектор, филтрирайки околния шум чрез смесване с референтен синусоидален сигнал. [5, 23]

Електронните блокове за обработка на данни осигуряват интерфейса между аналоговите сензори на микроскопа и компютърната конфигурация. Преди процеса на дигитализация аналоговите сигнали преминават през нискочестотни филтри (НЧФ / LPF), които отрязват високочестотния шум. Компютърът, оборудван със софтуер за обработка на цифрови матрици ред по ред, като ги визуализира в реално време върху монитора под формата на изображения на топографски карти (Height) и карти на сигналите за грешка (Deflection). [3, 5, 21]

Актуаторите извършват финото пространствено преместване на микроскопа в нанометровия и пикометровия диапазон, преобразувайки електрическия потенциал в механична деформация. Тяхното действие се базира на изключително малък коефициент на разширение от порядъка на едва 0.1 nm на всеки приложен волт напрежение. В конструктивната схема на AFM микроскопите актуаторите по направления X-Y придвижват платформата с образеца хоризонтално, докато високоскоростният Z-актуатор е монтиран в главата на микроскопа и движи сондата вертикално. [5, 23]

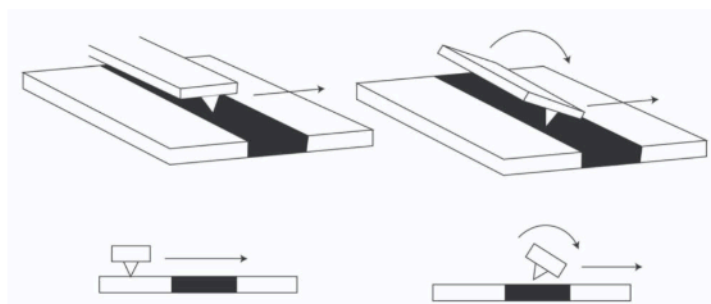
2.1.4 Режими на работа

Атомно-силовата микроскопия (AFM) предлага множество режими на работа, които се класифицират основно според характера на движението на сондата и вида на силите на взаимодействие с повърхността.

Оригиналният и най-прост режим на работа е контактен режим (Contact Mode / Static Mode). Върхът е в постоянен физически контакт с повърхността и се движи по нея по време на сканирането. Системата поддържа постоянно огъване (дефлексия) на кантилевера чрез обратна връзка по Z-ос. Контактният режим има три подрежима:

- Режим на постоянна сила: Най-често използваният, при който дефлексията е константна. В този режим сондата е в постоянен контакт с образеца, докато се извършва сканиране на повърхността. С други думи, сондата се „влачи“ по повърхността на образеца.
- Режим на постоянна височина: Използва се рядко, главно за постигане на атомна разделителна способност върху изключително плоски образци.
- Латерална силова микроскопия (LFM): Процесът на получаване на изображение е идентичен с този при статичния режим, с изключение на това, че кантилевера обикновено се извършва перпендикулярно на нейната надлъжна ос, за разлика от конвенционалния статичен режим, при който посоката на сканиране може да се избира свободно.

Предимствата на контактния режим са високата разделителна способност и скорост. Тя позволява измерване на сили на триене чрез Латерална силова микроскопия (LFM). Недостатъците са, че генерира големи странични сили (friction), които могат да повредят меки образци (биологични клетки, наночастици) или да затъпят върха на сондата. [2, 5, 14]



Фигура 9. Изображението в режим на латерални сили (lateral force mode) се измерва чрез регистриране на усукването на кантилевера, докато той се движи по дадена повърхност. Ако определената област е с по-голямо триене, кантилеверът се усуква по-силно при преминаването си над този участък с по-високо триене [11].

Вторият режим на работа е почукващ режим (Tapping Mode / Intermittent Contact Mode). Това е най-често използваният режим за изобразяване на топография в атмосферни условия и течности. Принципът е кантилеверът се разтрептява близо до своята резонансна честота и острият връх докосва повърхността само в най-ниската точка на своята осцилация, което води до намаляване на амплитудата на трептене. Тази амплитуда се използва като параметър за обратната връзка. Регистрира се фазовото изместване (Phase Imaging) на осцилацията, което дава информация за разлики в материала, като твърдост, адхезия и вискоеластичност. Предимствата на този режим е че позволява фазово изобразяване (Phase Imaging), което разкрива разлики в твърдостта и адхезията на материала, правейки го идеален за меки материали, полимери и биологични макромолекули.

Третият режим е безконтактен режим (Non-contact Mode). При него сондата вибрира над повърхността на разстояние от 1 до 10 nm, без да я докосва. Взаимодействието се осъществява чрез далечни сили на Ван дер Ваалс или други дългообхватни сили, които променят резонансната честота на кантилевера и тези промени в честотата се използват за обратна връзка. Този режим е позволил постигането на първата истинска атомна разделителна способност в ултрависок вакуум. Предимствата на този режим е минимално износване на върха и никаква деформация на образеца, но недостатъкът е че има по-ниска разделителна способност в течности.

Последният режим е извънрезонансен почукващ режим (Off-Resonance Tapping). Сондата се разтрептява с честоти много под резонансната (обикновено под 10 kHz или до 100 kHz при фототермално възбуждане). Това позволява заснемането на бързи силови криви във всяка точка от изображението и прецизен контрол на силата на взаимодействие. [2, 5, 14]

Изборът на подходящ режим на работа е от критично значение за успешното изследване с AFM, тъй като той определя силата на взаимодействие между сондата и пробата, качеството на изображението и потенциалното увреждане на обекта. [2, 5, 14]

Сравнителен анализ на трите основни режима на работа и техните ключови физически и софтуерни параметри, включително характера на контакта с повърхността, силите на взаимодействие, страничното триене, риска от увреждане на пробата и контролирания параметър за обратната връзка е представен в таблица 1.

Таблица 1: Сравнителен анализ на трите основни режима на работа

Характеристика	Контактен режим	Почукващ (Tapping) режим	Безконтактен режим
Контакт с повърхността	Постоянен	Периодичен (10% от цикъла)	Липсва
Сили на взаимодействие	Силни, отблъскващи	Слаби, прекъснати	Много слаби, привличащи
Странични сили (friction)	Високи	Минимални	Липсват
Увреждане на пробата	Възможно (високо)	Минимално	Никакво
Feedback параметър	Дефлексия (V)	Амплитуда (nm/V)	Честота или амплитуда
Основна среда	Въздух, течност	Въздух, течност	Вакуум, въздух

2.1.5 Влияние на влажността на околната среда

Когато сканирането с атомно-силов микроскоп се извършва в обикновени атмосферни (околни) условия без допълнителен контрол на влажността на въздуха, съдържащата се влага в околната среда е възможно спонтанно да кондензира върху върха на сондата и върху повърхността на изследвания образец. В момента, в който сондата се приближи в непосредствена близост до повърхността, тази кондензирана влага образува т.нар. „воден менискус“ (микроскопичен течен мост) между върха и пробата. Този воден менискус генерира мощни капилярни сили, които действат като силно привлекателно взаимодействие, издърпвайки и притискайки сондата силно към изследваната повърхност по време на сканиране. Това силно капилярно привличане е изключително нежелателно при топографски изследвания поради три основни причини:

- Силното привличане увеличава триенето и натиска, което води до механично износване и затъпяване на финия връх на кантилевера.
- При работа в контактен режим силното привличане може лесно да деформира, надраска или напълно да разруши меки и деликатни образци, като полимери и биологични материали.

- Тъй като сондата трудно се откъсва от повърхността поради адхезията, в полученото изображение се наблюдават артефакти, размазване и неточности в релефа.

Математическо описание (Законали на Лаплас и Келвин)

Физическото взаимодействие, което обуславя капилярните сили, е капилярното налягане на Лаплас. То се дефинира чрез формулата:

$$P = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) = \frac{\gamma}{r_k} \quad (8)$$

Където γ е повърхностното напрежение на течната фаза, r_1 и r_2 са радиусите на кривина на водния менискус, а r_k е радиусът на Келвин. [5, 13]

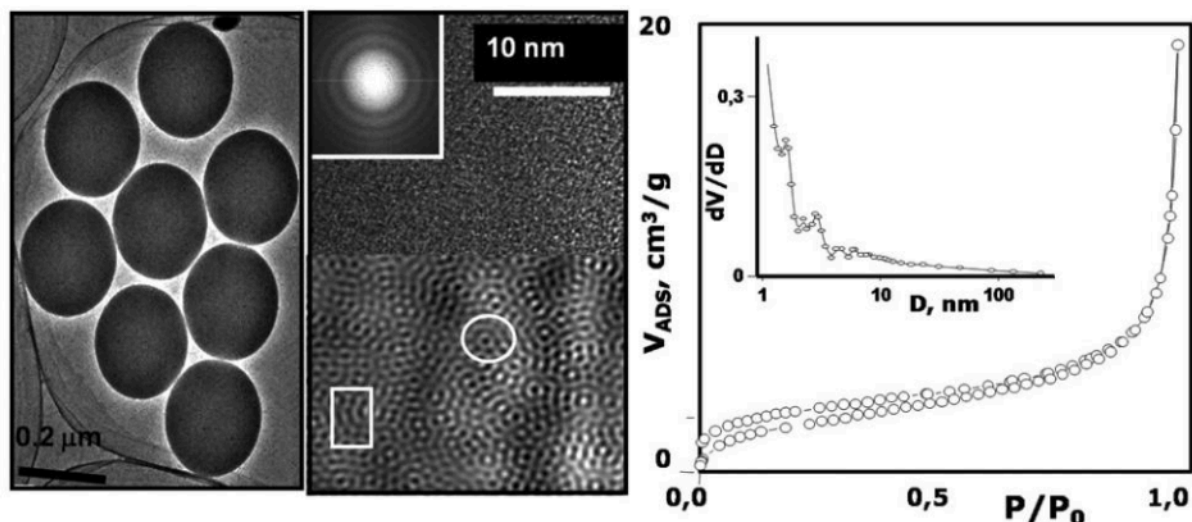
2.2 Наночастици SiO₂

2.2.1 Характеристики

Наночастиците от силициев диоксид SiO_2 представляват синтетичен сферичен силициев диоксид с изключително висока чистота над 99.5%, разработен чрез специализиран процес на високотемпературно пламъчно синтезиране. Конкретният изследван модел се характеризира с прецизен наноразмер от 310 nm, строго сферична морфология и специфична повърхностна площ от около 14 m²/g. Благодарение на своята сферична форма и гладка повърхност, тези наночастици притежават изключителна способност за плътност на опаковане (packing density), отлична течливост и ниско термично напрежение. Тези качества ги правят идеален компонент за подобряване на механичните, термичните и диелектричните свойства на различни полимерни матрици. В областта на медицината силициевият диоксид става предпочитан материал за системи за пренос на биомолекули [22].

Силициевият диоксид SiO_2 , наричан още силициева киселина, кварц или просто силиций, е окислената форма на силиция и представлява най-разпространеното химично съединение в земната кора, където се среща под формата на различни силикатни минерали. Неговият химичен състав се определя от съотношението между елементите силиций и кислород, свързани в стабилна триизмерна атомна мрежа с химична формула SiO_2 и молекулно тегло от 60,08 g/mol. Силициевият диоксид може да съществува в кристално или аморфно състояние (amorphicity). Този тип висококачествен аморфен силициев диоксид се произвежда чрез специализиран високотемпературен пламъчен

синтез (flame fusion), който позволява изграждането на строго сферична морфология на наночастиците. Този метод гарантира отлична гладкост на повърхността и минимални нива на вътрешни структурни напрежения [9, 10].



Фигура 10. ТЕМ изображение на SiO₂ микросфери, получени по метода на Stöber. HR-TEM изображението показва микроструктурата на SiO₂ [10]

В твърдо състояние веществото SiO₂ се проявява като бял фин прах без мирис. Неговата плътност варира в диапазона от 2,2 до 2,6 g/ml при стайна температура. Химичното съединение се характеризира с ниска разтворимост във вода, при температура 37 °C то се разтваря до около 0,076 g/l. Силициевият диоксид се отличава с изключително висока термична стабилност и способност да запазва физическата си цялост при резки температурни промени. Самият материал не е запалим и притежава много високи критични температури на фазово превръщане. Неговата точка на топене надвишава 1600 °C, а точката на кипене достига 2230 °C. Поради ниското термично напрежение на сферичните частици, неорганичната силициева матрица се използва успешно като важен пълнител за подобряване на топлинните, механичните и диелектричните свойства на високотехнологични материали [18, 22].

2.2.2 Свойства

Формата и морфологията на наночастиците от силициев диоксид SiO₂ определя физикохимични свойства и възможностите за практическото им приложение в медицината. В зависимост от използвания метод на производство, като например класическия метод на Стюбер, наноматериалите могат да бъдат синтезирани като монодисперсни, строго сферични частици с изключително хомогенен диаметър в субмикронния диапазон. Високата степен на сферичност и гладкостта на тези аморфни

структури осигуряват превъзходни реологични свойства, отлична течливост и ниско термично напрежение при смесване, което ги прави предпочитан функционален пълнител за подобряване на механичната здравина и диелектричните свойства на различни полимерни композити и електронни компоненти. Въпреки това, при неблагоприятни условия на съхранение или диспергиране, частиците могат да се групират, образувайки агломерати с неправилни форми, което оказва влияние върху тяхното поведение в биологична среда [10].

Повърхностната структура на тези аморфни наносфери се отличава с липса на периодичен порядък в атомната решетка, като на повърхността на неорганичния силициев скелет са разположени множество активни силанолни (Si-OH) групи, определящи високата ѝ реактивоспособност.

Специфичната повърхност представлява физична величина, описваща общата достъпна повърхностна площ на даден материал, отнесена към неговата маса m^2/g или към неговия обем. Тази характеристика определя капацитета на твърдите прахообразни и порести вещества да реагират физически и химически със заобикалящата ги среда. Специфичната повърхностна площ на частиците от чист аморфен силициев диоксид SiO_2 осигурява голямо количество потенциални реакционни центрове на единица тегло от материала. Изключително голямата специфична повърхност на наночастиците се дължи на геометричния ефект от рязкото намаляване на техния мащаб до нанометровия диапазон, което води до експоненциално нарастване на съотношението повърхност/обем. Наличието на толкова голяма повърхност оказва пряко влияние върху взаимодействието на наночастиците с околните молекули в разтвора или средата. На повърхността на неорганичния силициев скелет са разположени множество реактивоспособни силанолни групи (Si-OH), които служат като активни центрове за адсорбция на молекули чрез водородни, електростатични или ковалентни връзки. Благодарение на високата достъпност на тези повърхностни силанолни връзки силициевите наночастици се поддават изключително лесно на повърхностна модификация и функционализация с полимери (като PEG) или специфични органични лиганди, което позволява прецизно управление на техните адхезивни и дисперсионни свойства [10, 18, 20].

По отношение на биологичните взаимодействия голямата повърхност на наночастиците от силициев диоксид SiO_2 определя силата и селективността на връзките им с живите клетки и извънклетъчната матрица. Голямата достъпна площ позволява ефективна адсорбция на протеини, растежни фактори или специфични прицелни

лиганди, които могат да активират сигнали за клетъчно делене, да ускорят костната регенерация и зарастването на рани, или да улеснят навлизането на нанопреносителите в туморните клетки чрез ендоцитоза.

Атомно-силовата микроскопия може да предостави информация не само за индивидуалните наночастици, но и за начина, по който те се разполагат и взаимодействат върху изследваната повърхност. Чрез картографиране на топографията и фазово изобразяване в реално време, микроскопът позволява да се проследят структурните и наномеханичните промени, които настъпват в живите клетки като промени в клетъчната височина, еластичността на цитоскелета или стабилността на мембраната при контакт с наночастици SiO_2 . [8, 20]

2.2.3 Приложения в медицината

Приложението на наночастиците от силициев диоксид в системите за насочен и контролиран пренос на лекарства се основава на два основни физически модела, които определят капацитета на улавяне и кинетиката на освобождаване на терапевтичните агенти. Непорестите силициеви наночастици притежават плътна структура, при която лекарствените молекули се свързват единствено по външната повърхност, а тяхното освобождаване зависи от бавното химично разграждане на силициевата матрица или от разкъсването на специфични химични връзки. За разлика от тях, мезопорестите силициеви наночастици (MSN) имат подредена и симетрична вътрешна мрежа от пори с диаметър между 2 и 50 nm. Тази пореста архитектура осигурява голяма специфична повърхностна площ и голям вътрешен обем, което позволява капсулирането на големи количества лекарствени вещества, протеини или нуклеинови киселини дълбоко в каналите на частицата. По този начин лекарствените вещества са физически защитени от преждевременно ензимно или химично разграждане в биологичните флуиди на организма. Най-използваните структури в експерименталната практика са от типовете MCM-41 (с двуизмерна шестоъгълна структура и пори около 2 nm), SBA-15 (с по-големи пори около 10 nm) и MCM-48 (със сложна триизмерна кубична мрежа). След като лекарственото вещество бъде успешно заредено в порите, неговото освобождаване може да бъде прецизно контролирано и програмирано. При немодифицираните наночастици този процес протича чрез пасивна дифузия, управлявана от термодинамичните взаимодействия между лекарствените молекули и активните силанолни (Si-OH) групи по стените на порите [10].

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Проведеният експеримент за изследване на наночастици от SiO_2 с атомно-силов микроскоп (AFM) използва препарати от разтвори на наночастици в дейонизирана вода (dH_2O) и препарати от разтвори на наночастици във физиологичен разтвор на $NaCl$. Разтворите са третираны с ултразвуков хомогенизатор. И двата вида препарати са нанесени върху предметни стъкла за да могат да бъдат изследвани с помощта на AFM. Данни за препаратите и образците са представени в таблица 2 и таблица 3.

3.1 Експериментална постановка

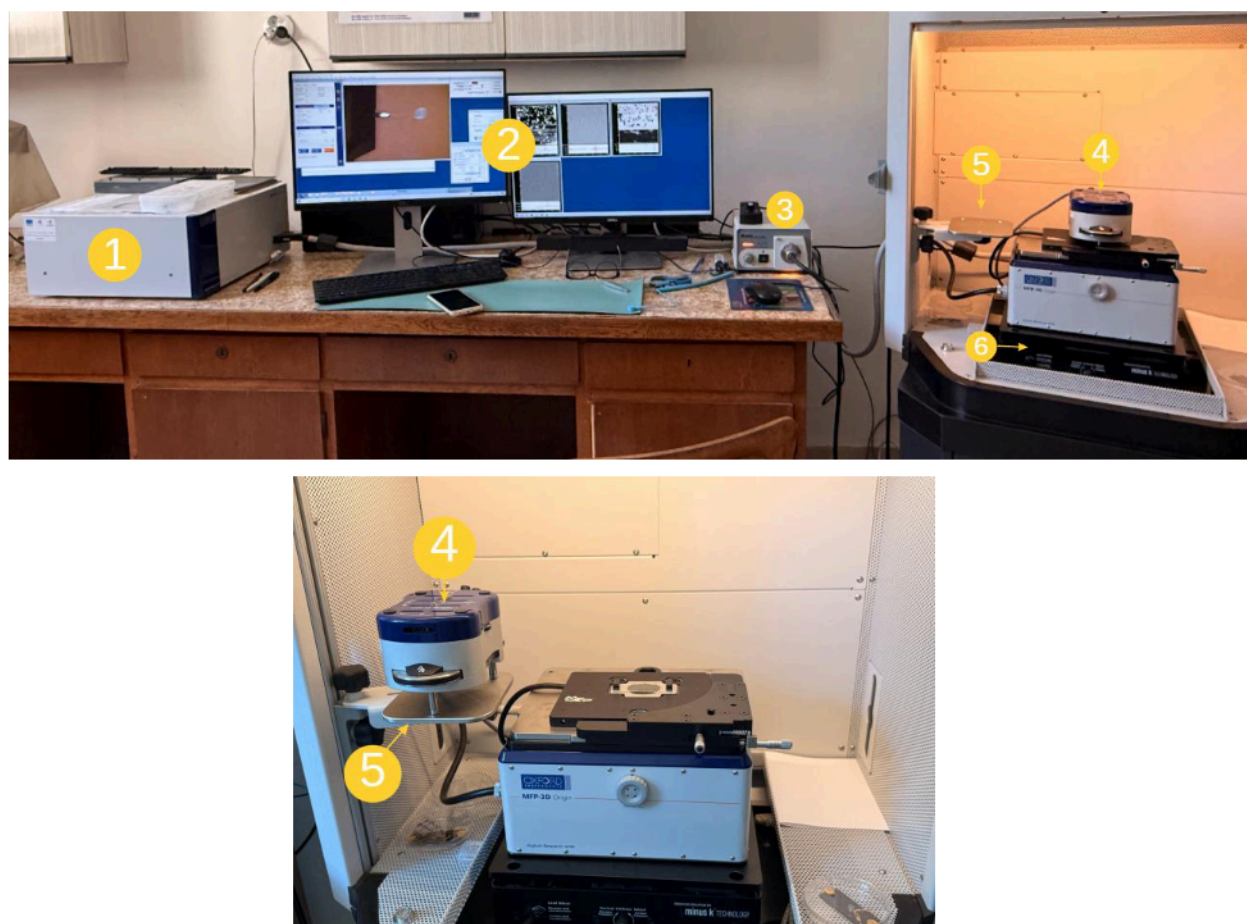
Описание на уреда Атомно-силов микроскоп MFP-3D Origin

Атомно-силовият микроскоп MFP-3D Origin, разработен от Asylum Research (Oxford Instruments) е конструиран по схемата с подвижен скенер, при която изследваният образец се движи в хоризонталната равнина (по осите X и Y) под сондата, докато вертикалното движение (по оста Z) се извършва изцяло от задвижващия механизъм в микроскопската глава. Този конструктивен дизайн осигурява висока механична стабилност по време на сканиране. Основните хардуерни компоненти на системата включват три основни модула: глава, скенер и основа, контролирани от външна управляваща електроника (контролер), която захранва пиезоелементите и регулира обратната връзка.

Главата на микроскопа е система, в която се монтира АСМ сондата чрез специализиран подвижен държач. Тя съдържа високопрецизна оптична детекционна система, в която като източник на светлина се използва суперлуминесцентен диод (SLD), излъчващ в близката инфрачервена област при дължина на вълната ~ 860 nm. Тъй като това лъчение е извън видимия спектър на човешкото око, с цел безопасност в главата са интегрирани автоматични превключватели за наклон (tilt switches), които мигновено изключват диода, ако главата не се намира в хоризонтално работно положение върху своите опорни крачета. Оптичното подравняване на лазерния лъч върху конзолата се извършва ръчно посредством винтови колела: колелата LDX и LDY позиционират лазерното петно съответно по дължината и широчината на кантилевера, докато колелото PD центрира отразения лъч върху четириsegmentния фотодетектор, което служи за първоначално нулиране на детекционното отклонение.

Основата на микроскопа представлява стабилна метална платформа, върху която се позиционират скенерът и главата. В основата е вграден висококачествен оптичен

микроскоп със CCD (Charge-Coupled Device) камера и регулируема осветителна система, които осигуряват прецизно наблюдение в реално време на взаимното положение на върха на сондата и изследвания участък от пробата. За фино механично позициониране и движение по време на сканиране се използва сканиращата платформа, върху която образците могат да се фиксират стабилно чрез вакуумен държач. Целият процес на сканиране се управлява от компютърна конфигурация с два монитора, използваща софтуерната платформа Asylum Research AFM Software v.16.24.225, изградена върху развойната среда IGOR Pro 6.38B01 на WaveMetrics. Двойният екран позволява на оператора едновременно да следи и променя параметрите на сканиране на единия дисплей, докато на втория визуализира топографските канали и профилите на трасето в реално време.



Фигура 11. Атомно-силов микроскоп MFP-3D Origin разположен в лаборатория „Лабораторията по нови детектори и системи за интелигентно управление на процеси“ на Националният център за върхови постижения „Мехатроника и чисти технологии“ кампус Лозенец - Физически факултет.

1. Управляваща електроника (контролер) – в кутията на контролера са поместени захранвания и електроника, които контролират микроскопа при сканиране;

2. Компютър и два монитора – основната връзка между компонентите на микроскопа и софтуера за управление ARC2;
3. Регулатор на светлина MLC-150C – LED източник на светлина с променлив интензитет с оптичен световод, чрез който след свързване с основата на АСМ се осветява образецът. Има интензитет 120 000 lx, който може да се настройва от оператора на микроскопа. Има локален и дистанционен превключвател за контрол на интензитета (което означава, че при локален контрол, контролът на интензитета е разположен отпред на устройството);
4. Глава на микроскопа (в нея се монтира сканиращата сонда);
5. Стойка за главата – представлява платформа, намираща се отстрани на звукоизолиращия корпус, върху която се поставя главата, когато се зареждат образци или сменят сонди;
6. Изолационно-вибрационна подложка

Технически характеристики

Максималният обхват на атомно-силовият микроскоп MFP-3D Origin пиезоелектричен скенер в хоризонталната равнина (XY) е до 120 μm , което позволява характеризирането както на фини наночастици, така и на по-груби повърхности с микронен релеф. Вертикалното задвижване по оста Z осигурява номинален обхват от 15 μm , който обаче може да бъде разширен хардуерно чрез ръчно повдигане на опорните крачета на главата до 40 μm за измерване на силно релефни структури. Позиционирането по трите оси се контролира от високочувствителна затворена система за обратна връзка (Closed Loop), която се регулира от прецизен PID (пропорционално-интегрално-диференциален) контролер. Този затворен контур е важен за точността на измерванията, тъй като напълно елиминира нелинейността, хистерезиса и пълзенето, характерни за работата на пиезокерамичните елементи.

За прецизно отчитане на деформацията на кантилевера системата използва оптична детекция, в която като светлинен източник служи суперлуминесцентен диод (SLD) с дължина на вълната $\sim 860\text{ nm}$, излъчващ в близката инфрачервена област. Този диод работи съвместно с четириsegmentен фотодетектор за регистриране на отклонението и е снабден с предпазни изключватели за наклон, които спират излъчването веднага щом микроскопската глава бъде повдигната от работната платформа. Цялостният контрол на апаратурата и събирането на данни се координират

от специализиран компютър с два монитора чрез софтуерния пакет Asylum Research AFM Software v.16.24.225, базиран на развойната среда IGOR Pro 6.38B01 на WaveMetrics. Двухекранната конфигурация позволява на оператора едновременно да следи и настройва контролните параметри на обратната връзка на единия дисплей, докато на втория визуализира топографските канали и профилите на трасето в реално време. Микроскопът поддържа широк спектър от сонди, включително стандартните AC160TS-R3 с дължина на конзолата 160 μm и острие 14 μm , кантилеверите Olympus AC160 или OTESPA със златно рефлексно покритие и висок коефициент на еластичност ($\sim 40 \text{ N/m}$), както и по-меките сонди AC240 за неинвазивна работа в течни биологични среди.

Режими на работа на ACM MFP-3D Origin

Наличните работни режими на ACM MFP-3D Origin са структурирани в софтуера в пет основни функционални категории:

Стандартен режим (Standard Mode):

- *Шаблон (Template)*: Използва се за бързо зареждане на предварително дефинирани базови настройки и конфигурация на микроскопа.
- *Контактен режим (Contact Mode Topography)*: Базов и високоразделителен режим на сканиране, при който острият връх на сондата се намира в постоянен физически контакт с повърхността на пробата.
- *Микроскопия със странична сила (Lateral Force Microscopy - LFM)*: Изпълнява се в контактен режим, като следи торзионното усукване на кантилевера, породено от локалните сили на триене (friction) при преминаване през участъци с различна грапавост.
- *Силов режим на контакт (Contact Mode Force / Force Spectroscopy)*: Използва се за заснемане на силови криви при приближаване и оттегляне на сондата за количествено определяне на адхезията и твърдостта.
- *Топография с трептяща сонда във въздух (AC Air Topography / AC Mode)*: Динамичен полуконтактен (чукащ) режим, работещ чрез периодично трептене на кантилевера близо до неговата резонантна честота. Обратната връзка следи промените в амплитудата на трептене, предизвикани от Вандерваалсовите сили на привличане или отблъскване, което предпазва меките образци от повреда.

- *Офлайн изображение (Offline Image) & Силов офлайн режим (Offline Force):* Специализирани софтуерни инструменти за последващ анализ и математическа обработка на заснетите изображения и силови профили.

Електричен режим (Electrical Mode):

- *Микроскопия с електростатична сила (Electrostatic Force Microscopy - EFM):* Двуходов метод, при който при второто преминаване сондата се повдига над релефа, за да картографира разпределението на локалните електростатични градиенти и заряди по повърхността.
- *Микроскопия с магнитна сила (Magnetic Force Microscopy - MFM):* Двуходов режим, използващ намагнетизирана сонда за детекция и визуализация на магнитните полета.
- *Режим на проводимост (Conductive AFM - C-AFM / ORCA):* Използва оптимизиран трансимпедансен усилвател (Optimized Resistance Conductance Amplifier) за едновременно измерване на топографията на образеца и отчитане на електрическия ток, протичащ през наноконтакта между проводимия връх на сондата и пробата под приложено напрежение.
- *Силова микроскопия със сонда на Келвин (Kelvin Probe Force Microscopy - KPFM):* Количествен метод за прецизно измерване на контактната потенциална разлика (Contact Potential Difference - CPD) и работата на излизане на електроните между сондата и образеца.

Пиезореакция (Piezoresponse Force Microscopy - PFM):

- *Едночестотната силова микроскопия с пиезореакция / Single Freq PFM (Single Frequency Piezoresponse Force Microscopy):* Прилага се за характеризиране на електромеханичната реакция на пиезоелектричните материали.
- *Векторна силова микроскопия с пиезореакция / Vector PFM (Vector Piezoresponse Force Microscopy):* Измерва вертикалния PFM сигнал и страничния PFM сигнал.
- *Силова микроскопия с литопиезореакция / Litho PFM (Litho Piezoresponse Force Microscopy):* Има опцията да се използва за модифициране на фероелектричната поляризация на образец, като се прилага отклонение.

Биологичен режим (Biological Mode):

Специално проектиран за изследвания в течна среда с цел запазване на нативната структура на биомолекули и живи клетки. Включва подрежимите:

- Променливотокова клетка / AC Cell
- Техника с Лоренцова сила/ iDrive
- Контактна клетка / Contact Cell
- Променливотоково изследване на молекули / AC Molecule
- Променливотоково изследване на молекули в трептящ режим / AC Molecule Air

Наномеханичен режим (Nanomechanical Mode):

- *Режим на силов контакт (Contact Mode Force):* Режимът позволява изследването на протеини, изследването на вискоеластичността на образца и действащите при сканиране адхезионни сили.
- *Локален термичен анализ (ZTherm Contact / ZTherm PFM):* режимът представлява локален термичен анализ, който извършва наномасщабно термично измерване на локални точки на топене и встъкляване чрез повишаване на температурата на върха при контакт на сондата с образца.
- *Режим на вискоеластично картографиране (AM-FM):* Режимът позволява вискоеластично картографиране при сканиране.
- *Режим на картографиране на тангента / CalLossTan (Calculated Loss Tangent):* Картографира тангентата на загубите на образца, който представлява съотношението на разсеяната енергия към съхранената енергия. Картографирането се извършва при контакт на сондата с повърхността на образца.
- *Двоен променливотоков контактен резонанс (DART CR / Dual AC Resonance Tracking Contact Resonance)*
- *Двурежимен двоен променливотоков режим (Bimodal Dual AC)*
- *Модулация на сила (ForceMod)*

3.2 Използвани материали - наночастици SiO₂ NG01EM3007

Те представляват чист синтетичен аморфен силициев диоксид под формата на нанопрах, произведен от водещата компания Nanografi Nanotechnology с продуктов каталожен номер NG01EM3007. Химичният състав на материала се характеризира с изключително висока чистота от над 99.5% чист силициев диоксид с молекулно тегло 60.08 g/mol и диаметър на частиците приблизително 310 nm – фигура 12.



Фигура 12. Контейнер съдържащ наночастиците

Основното предимство на този конкретен наноматериал е неговият специализиран метод на производство чрез високотемпературен пламъчен синтез (flame fusion process). Този подход позволява получаването на изключително хомогенни, строго сферични наночастици със среден диаметър от 310 nm и напълно аморфна вътрешна структура. Материалът представлява фин бял прах без мирис с реална плътност в диапазона 2.2 – 2.6 g/mL при стайна температура. Материалът притежава изключително висока термоустойчивост с точка на топене над 1600 °C и точка на кипене, достигаща 2230 °C, като не е запалим.

3.3 Метод за подготовка на препаратите и експерименталните образци

Подготовката на експерименталните образци е етап, който определя качеството на получените топографски изображения. За настоящото изследване сухият нанопрах от силициев диоксид е нанесен върху стъклени подложки по два различни метода: сухо нанасяне и нанасяне от течен разтвор.

1. Метод на сухо нанасяне

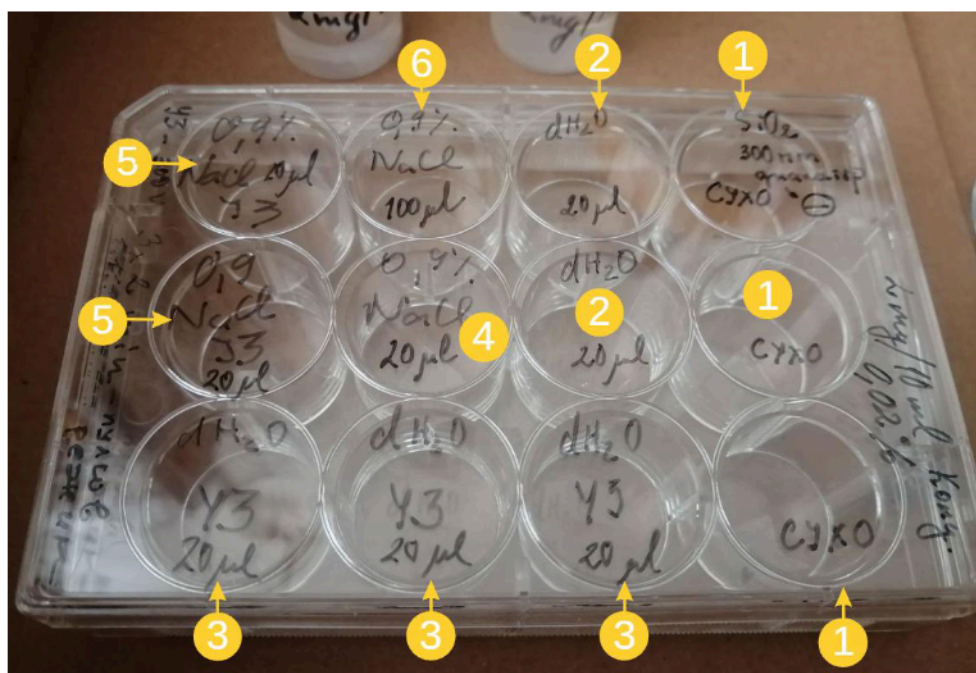
Първият метод е разработен за подготовката на контролния сух образец, при който наночастиците се изследват в оригиналното им физическо състояние, без да бъдат подложени на въздействието на каквито и да е течни разтворители. За целта се използва фина и чиста четка за рисуване и с нейна помощ минимално количество от сухия

аморфен SiO_2 нанопрах се взема директно от контейнера и се нанася чрез леко и равномерно прахообразно разпрашаване върху повърхността на предварително почистеното предметно стъкло.

2. Метод на течен разтвор

Вторият метод включва преминаване на наночастиците през течна фаза с последващо изпарение на разтворителя, и се прилага за подготовката на останалите пет експериментални проби. Процедурата протича през няколко последователни етапа:

- Наночастиците се диспергират в два вида разтворители – дейонизирана вода (за чиста водна среда) и физиологичен разтвор на NaCl с концентрация 0.9% (за симулиране на йонната сила на биологичните флуиди).
- Така приготвените разтвори се разделят на две групи. Едната група разтвори се подлага на въздействието на ултразвуков хомогенизатор (300W 3x2 min pulse mode), докато другата остава непроменена с цел сравнение.
- С помощта на капкомер върху чистите стъклени подложки се нанася точно дозирана капка от подготвената суспензия. За препарати 2, 3, 4 и 5 обемът на капката е 20 μl , докато за образец 6 се нанася по-голямо количество от 100 μl с цел проследяване на ефекта от дебелината на течния слой върху крайния релеф.



Фигура 13. Приготвените препарати и образци. Спазва се рецептурата 2 mg SiO_2 / 10ml dH_2O .

Всички образци са поставени при еднакви условия, на стайна температура, в продължение на четири седмици за да има възможност разтворителят да изсъхне

напълно и да се разкрие новообразуваният се релеф от възможни структури, скупчвания или плътни слоеве на наночастици.

В таблица 2 са представени характеристиките и обработката на препаратите приготвени за изследване.

Таблица 2: Характеристики на приготвените препарати и образци

Препарат	Количество нанесен разтвор (капка)	Концентрация на наночастици	Разтворител	Ultrasound 300W 3x2 min pulse mode
1	Dry	-	-	-
2	20ul	0,02%	Deionized H ₂ O	no
3	20ul	0,02%	Deionized H ₂ O	yes
4	20ul	0,02%	0,9% NaCl	no
5	20ul	0,02%	0,9% NaCl	yes
6	100ul	0,02%	0,9% NaCl	no

1. Контролен сух образец

2. Препарат върху стъкло + 20ul капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO₂ nanoparticles в deionized H₂O (SiO₂ 2 mg / 10 ml H₂O)

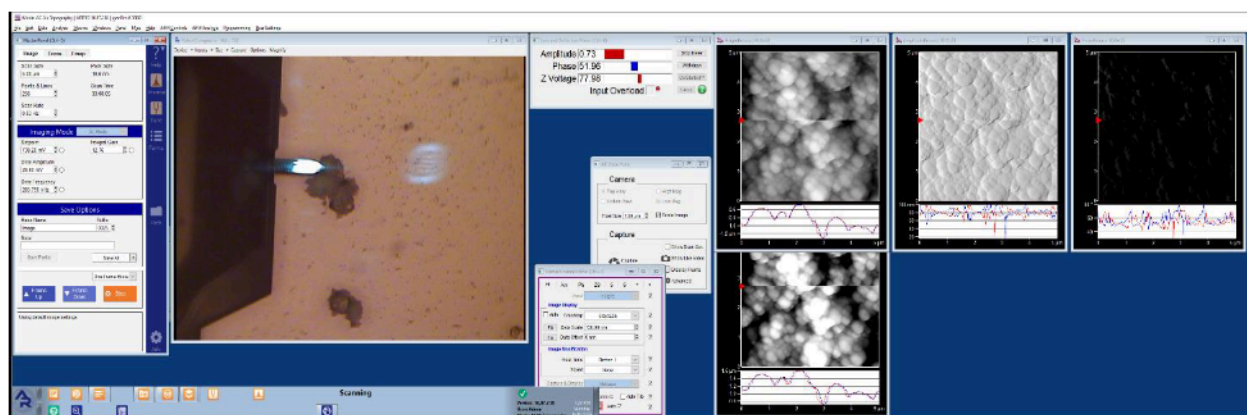
3. Препарат върху стъкло + 20ul капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO₂ nanoparticles в deionized H₂O (SiO₂ 2 mg / 10 ml H₂O) + ултразвукова обработка докато е течна капка (300W 3x2 min pulse mode)

4. Препарат върху стъкло + 20ul капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO₂ nanoparticles във физиологичен разтвор на (SiO₂ 2 mg / 10 ml 0,9%NaCl)

5. Препарат върху стъкло + 20ul капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO₂ nanoparticles във физиологичен разтвор на (SiO₂ 2 mg / 10 ml 0,9%NaCl) + ултразвукова обработка докато е течна капка (300W 3x2 min pulse mode)

6. Препарат върху стъкло + 100ul капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO₂ nanoparticles във физиологичен разтвор на (SiO₂ 2 mg / 10 ml 0,9%NaCl)

3.4 Експериментални резултати



Фигура 14. Екранна снимка от софтуера на AFM по време на сканиране на препарат 5 - образец 4.

Всички измервания са проведени в режим AC Air Topography/AC Mode, (трептящ режим във въздух). Площта на сканиране варира от 5 x 5 μm до 20 x 20 μm . За всеки препарат са подготвени различен брой образци. Информация за тях е дадена в Таблица 3. В зелено са отбелязани изследваните образци.

С цел по-добра визуализация, получените сурови AFM изображения са обработени със софтуер: Gwyddion 2.61, <http://gwyddion.net/> като за всяко изображение са приложени техники за нормиране на изображението „FixZero”. В този случай най-ниската точка от изображението се приема за условна нула. По този начин лесно може да се придобие представа за височината на релефа. Получените по този начин изображения са експортирани в 2D и 3D варианти за целите на демонстрация на топология на релефа. Детайлният анализ и определянето на метриците на получените изображения не са цел на настоящата дипломна работа, която е основно демонстрационна.

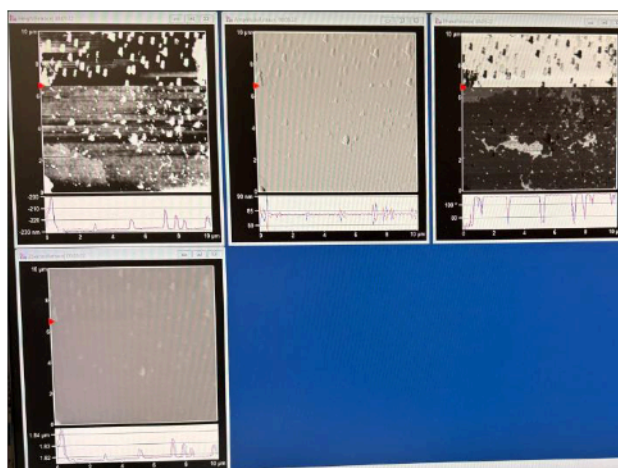
Таблица 3: Информация за изследваните образци сканирани с AFM и получените изображения

Препарат	Droplet	Conc.	Solvent	Ultrasound	Образец	Сурово AFM изображение	
						size [μm]	номер
1	Dry	-	-	-	1	-	-
					8	10x10	04
						10x10	05
						10x10	06
						10x10	07
					9	10x10	00 only glass
						10x10	01 glass + artefacts

						20x20	02 glass
						10x10	03 glass
2	20ul	0,02%	d H ₂ O	no	2	10x10	08
						10x10	09
						5x5	10
					7	5x5	11
						5x5	12
						10x10	13
3	20ul	0,02%	d H ₂ O	yes	10		
					11	10x10	19
					12	10x10	17
						10x10	18
4	20ul	0,02%	0,9% NaCl	no	6	3x3	20
						5x5	21
						5x5	22
5	20ul	0,02%	0,9% NaCl	yes	4	5x5	23
						5x5	24
						5x5	25
					5		
6	100ul	0,02%	0,9% NaCl	no	3		
blank glass					glass	10x10	14 top-bottom
						10x10	15 bottom-top
						10x10	16

3.4.1 Измерване на чиста стъклена подложка

Процедурата по предварително сканиране на чистата стъклена подложка се извършва за да се гарантира, че микроскопичните неравности няма да бъдат объркани с изследваните наночастици. Преди меренето на наночастиците се поставя предметно стъкло в микроскопа и се извършва сканиране на празна тестова област, обикновено с размер $10 \times 10 \mu\text{m}$, за да се запише топографско състояние на подложката. Отчетените данни показват, че стъклото притежава фина повърхностна текстура от 2 до 3 нанометра, което представлява естественият фонов шум на материала.

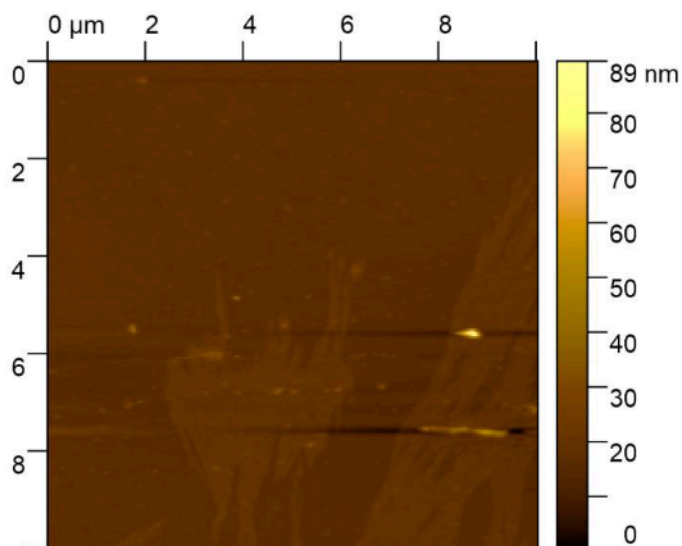


Фигура 15. Измерване на чиста стъклена подложка с фина повърхностна текстура.

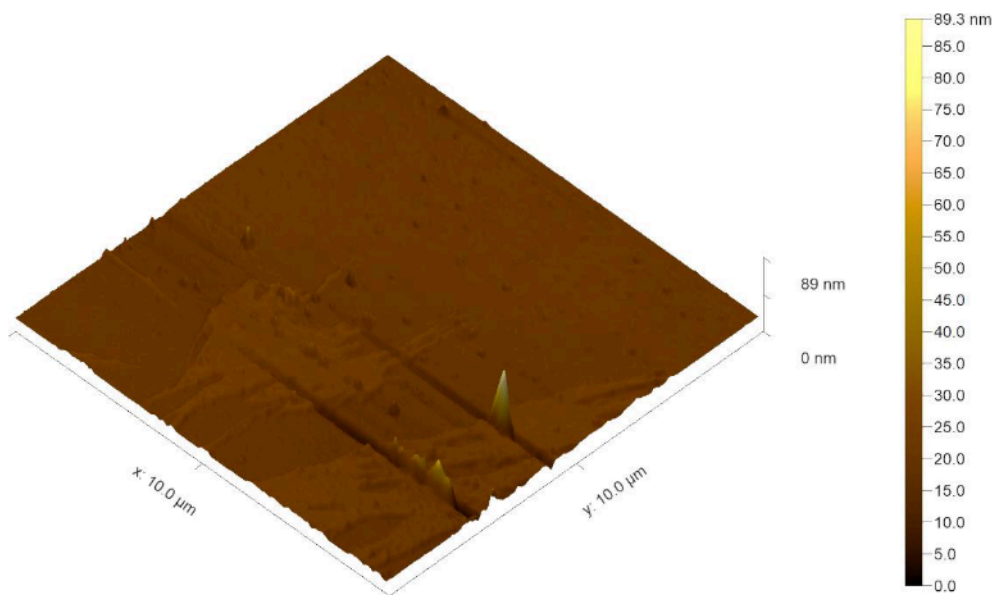
3.4.2 Препарат 1

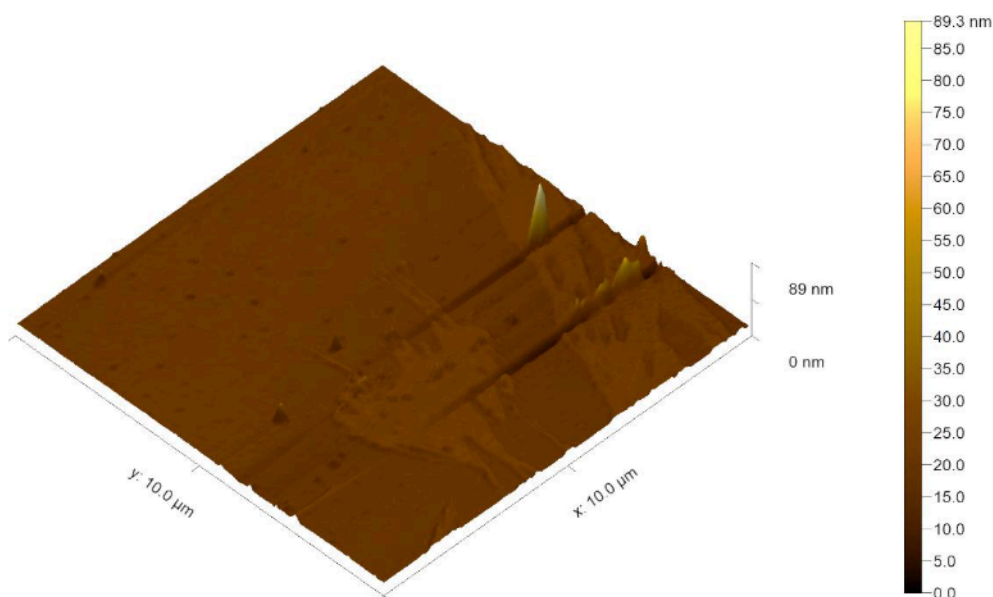
Контролен сух образец

Върху чистата стъклената повърхност е нанесен механично прахообразният материал съдържащ наночастиците от SiO_2 . Образецът обаче се оказва неподходящ за сканиране на частиците, защото са се образували скупчвания с големи височини и размери надвишаващи възможностите на безопасно за кантилевъра, AFM сканиране. Въпреки това имаше много области от чиста стъклена повърхност, които бяха сканирани. Така получените изображения на образец 8 могат да се използват като контролна стъклена повърхност далеч от скупчванията на наночастиците както е показано на фигури 15 и 16.



Фигура 16. Двумерно топографско изображение на образец 8. Не се наблюдават наночастици, но са видими артефакти.





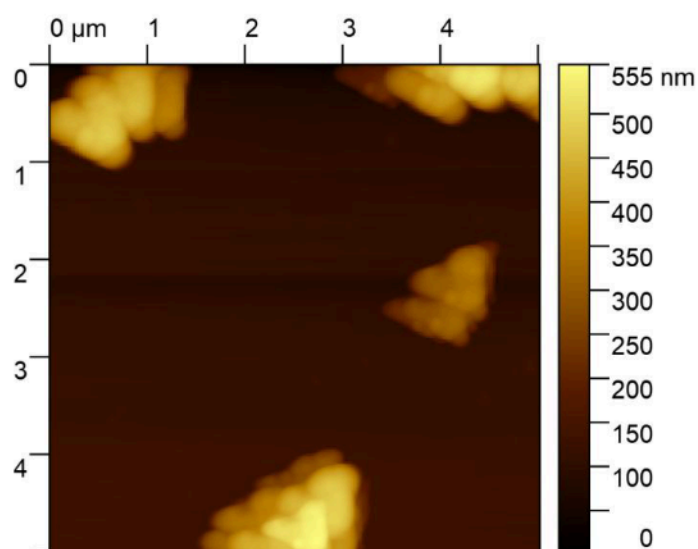
Фигура 17. 3D изображение на същото поле в образец 8 наблюдавано от ъгъла $\phi=45^\circ$ и $\phi=-45^\circ$ градуса, показва стъклена повърхност с наличие на артефакти

3.4.3 Препарат 2

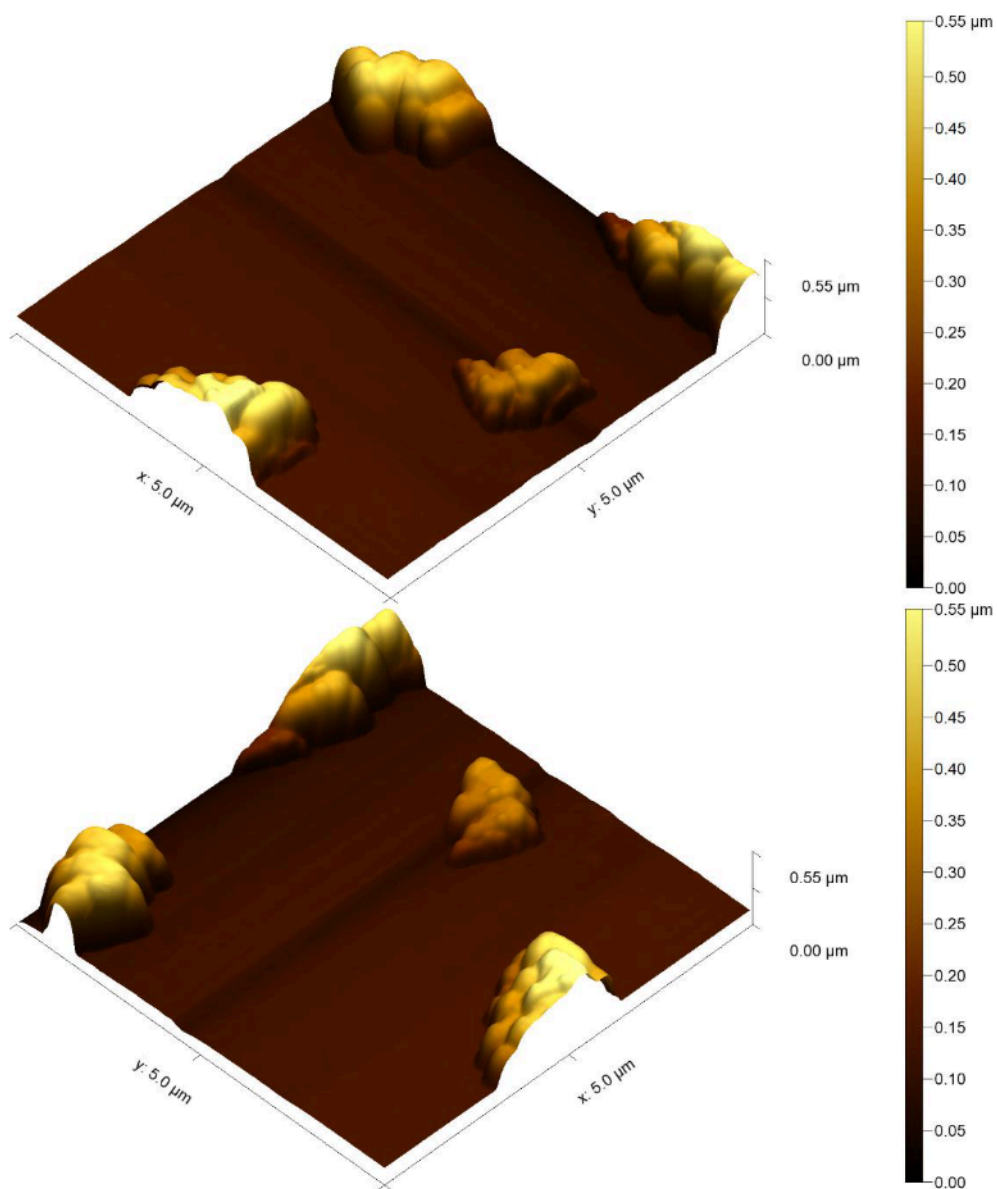
Върху стъкло е нанесена 20 μ l капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO₂ наночастици в дейонизирана H₂O (SiO₂ 2 mg / 10 ml H₂O)

Изследвани са образци 2 и 7 и полета 5x5 μ m. След изпарението на разтворителя (дейонизирана вода) се наблюдават единични клъстърни образувания от агрегирани наночастици.

Образец 2:

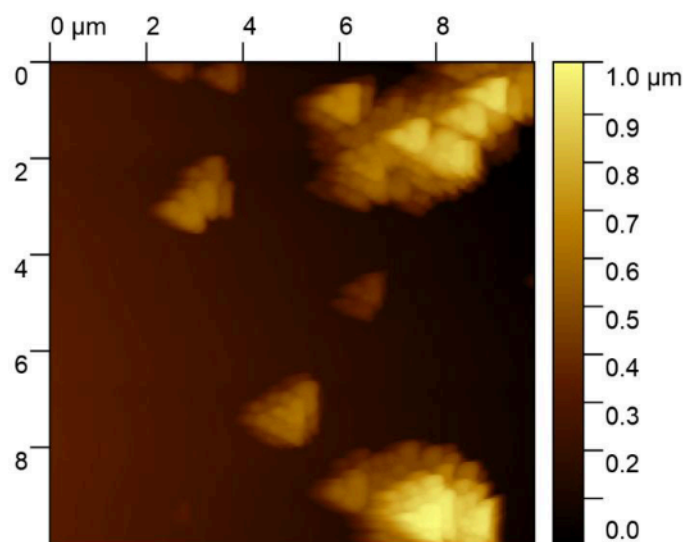


Фигура 18. Двумерно топографско изображение на образец 2

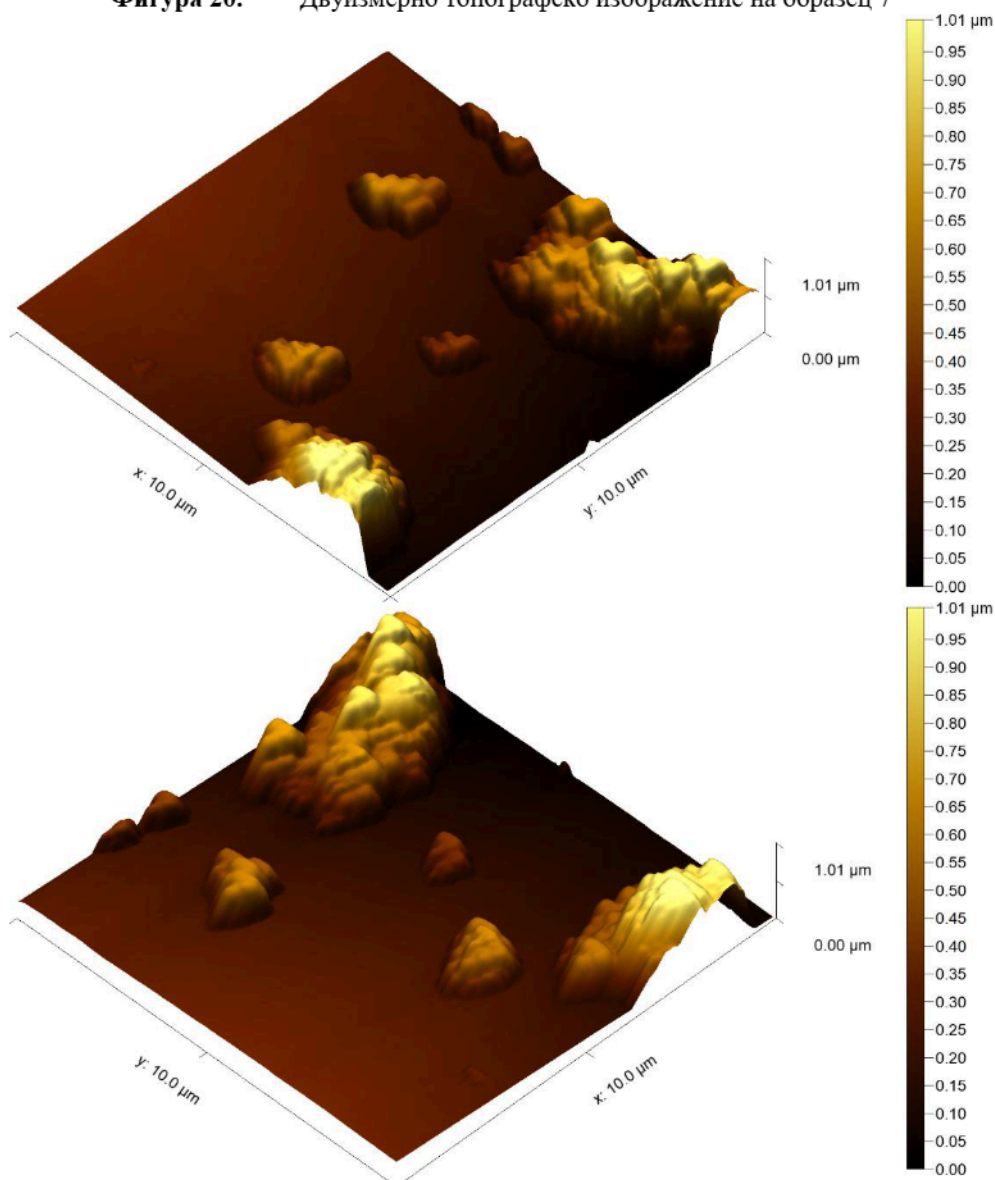


Фигура 19. 3D изображение на същото поле в образец 2 наблюдавано от ъгъла $\phi=45^\circ$ и $\phi=-45^\circ$

Образец 7



Фигура 20. Двумерно топографско изображение на образец 7

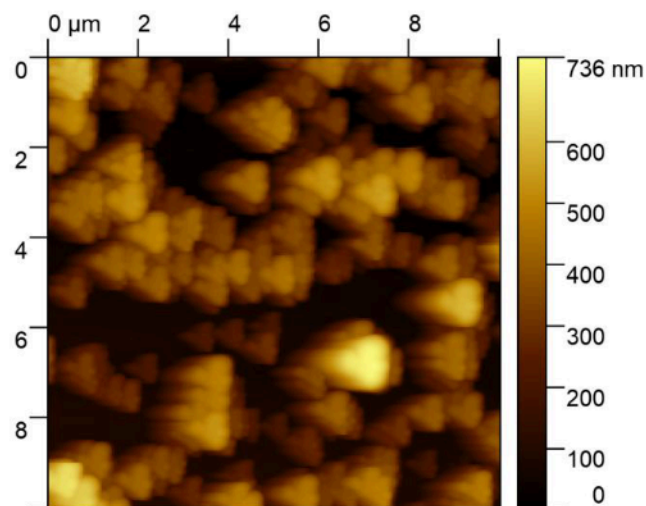


Фигура 21. 3D изображение на същото поле в образец 7 наблюдавано от ъгъла $\phi=45^\circ$ и $\phi=-45^\circ$

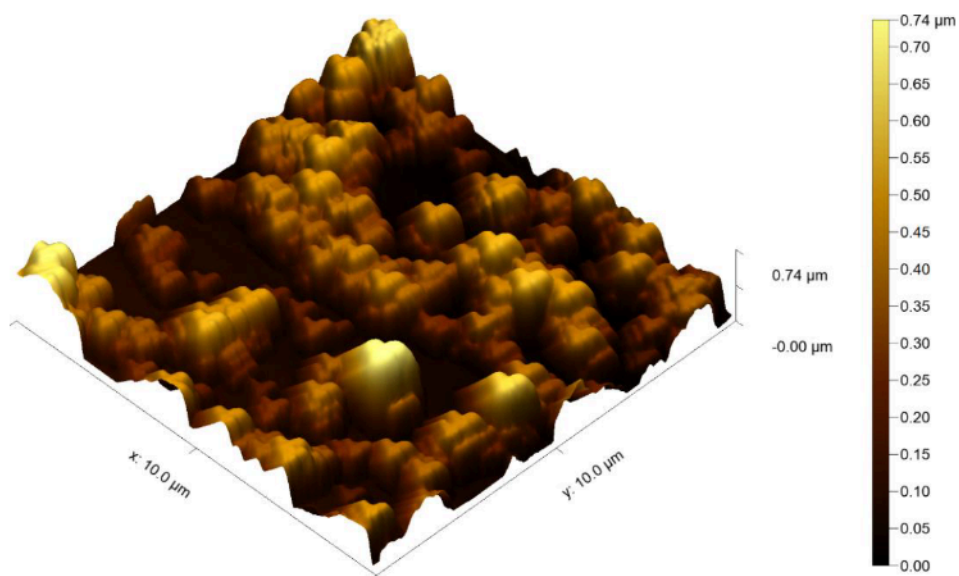
3.4.4 Препарат 3

Върху стъкло е нанесена 20 μ l капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO₂ наночастици в дейонизирана H₂O (SiO₂ 2 mg / 10 ml H₂O) + ултразвукова обработка докато е течна капка (300W 3x2 min pulse mode)

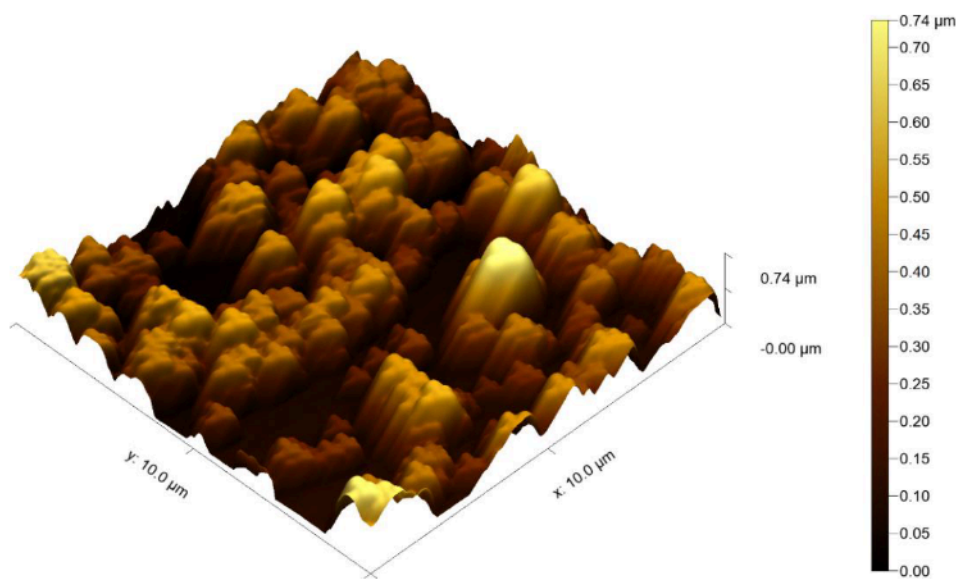
Изследвани са образци 11 и 12, наблюдават се слоеве от натрупани наночастици.



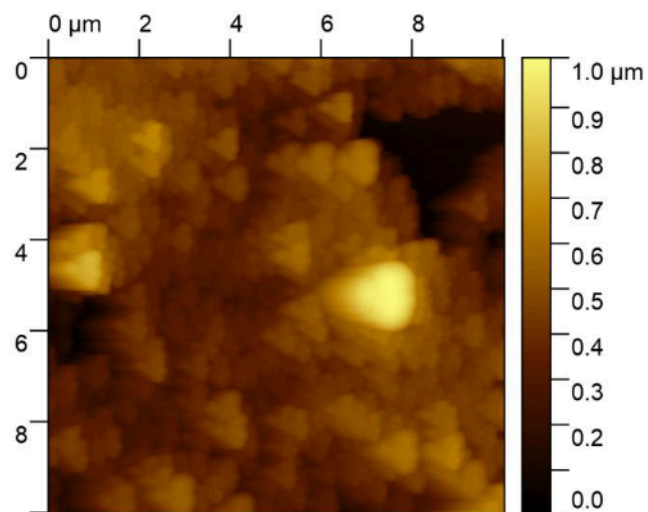
Фигура 22. Двумизмерно топографско изображение на образец 12



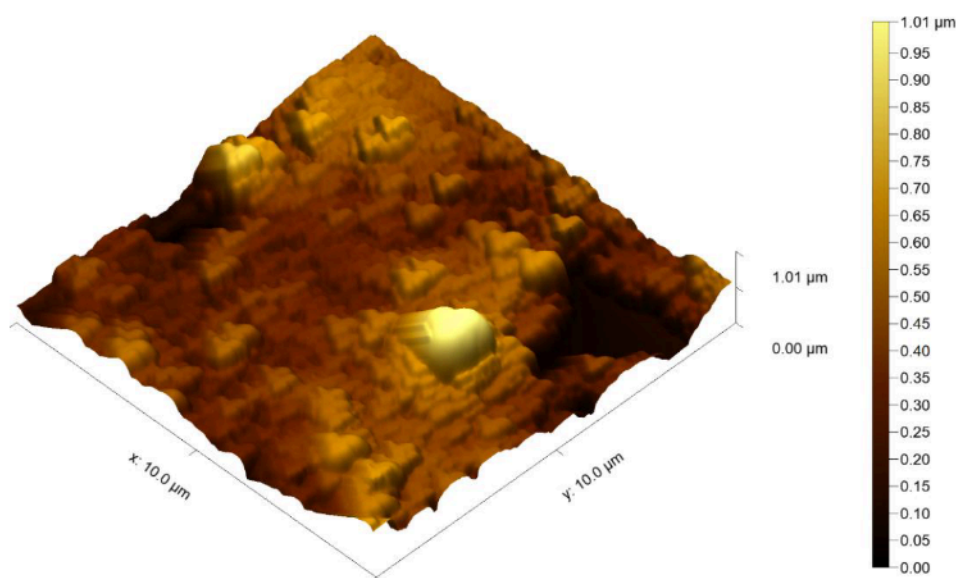
Фигура 23. 3D изображение на същото поле в образец 12 наблюдавано от $\varphi=45^\circ$



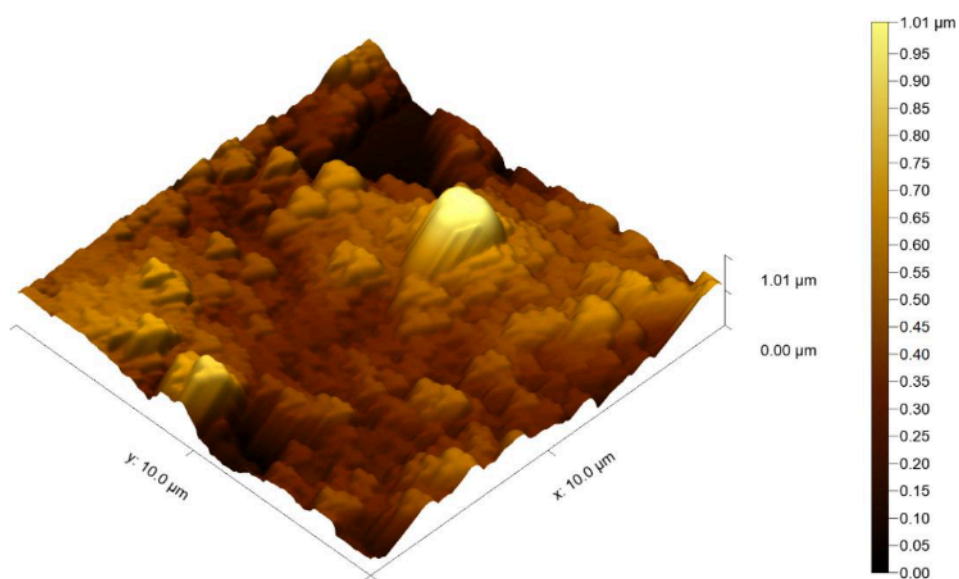
Фигура 24. 3D изображение на същото поле в образец 12 наблюдавано от $\varphi=-45^\circ$



Фигура 25. Двумерно топографско изображение на образец 11



Фигура 26. 3D изображение на същото поле в образец 11 наблюдавано от $\phi=45^\circ$

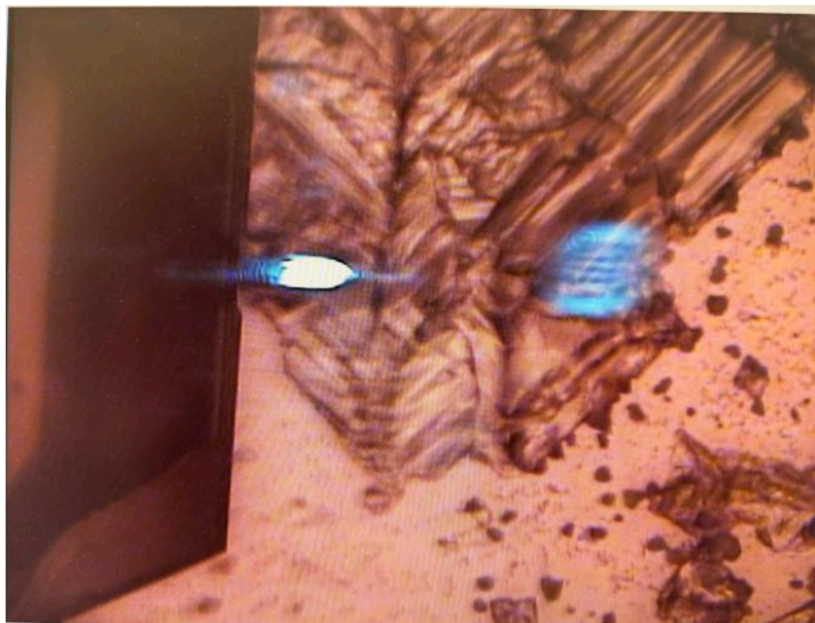


Фигура 27. 3D изображение на същото поле в образец 11 наблюдавано от $\phi=-45^\circ$

3.4.5 Препарат 4

Върху стъкло е нанесена 20 μ l капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO₂ наночастици във физиологичен разтвор на (SiO₂ 2 mg / 10 ml 0,9%NaCl).

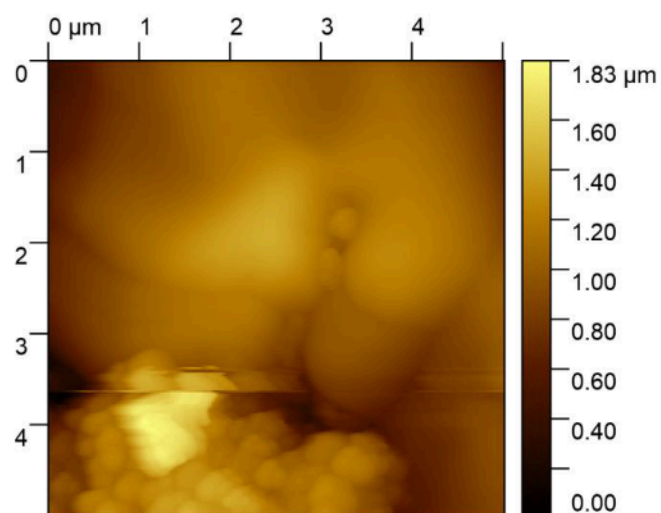
При изпарението на пробите, приготвени с физиологичен разтвор (NaCl), съхненето е съпроводено с кристализация на голямо количество сол, при което се образуват гигантски за мащабите на AFM кубични кристали.



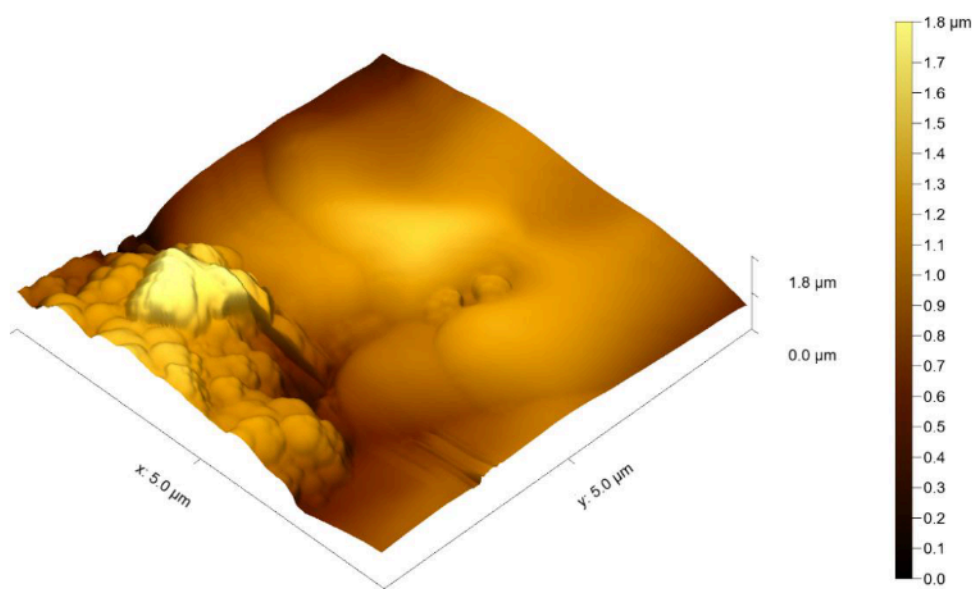
Фигура 28. Кристализиран физиологичен разтвор (NaCl) наблюдаван през навигационната камера на микроскопа при изследване на Препарат 4 (образец 6 по номенклатурата на таблица 3). Светлото петно вляво показва лазерният лъч отразен от кантилिवъра

От физикохимична гледна точка, процесът на кристализация се характеризира с естествено изхвърляне на всички чужди примеси извън израждащата се кристална решетка. Поради тази причина наночастиците не остават вградени вътре в обема на солните кристали, а биват избутани по техните периферии върху стъклото и позволява те да бъдат успешно открити и сканирани с атомно-силовия микроскоп в зоните извън големите кристални натрупвания.

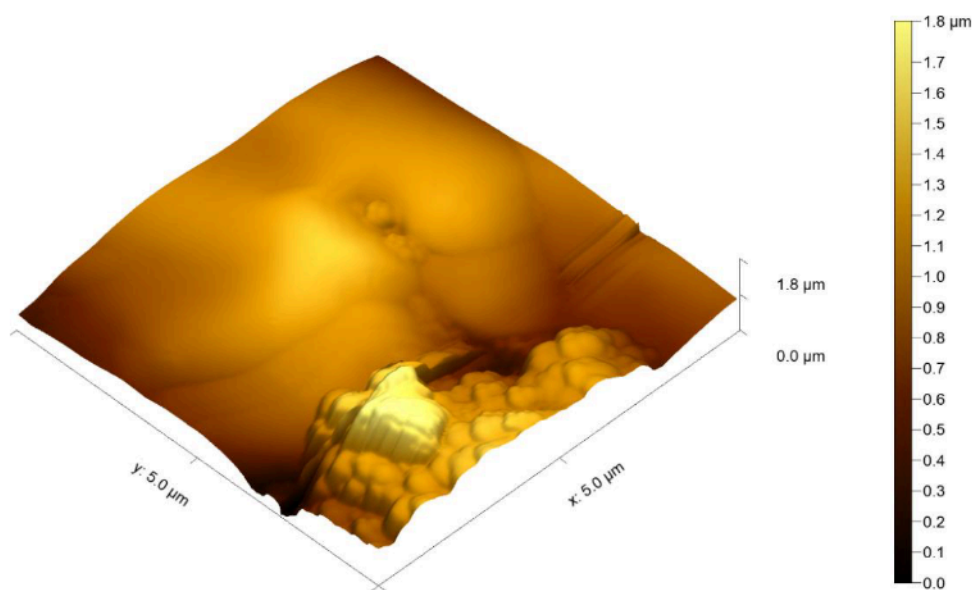
Изследван е образец 6, въпреки интересната топология и структури на изображението се вижда артефакт.



Фигура 29. Двумерно топографско изображение на образец 6



Фигура 30. 3D изображение на същото поле в образец 6 наблюдавано от $\varphi=45^\circ$



Фигура 31. 3D изображение на същото поле в образец 6 наблюдавано от $\varphi=-45^\circ$

3.4.6 Препарат 5

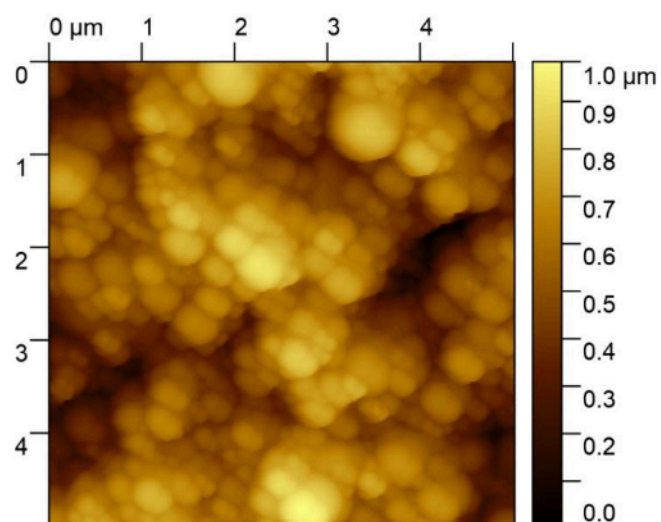
Върху стъкло е нанесена 20ul капка от 0,02% (масови проценти) разтвор на SiO_2 наночастици във физиологичен разтвор на (SiO_2 2 mg / 10 ml 0,9%NaCl) + ултразвукова обработка докато е течна капка (300W 3x2 min pulse mode)

Производителите на наноматериали посочват, че номиналният размер на частиците SiO_2 е 310 nm и е получен при идеални условия на синтез. Когато обаче тези наночастици се диспергират в течна среда (физиологичен разтвор на NaCl за симулиране на биологични флуиди), те започват спонтанно да се групират под въздействието на повърхностните сили. Без подходящо третиране частиците образуват големи „малиноподобни“ клъстери с микронен размер често над 2 μm . За да се предотврати тази спонтанна агрегация и да се постигне равномерно разпределение на единични наносфери върху стъклото, се прилага пулсова ултразвукова обработка с цел хомогенизация (с мощност 300W, в режим 3 пъти по 2 минути) директно върху течната капка преди нейното изсъхване.

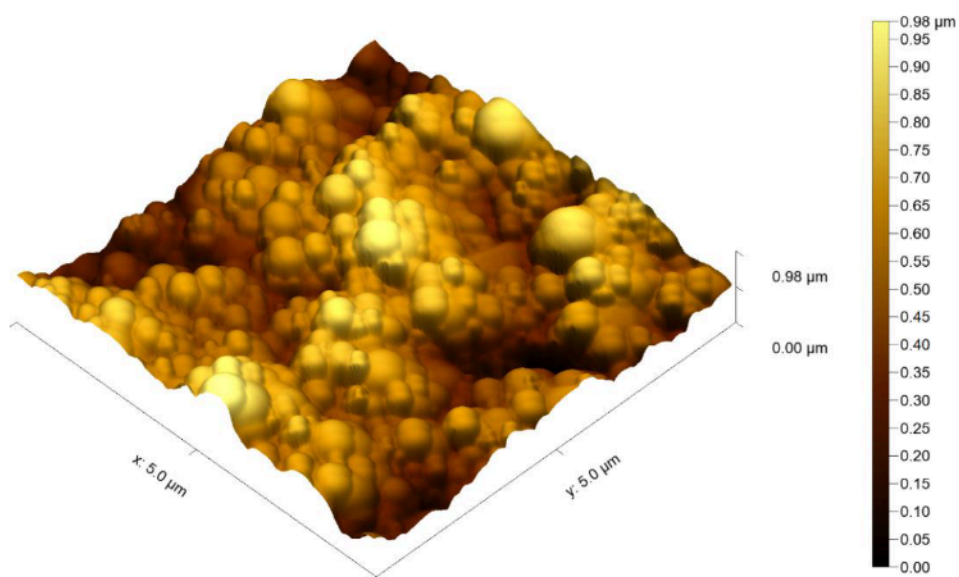
Експерименталното измерване е начин да се установи действителният размер на частиците и да се оцени ефективността на физическите методи за дисперсия, като пулсовата ултразвукова обработка, прилагана за разбиване на тези агрегати.

Когато частиците са твърде малки, клетките лесно ги поглъщат, но поради засиления вътреклетъчен метаболизъм раковите клетки бързо ги разпознават и изхвърлят (екскретират) навън, което разваля терапевтичния ефект. Ако са твърде големи (над 1–2 μm), клетъчната мембрана притежава ограничена еластичност и не може да се огъне достатъчно, за да обгърне и погълне микроразмерни обекти чрез ендоцитоза. Частиците с размер около 300 nm са достатъчно малки, за да влязат в клетката, но същевременно са достатъчно големи, за да останат затворени вътре в нея, осигурявайки контролирано освобождаване на лекарството. Измерването с AFM потвърждава дали наночастиците от SiO_2 отговарят на този критичен биологичен критерий.

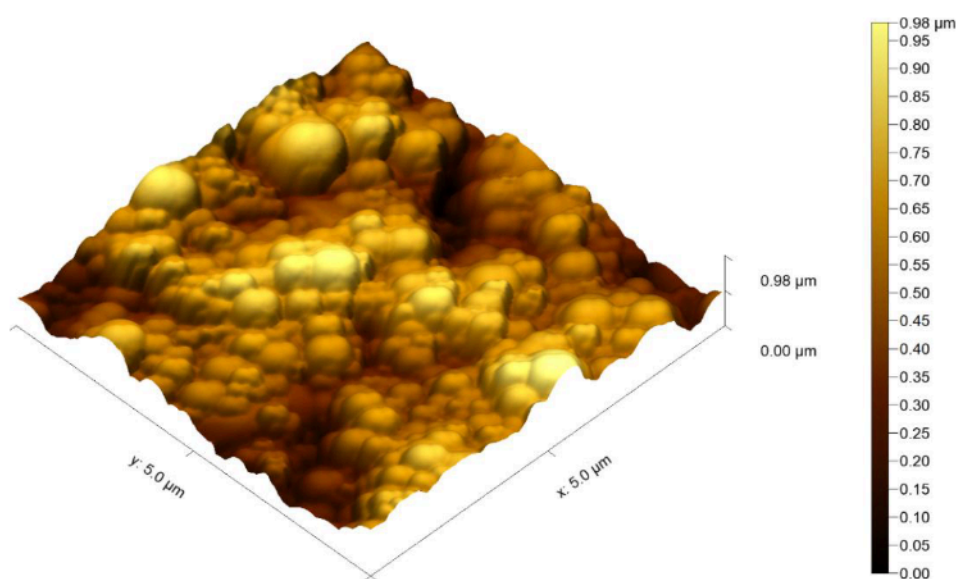
Изследван е образец 4 на който най-добре се вижда образувалият се слой от наночастици.



Фигура 32. Двумерно топографско изображение на образец 4



Фигура 33. 3D изображение на същото поле в образец 4 наблюдавано по ъгъл $\phi=45^\circ$



Фигура 34. 3D изображение на същото поле в образец 4 наблюдавано по ъгъл $\phi = -45^\circ$

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Като резултат, в дипломната работа обзорно са представени характеристиките и особеностите на AFM технологията.

Разгледани са характеристиките, свойствата и някои от медицинските приложения на наночастиците от SiO_2 в качеството им на преносители на лекарствени препарати в живите клетки.

Проведени са експерименти със специално приготвени за целта препарати и образци от наночастици SiO_2 нанесени върху предметно стъкло.

Дипломантът е участвал при изпълнението на цялостната процедура за провеждане на AFM изследване в реални лабораторни условия. В резултат на това са получени повече от 20 сурови AFM изображения, които след това са обработени до получаването на двуизмерни и триизмерни изображения с висока резолюция, демонстриращи образувалите се наноструктури.

Освен очевидната разлика в топологията на образувалите се нано структури между препаратите с дейонирана вода (препарат 2) и тези с физиологичен разтвор (препарат 4) е установена съществена разлика в структурата между препаратите третирани с ултразвуков хомогенизатор (препарат 3 и 5) и тези които не са подлагани на ултразвук (препарат 2 и 4). Причините за наблюдаваните разлики не са подлагани на анализ тъй като излизат извън рамките на поставената цел на дипломната работа защото изискват значително по-голям брой от направените изследвания и представляват предмет на бъдеща работа по темата.

5 СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АСМ – Атомно-силов микроскоп

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

АС (Alternating Current) – Променлив ток / Променливотоков динамичен режим

AFM (Atomic Force Microscope / Microscopy) – Атомно-силов микроскоп / Атомно-силова микроскопия

C-AFM (Conductive AFM) – Проводима атомно-силова микроскопия

CCD (Charge-Coupled Device) – Прибор с зарядова връзка (CCD видеокамера)

CPD (Contact Potential Difference) – Контактна потенциална разлика

DART (Dual AC Resonance Tracking) – Двойно променливотоково проследяване на резонанса

EFM (Electrostatic Force Microscopy) – Микроскопия с електростатична сила

KPFM (Kelvin Probe Force Microscopy) – Силова микроскопия със сонда на Келвин

LFM (Lateral Force Microscopy) – Микроскопия на страничните (латерални) сили

MFM (Magnetic Force Microscopy) – Микроскопия с магнитна сила

MSN (Mesoporous Silica Nanoparticles) – Мезопорести силициеви наночастици

ORCA (Optimized Resistance Conductance Amplifier) – Оптимизиран усилвател на съпротивление и проводимост

PEG – Полиетиленгликол (хидрофилен полимер за повърхностна пасивация)

PFM (Piezoresponse Force Microscopy) – Силова микроскопия с пиезореакция

PID (Proportional-Integral-Derivative) – Пропорционално-интегрално-диференциален алгоритъм

SLD (Superluminescent Diode) – Суперлуминесцентен диод

SPM (Scanning Probe Microscope / Microscopy) – Сканиращ сондов микроскоп / Сканираща сондова микроскопия

6 СПИСЪК НА ОЗНАЧЕНИЯТА И ФИЗИЧНИТЕ ВЕЛИЧИНИ

Означение	Физическа величина	Измервателна единица
F	Сила на физическо взаимодействие	N, nN (нютон, нанонютон)
k	Константа на еластичност (коравина) на конзолата	N/m, nN/nm
d	Вертикално преместване / отклонение на конзолата	m, nm (нанометър)
E	Модул на линейна деформация (модул на Юнг)	Pa, GPa, N/m ²
L	Дължина на правоъгълната конзола на сондата	μm (микрометър)
w	Широчина на правоъгълната конзола на сондата	μm (микрометър)
t	Дебелина на правоъгълната конзола на сондата	μm, nm
f_{res}, f_0	Резонансна честота на трептене на кантилевера	Hz, kHz (килохерц)
γ	Повърхностно напрежение на течната фаза (менискуса)	N/m, mN/m
r_1, r_2	Радиуси на кривина на образувания воден менискус	nm (нанометър)
r_k	Радиус на Келвин (при капилярна кондензация)	nm (нанометър)
P	Площта под Лоренцовата крива	Безразмерна величина
ϵ_0	Диелектрична проникваемост на вакуум	F/m (фарад на метър)
R_q	Средно квадратична грапавост на повърхността (RMS)	nm (нанометър)
R_A	Средноаритметична грапавост на повърхността	nm (нанометър)
pH	Водороден показател (киселинност на суспензията)	Безразмерна стойност от 0 до 14
p	Импулс на осцилатора	kg·m/s
ω_0	Резонансната кръгова честота	rad/s (радиан в секунда)
x	Вертикалното преместване на осцилатора	
k_B	Константата на Болцман	J/K (джаул на келвин)

7 ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. “A beginner’s guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics”, Nuria Gavara, 2016
2. “Nanosurf: Zoom Into the Future”, Nanosurf
3. “A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules”, Toshio Ando, Noriyuki Kodera, Eisuke Takai, Daisuke Maruyama, Kiwamu Saito, and Akitoshi Toda, 2001
4. “AFM Applications in Polymer Science and Engineering” , Oxford Instruments Asylum Research, Inc., 2022
5. “Въведение в атомно-силовата микроскопия” , Красимира Русинова-Илчева , 2024
6. “Atomic Force Microscopy: More Than Surface Imaging”, Terrance Tyler Bishop, 2020
7. “Developing and Using Atomic Force Microscopy to Investigate Mechanisms of Tumour Metastasis”, Jacob George Albon, 2014
8. “Nanotechnology meets medicine: applications of atomic force microscopy in disease”. Zita Matias, Catarina S. Lopes, Nuno C. Santos, Filomena A. Carvalho, 2025
9. “Signaling Pathways Regulated by Silica Nanoparticles”, Shih-Yi Hsu, Robert Morris and Feng Cheng , 2021
10. “Silica Materials for Medical Applications”, María Vallet-Regí, Francisco Balas, 2008
11. “Atomic Force Microscopy”, Peter Eaton, Paul West
12. “What is Atomic Force Microscopy (AFM)” Oxford Instruments Asylum Research, Inc., 2022
13. “Atomic Force Microscopy”, Wikipedia
14. “How AFM Works”, Park Systems
15. “Measuring Force-Distance Curves with AFM”, AFM Workshop
16. “AFM, Impact Indentation and Rheometry for Characterizing Brain Tissue”, Journal of Visualized Experiments
17. “Developing and Using Atomic Force Microscopy to Investigate Mechanisms of Tumor Metastasis”, Jacob George Albon , 2014
18. “Biomedical Applications of Silica Nanoparticles” , Fiorentis E., Gatou MA, Lagopati N, Pavlatou EA, 2023
19. “Photothermal Atomic Force Microscopy Coupled with Infrared Spectroscopy (AFM-IR) Analysis of High Extinction Coefficient Materials: A Case Study with Silica and Silicate Glasses” , Yen-Ting Lin, Hongtu He, Huseyin Kaya, Hongshen Liu, Dien Ngo, Nicholas J. Smith, Joy Banerjee, Ali Borhan, Seong H. Kim, 2022
20. “Silica nanoparticles in medicine: overcoming pathologies through advanced drug delivery, diagnostics, and therapeutic strategies” , Carmen-Larisa Nicolae, Diana-Cristina Pîrvulescu, Alexandru Mihai Antohi, Adelina Gabriela Niculescu, Alexandru Mihai Grumezescu, George-Alexandru Croitoru , 2024
21. “Filming Biomolecular Processes by High-Speed Atomic Force Microscopy” , Toshio Ando * ; Takayuki Uchihashi; Simon Scheuring, 2014
22. “Silicon Dioxide (SiO₂) Nanopowder/Nanoparticles” , Nanografi Nano Technology
23. “AFM in the Life Sciences” BRUKER

8 БЛАГОДАРНОСТИ

Специални благодарности към гл. ас. д-р Светлана Христова за идеите и консултациите, както и за незаменимото съдействие за осигуряване на наночастиците, приготвянето и предварителната подготовка на препаратите и образците за изследване.

Експерименталната работа е извършена в „Лабораторията по нови детектори и системи за интелигентно управление на процеси“, и в лаборатория „Електроакустични изследвания на електролити и резонансна тензиометрия“ към „Национален център за върхови постижения Мехатроника и чисти технологии“ – Кампус Лозенец, Физически Факултет.

Използваната високотехнологична апаратура и лабораториите са част от проект BG16RFPR002-1.014-0006 „Национален център за върхови постижения Мехатроника и чисти технологии“ – Кампус Лозенец, финансиран по Програма „Научни изследвания, иновации и дигитализация за интелигентна трансформация“ 2021-2027, съфинансирана от Европейския фонд за регионално развитие.

Acknowledgments: This work was supported by the European Regional Development Fund under "Research Innovation and Digitization for Smart Transformation" program 2021-2027 under the Project BG16RFPR002-1.014-0006 "National Centre of Excellence Mechatronics and Clean Technologies"