

DOI: 10.5862/JPM.248.8

УДК: 579:53.086

*К.И. Крымская, Н.В. Андреева, А.В. Филимонов*

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

## **МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОДУЛЯ ЮНГА БИООБЪЕКТОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ТЕМПЕРАТУР НИЖЕ КОМНАТНОЙ**

В работе предлагается новая методика определения модуля Юнга биообъектов с помощью криогенной атомно-силовой микроскопии (АСМ) в температурном интервале 30 – 300 К. Новая методика основана на работе с АСМ с оптической системой регистрации положения зонда, построенной по интерферометрическому принципу. Модуль Юнга определяется из полученных данных путем расчета, учитывающего температурную зависимость модуля упругости балки зонда. В результате исследования была получена температурная зависимость модуля Юнга полилизина в температурном диапазоне 60 – 300 К.

КРИОГЕННАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ, КРИВАЯ ПОДВОДА-ОТВОДА, МОДУЛЬ ЮНГА.

### **Введение**

Метод атомно-силовой микроскопии позволяет исследовать трибологические свойства поверхности объекта на микромасштабном уровне. В режиме спектроскопических измерений этот метод используется для изучения распределения модуля Юнга по поверхности образцов с нанометровым разрешением, для проведения качественного и количественного анализа адгезионных свойств материалов.

Механические свойства поверхности объектов играют важную роль во многих случаях их применения в биологии и медицине. При конструировании протезов, кардио- и нейростимуляторов, свойства поверхности определяют не только прочность и долговечность этих устройств, но и адгезию клеток к ним, что, в свою очередь, оказывает влияние на весь процесс адаптации организма к такого рода конструкциям.

Исследование температурной динами-

ки механических свойств клеток важны в решении проблем криобиологии, которая изучает поведение клеток и тканей при низких температурах [1, 2]. Данные свойства плазматической мембраны обуславливают механизм процесса, приводящего к разрушению клетки при обезвоживании в результате замораживания. Изучение механических свойств мембраны необходимо для подбора наилучших режимов замораживания и отогрева биообъектов, а также условий их хранения.

Клетка – это сложный объект для исследования температурной динамики механических свойств мембраны, поскольку на результаты измерений оказывают влияние разные процессы, в том числе кристаллизация льда. Поэтому перед тем, как приступить к изучению механических свойств клеток, целесообразно проводить исследование на модельных объектах, с тем, чтобы выявлять и разделять вклады от различных явлений и процессов в изменение механи-

ческих свойств клеточной мембраны при ее замораживании. В качестве такого модельного объекта мы выбрали биополимер полилизин, который представляет собой небольшой природный гомополимер незаменимой аминокислоты *L*-лизина.

Цель нашего исследования – разработка методики определения модуля Юнга методом АСМ на примере полилизина в широком диапазоне температур ниже комнатной.

### Методическая часть

Для определения модуля упругости полилизина применялась методика регистрации кривых подвода-отвода. Поскольку оптическая система, которая фиксирует отклонения балки зонда в криогенном атомно-силовом микроскопе (АСМ), имеет ряд особенностей, методика регистрации указанных кривых отличалась от стандартной.

Оптическая система регистрации положения балки зонда 4 (рис. 1, *a*) в кри-

огенном АСМ построена по интерферометрическому принципу. Она состоит из одномодового оптоволоконна 6, полупроводникового ИК-лазера 5 с длиной волны 1330 нм и фотодетектора. Между зондом микроскопа 3-4 и отполированным концом 7 оптоволоконна 6 реализован интерферометр Фабри – Перо. Таким образом, оптоволоконно выполняет двойную функцию: с одной стороны, доставляет лазерное излучение к зонду (примерно 96 % излучения проходит через отполированный конец оптоволоконна и частично отражается зондом), с другой – образует часть интерферометра (остальное излучение отражается от границы оптоволоконно – воздух). Отраженный от зонда лазерный луч частично проходит обратно в оптоволоконно и интерферирует с лучом, отраженным от границы оптоволоконно – воздух. При отклонении зонда от исходного положения изменяется размер полости интерферометра, что соответствует изменению уровня интерферометрического сигнала и, в свою очередь, приводит к из-

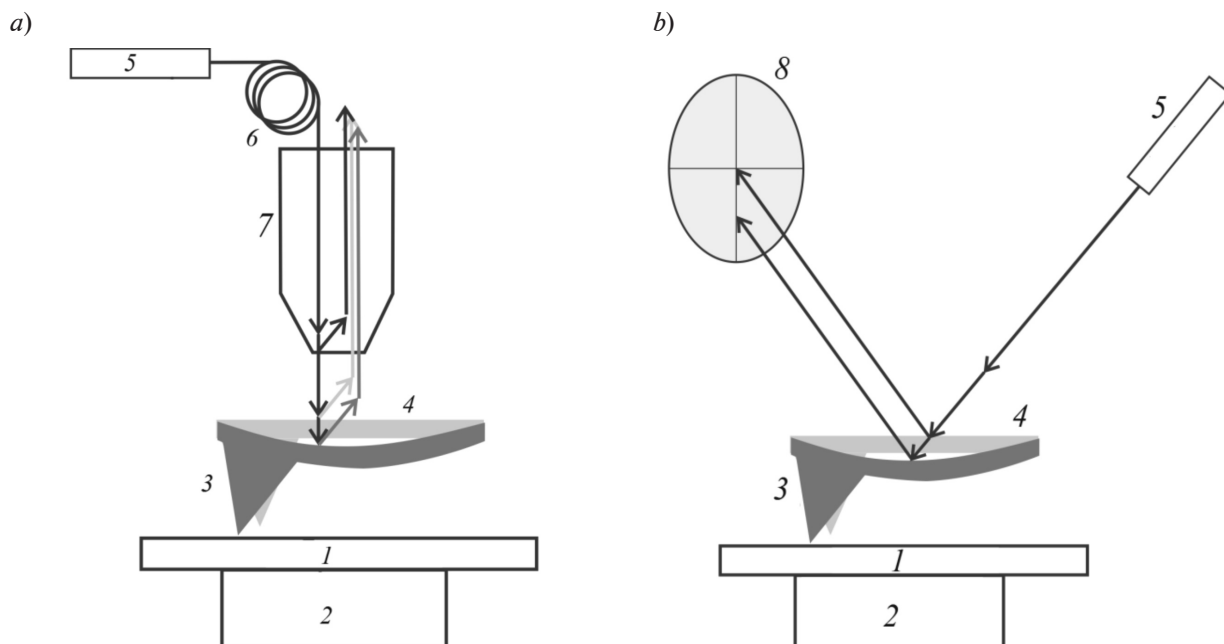


Рис. 1. Схемы оптической системы регистрации положения зонда в атомно-силовом микроскопе: построенная по интерферометрическому принципу (*a*) и с четырехсекционным фотодетектором (*b*); 1 – образец; 2 – XYZ-сканер; 3, 4 – острие и балка зонда; 5 – лазер; 7 – конец оптоволоконна 6 в увеличенном масштабе; 8 – четырехсекционный фотодетектор.

Линии со стрелками указывают распространение лазерного луча: *a* – 96 % излучения показано черными линиями, 4 % – серыми; *b* – 100% – черными линиями

менению сигнала, поступающего на фотодетектор. Процесс юстировки оптической системы, которая чувствительна к отклонению балки зонда в системе, заключается в регистрации зависимости выходного сигнала с интерферометра от размера его полости, т. е. расстояния между балкой зонда 4 и оптоволоконном 6.

Изменение размера полости интерферометра можно достичь двумя способами: либо с помощью пьезоэлемента, расположенного непосредственно под зондом (предназначен для работы АСМ в динамических режимах [3]), либо в процессе сканирования, когда острие зонда АСМ находится в контакте с поверхностью образца. В процессе калибровки оптической системы зонд не взаимодействует с поверхностью и изменение размеров полости интерферометра осуществляется с помощью пьезоэлемента.

Типичный вид интерферограммы, получаемой при калибровке оптической системы, представлен на рис. 2, а. По оси абсцисс откладывается подаваемое на пьезоэлемент напряжение  $V$ , вследствие чего он меняет свои размеры  $dX$  и двигает зонд по направлению к оптоволокну. По оси ординат откладывается уровень сигнала с выхода интерферометра  $dV$ . Расстояние между максимумами на интерферограмме соответствует половине длины волны ( $\lambda/2$ ) полупроводникового лазера оптической системы регистрации. Уровень сигнала  $dV$  по оси ординат можно пересчитать в величину смещения острия зонда  $dZ$  по следующей формуле:

$$dZ = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \frac{dV}{\Delta V},$$

где  $\Delta V$  — разность между максимальным и минимальным пропусканием интерферометра (см. рис. 2, а).

Регистрация кривых подвода-отвода для измерения механических свойств образца осуществляется следующим образом: образец 1 закрепляется на пьезосканере 2 АСМ (см. рис. 1, а), пьезосканер выдвигается к зонду 3-4, при контакте острия зонда 3 с поверхностью образца 1 на зонд начинают действовать силы упругости; это приводит

к изгибу балки зонда 4 и соответствующему изменению полости интерферометра. Характерный вид полученной таким образом кривой подвода приведен на рис. 2, б. По оси абсцисс на ней откладывается выдвигание пьезосканера  $dZ$ , по оси ординат — пропускание интерферометра (уровень сигнала)  $dV$ . Участок I соответствует ситуации, когда зонд не взаимодействует с поверхностью образца и сигнал с интерферометра максимальный; участок II характеризует изменение изгиба балки вследствие действия на зонд сил Ван-дер-Ваальса; участок III отражает контактный режим взаимодействия, когда острие зонда находится в контакте с поверхностью образца и изгиб балки уравнивает силы упругости, действующие со стороны образца на зонд. Именно этот участок III используется для расчета модуля Юнга образца.

В качестве сравнения на рис. 2, d приведен вид кривой подвода зонда к измеряемому образцу (кривая 2) для случая использования стандартной системы регистрации положения острия зонда. Такая система построена по принципу регистрации положения отраженного от зонда лазерного луча на четырехсекционном фотодетекторе (рис. 1, б). Луч, отраженный от неизогнутой балки, попадает в середину фотодетектора. При деформации балки зонда происходит смещение луча [3]. Следует отметить, что интерферометрические оптические системы обеспечивают большую точность измерений по сравнению с системами, использующими четырехсекционный фотодетектор. Так, точность измерения амплитуды колебаний зонда в динамических режимах сканирования может превышать  $160 \text{ фм}/(\text{Гц})^{1/2}$  [4].

Согласно предлагаемой нами методике, для определения модуля Юнга используется участок кривой подвода, который соответствует контактному режиму взаимодействия зонд — поверхность (участок III на рис. 2, б). Острие зонда моделируется полусферой, радиус которой равен радиусу кривизны острия зонда, а образец — бесконечной полуплоскостью. Острие зонда вдавливаются в поверхность образца. Экспериментально измеренная величина вдавливания используется для решения задачи Герца [5]. Ре-

шение указанной задачи определяет зависимость силы  $F$ , действующей со стороны образца на зонд, от величины вдавливания  $\delta$  зонда в поверхность образца. Данная зависимость выражается формулой

$$F = \delta^{3/2} \frac{2\pi}{3} \frac{E}{1-\mu^2} R^{1/2}, \quad (1)$$

где  $E$  – модуль Юнга,  $R$  – радиус кривизны острия зонда ( $R = 10$  нм),  $\mu$  – коэффициент Пуассона (для биологических объектов принято считать  $\mu = 0,5$ ).

Корректное использование модели Герца возможно лишь в том случае, если величина вдавливания зонда в поверхность образца много меньше радиуса кривизны острия зонда (в нашей работе она меньше 10 нм и условие выполнено). Это условие

ставится в теории упругости для того, чтобы исключить возникновение пластических деформаций в образце.

Основная трудность, возникающая при наших измерениях зависимости силы  $F$  от величины вдавливания  $\delta$  (для определения модуля Юнга), заключается в определении точки контакта зонда с поверхностью образца на кривой подвода. Мы разработали следующую процедуру определения указанной точки. В контактном режиме сканирования за точку контакта  $dV_{av}$  принимается уровень сигнала с выхода интерферометра, соответствующий величине, средней между максимальным и минимальным значениями пропускания интерферометра  $dV_{av} = \Delta V/2$  (см. рис. 2, а). Другими словами, когда зонд не взаимодействует с поверхно-

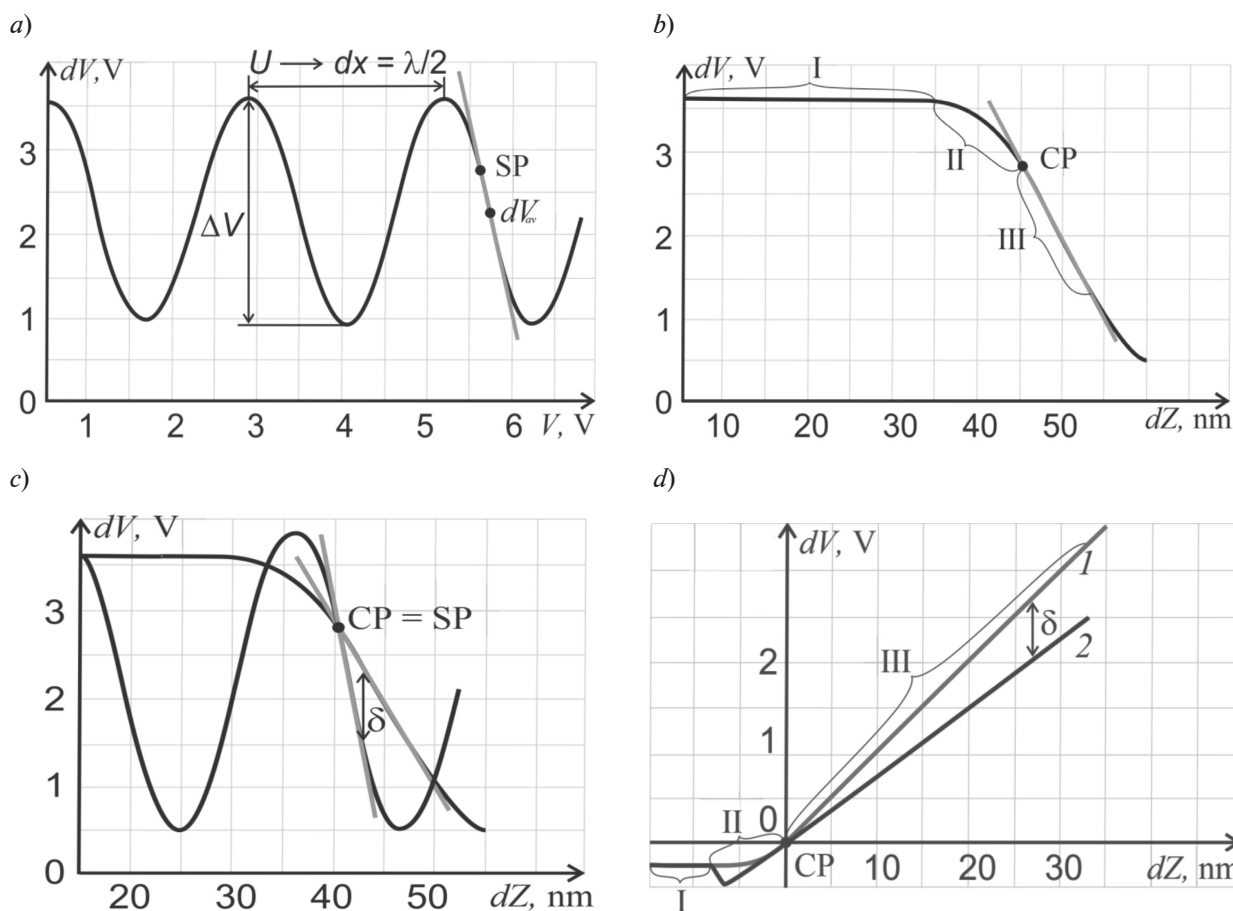


Рис. 2. Определение величины вдавливания зонда в поверхность образца (см. схему на рис. 1, а): а – калибровочная интерферограмма, б – характерный вид кривой подвода зонда к образцу, с – совмещение обеих кривых; д – кривые подвода для стандартной системы регистрации (см. рис. 1, б)

стью образца, оптическая система настраивается таким образом, что пропускание интерферометра максимально (участок I на рис. 2, *b*); при подведении зонда к поверхности образца пьезосканер выдвигается до тех пор, пока сигнал с интерферометра не упадет до величины  $dV_{av}$ . Участок в окрестности этой точки контакта является линейным в силу свойств интерферометра Фабри – Перо и соответствует его максимальной чувствительности. Мы аппроксимировали этот участок в окрестности рабочей точки контактного режима линией, а точку контакта зонда (CP (contact point) на рис. 2, *b*) с поверхностью образца определяли как точку, в которой линия кривой подвода расходитсся с аппроксимирующей прямой.

Для определения величины  $\delta$  использовалась калибровочная интерферограмма (см. рис. 2, *a*). Участок в окрестности точки  $dV_{av}$  аппроксимировали прямой. По отрыву прямой от интерферограммы определялась реперная точка SP (set point), которая затем совмещалась с точкой контакта CP на кривой подвода-отвода (рис. 2, *c*). Величину  $\delta$  находили как разность между значениями  $dV$  для прямых, аппроксимирующих линейные участки (см. графики на рис. 2, *a* и *b*), при значениях  $dZ$ , соответствующих точке контакта (CP) и больших.

Мы считаем, что данная процедура определения величины вдавливания зонда в поверхность образца аналогична таковой для систем, в которых используется четырехсекционный фотодетектор (см. рис. 1, *b*). В таких системах величина вдавливания вычисляется как разность  $\delta$  между соответствующими значениями на кривых подвода, полученных на тестовом и на исследуемом образцах (соответственно кривые 1 и 2 на рис. 2, *d*). Эту методику можно применять и для определения жесткости балки зонда. Константа упругости тестового образца намного превосходит по величине соответствующую константу балки зонда. В этом случае зонд не будет продавливать в контактном режиме поверхность образца и кривая 1 может служить для определения константы упругости балки зонда. Разница между кривыми подвода, полученными на тестовом и на исследуемом образцах при

значениях  $dZ$ , начиная от точки контакта и больших, принимается за величину вдавливания  $\delta$ . По аналогии, разница между линейными участками в окрестности  $dV_{av}$  на калибровочной интерферограмме и на кривой подвода в системах с интерферометром принимается за величину вдавливания  $\delta$  (см. рис. 2, *c*).

По измеренным кривым подвода мы определяли силу, действующую на зонд со стороны поверхности образца, как произведение константы жесткости  $k$  балки зонда на величину выдвигания пьезосканера  $dZ$  (величина отложена на оси абсцисс рис. 2, *b*). Далее, для определения модуля Юнга образца строились зависимости  $F(\delta)$ . Полученные экспериментальные точки затем аппроксимировали зависимостью, выраженной формулой (1); для этого использовался метод наименьших квадратов, где в качестве параметра подгонки выступал модуль Юнга  $E$ . Результаты проведенного регрессионного анализа для отдельной кривой подвода приведены на рис. 3, *b*.

Одной из основных проблем при решении контактной задачи в исследованиях температурной зависимости модуля Юнга является корректное определение константы  $k$ . Последняя используется при расчете силы  $F$ , действующей со стороны образца на острие зонда в контактном режиме. Трудность заключается в том, что константа жесткости балки зонда зависит от температуры. Поэтому константу  $k$  необходимо находить для каждой температурной точки перед тем как решать задачу Герца. Для определения константы жесткости балки зонда мы использовали метод Садера [6]. Он позволяет связать константу нормальной жесткости гибкой консоли со спектром ее тепловых колебаний в среде с известными значениями вязкости и плотности. Для константы  $k$  измеряли спектр тепловых колебаний консоли зонда (краткое название – термопик) (рис. 3, *a*). Форма полученного спектра аппроксимировалась следующей функцией:

$$R(\omega) = \frac{A_0 \omega^4}{(\omega^2 - \omega_r^2)^2 + \frac{\omega^2 \omega_r^2}{Q^2}}, \quad (2)$$

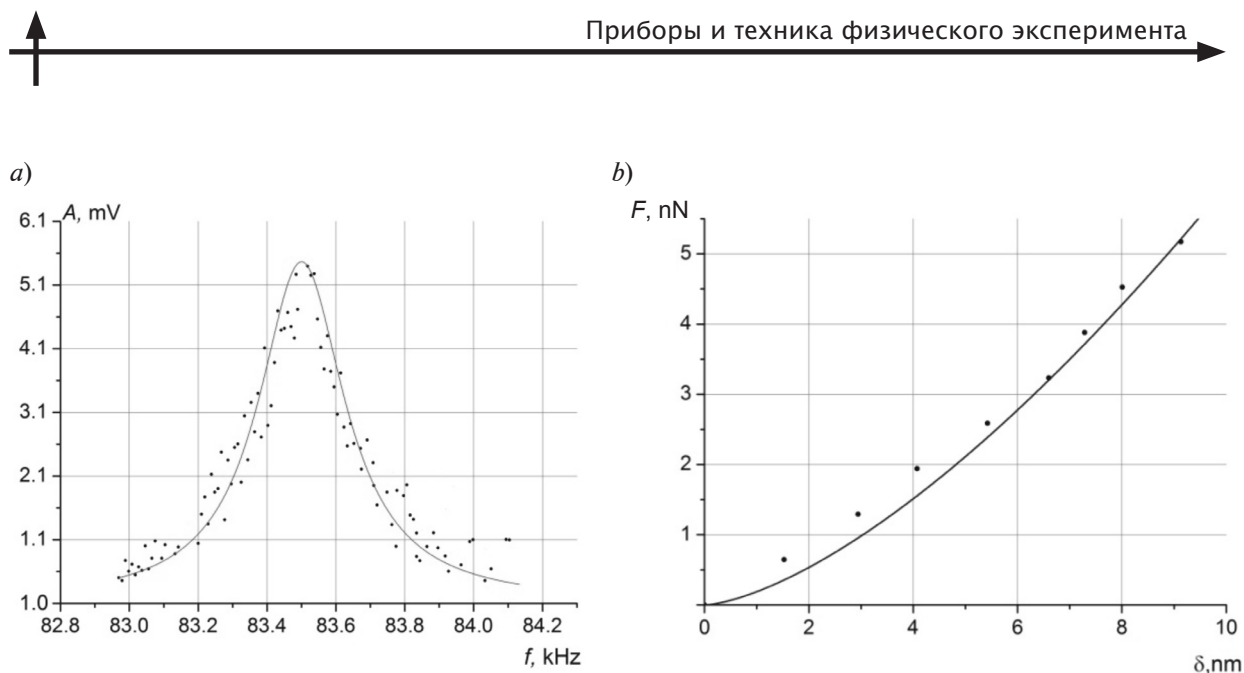


Рис. 3. Экспериментальные данные (точки) и их аппроксимации (линии) для определения модуля Юнга исследуемого образца: *a* – спектр тепловых колебаний балки зонда; *b* – зависимость силы  $F$ , действующей на зонд со стороны образца, от величины  $\delta$  (глубина вдавливания зонда в поверхность образца).

Представлены результаты аппроксимаций по формулам (2) и регрессионного анализа кривой подвода по формуле (1) (соответственно *a* и *b*)

где  $Q$  – добротность,  $\omega_r$  – резонансная частота свободных колебаний зонда,  $A_0$  – амплитуда пика.

Эти подгоночные параметры затем использовались при расчете константы жесткости по формуле

$$k = 0,1906\rho b^2 L Q \omega_r^2 \Gamma(\omega, \rho, \eta, b),$$

где  $\rho, \eta$  – плотность и вязкость среды;  $b, L$  – ширина и длина кантилевера;  $Q$  – добротность его колебаний;  $\omega_r$  – частота первого резонансного пика;  $\Gamma$  – мнимая компонента гидродинамической функции.

### Результаты и их обсуждение

Механические свойства полилизина изучались на криогенном атомно-силовом микроскопе AttoAFM I (Attocube Systems, Германия). Для измерений были выбраны зонды NSC15 (MMAsh, Болгария) с жесткостью балки, лежащей в диапазоне 20 – 75 Н/м, и резонансной частотой 265 – 400 кГц. Использовались предметные стекла с нанесенным слоем поли-*L*-лизина толщиной 1 мкм (Yancheng Huida Medical Instruments CO, LTD, Китай).

Мы измеряли топографию поверхности образца на участке размером 15 × 15

мкм в диапазоне температур от 60 до 300 К, с шагом 30 К. На выбранной области выбирали 16 точек таким образом, чтобы расстояние между ними было не менее 1 мкм. В каждой из точек измеряли кривые подвода. Затем для каждой кривой подвода определяли модуль Юнга по описанной выше методике. Найденные значения модуля Юнга усреднялись по 16 кривым подвода. Характерный вид полученной топогра-

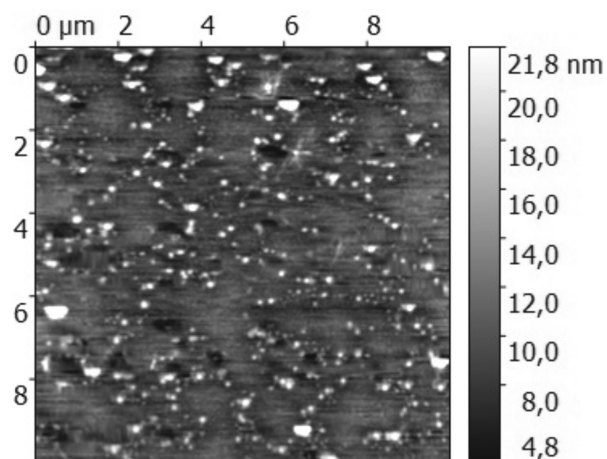


Рис. 4. Топография поверхности полилизина, полученная методом АСМ

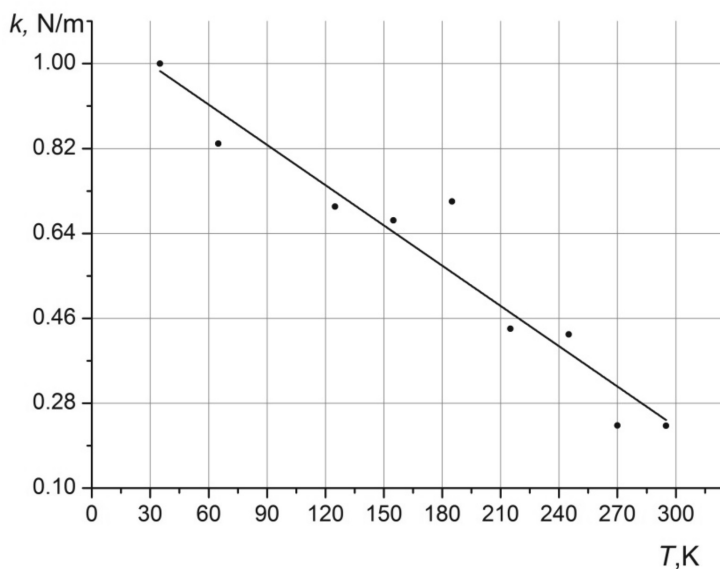


Рис. 5. Экспериментальная температурная зависимость константы жесткости балки зонда (точки) и ее аппроксимация (прямая линия)

фии поверхности полилизина приведен на рис. 4. Анализ результатов позволил заключить, что его поверхность — относительно гладкая, с небольшими круглыми включениями. Средняя шероховатость поверхности, определенная на участке  $15 \times 15$  мкм, составляет 1,75 нм.

Зависимость константы жесткости балки зонда от температуры, рассчитанная по методу Садера, представлена на рис. 5. Как

следует из полученных данных, указанная константа линейно растет с уменьшением температуры, а при температуре 5 К ее значение примерно в 6 – 7 раз выше соответствующего значения при комнатной температуре.

Экспериментальные зависимости силы  $F$ , действующей на зонд со стороны образца, от величины  $\delta$  для разных температур представлены на рис. 6, а.

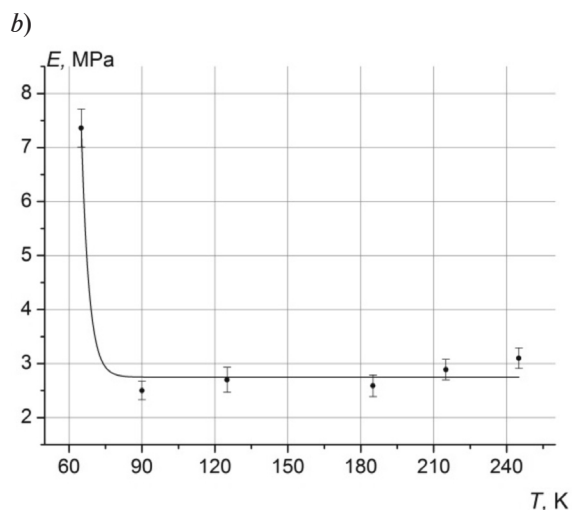
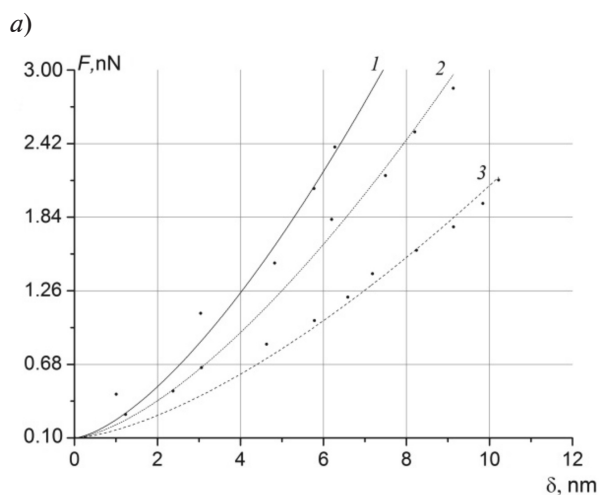


Рис. 6. Получение температурной зависимости модуля Юнга для полилизина: а — график зависимости  $F(\delta)$  при температурах 125 К (1), 215 К (2), 245 К (3); б — итоговая зависимость модуля Юнга от температуры, учитывающая температурную зависимость константы жесткости балки зонда

Таблица

Зависимость модуля Юнга полилизина от температуры

Температура, К	Модуль Юнга, МПа	
	С учетом $k(T)$	Без учета $k(T)$
65	$68,40 \pm 0,23$	$7,36 \pm 0,35$
90	$17,09 \pm 2,07$	$2,50 \pm 0,17$
125	$18,96 \pm 1,90$	$2,70 \pm 0,23$
185	$12,03 \pm 2,38$	$2,59 \pm 0,20$
215	$8,39 \pm 1,75$	$2,89 \pm 0,19$
245	$7,76 \pm 0,46$	$3,10 \pm 0,19$

Примечание.  $k(T)$  – температурная зависимость константы жесткости балки зонда АСМ

Для полученных экспериментальных зависимостей из решения задачи Герца были найдены модули Юнга полилизина в заданном диапазоне температур; при этом учитывалась температурная зависимость константы жесткости балки зонда АСМ (см. рис. 5). Для сравнения в таблице приведены значения модуля Юнга, вычисленные без ее учета. Установлено, что в диапазоне температур 90 – 295 К модуль Юнга полилизина плавно растет при снижении температуры (рис. 6, *b*). Согласно полученным результатам, значения модуля Юнга полилизина при  $T = 90$  К в 2,5 раза превосходят соответствующие значения для комнатных температур. Ниже 90 К модуль Юнга полилизина скачкообразно (в 7 раз) увеличивается, по сравнению со значениями, полученными для комнатных температур. Наблюдаемое различие, а именно резкий скачок на температурной зависимости упругих свойств полилизина при температуре около 80 К, обусловлено, скорее всего, структурной модификацией полимера при данных условиях.

### Заключение

Таким образом, нами разработана методика определения модуля Юнга поверхности образцов, при которой используется АСМ с оптической системой регистрации положения зонда, организованной по интерферометрическому принципу. Получена температурная зависимость константы жесткости балки зонда АСМ в диапазоне от 30 до 295 К. Предложенная методика использована для определения температурной зависимости модуля Юнга полилизина, при этом учитывалось изменение упругих свойств зонда АСМ в температурном диапазоне от 60 до 295 К.

Выдвинутая методика открывает новые возможности для изучения различных объектов, в том числе биологических. Ближайшая задача – использовать новую методику для изучения механических свойств клеточных мембран.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК 7005.2016.8.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Zhmakin A.I. Fundamentals of cryobiology // Physical Phenomena and mathematical models. Springer, 2009.
- [2] Белоус А.М. Кробиология. Киев: Наукова думка, 1994. 431 с.
- [3] Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Нижний Новгород: Изд. Института физики микроструктур РАН, 2004. 114 с.
- [4] Rugar D., Mamin H.J., Erlandsson R., Stern J.E., Terris B.D. Force microscope using a fiber-optic displacement sensor // Rev. Sci. Instrum. 1988. Vol. 59. No. 11. Pp. 2337–2340.
- [5] Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теория упругости. М.: Наука, 1987.
- [6] Sader J.E., Chon J.W.M., Mulvaney P. AFM cantilevers and force measurements // Rev. Sci. Instrum. 1999. Vol. 70. No. 10. Pp. 3967–3969.



### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**КРЫМСКАЯ Ксения Игоревна** – студентка Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
ksenia.krymskaya@gmail.com

**АНДРЕЕВА Наталья Владимировна** – кандидат физико-математических наук, научный сотрудник кафедры физической электроники Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
nvandr@gmail.com

**ФИЛИМОНОВ Алексей Владимирович** – доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой физической электроники Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
filimonov@rphf.spbstu.ru

---

### *Krymskaya K.I., Andreeva N.V., Filimonov A.V.* A TECHNIQUE FOR DETERMINING THE YOUNG'S MODULUS OF BIOLOGICAL OBJECTS USING ATOMIC-FORCE MICROSCOPY IN THE WIDE TEMPERATURE RANGE BELOW RT.

In the paper, we suggest widening the scope of the cryogenic atomic-force microscopy in order to determine the Young's modulus of biological objects over a temperature range stretching from 30 to 300 K. A new technique assumes some modification of the arrangement for the optical system recording the probe position in the cryogenic atomic-force microscope and making measurements of approach and retraction force-distance curves under these conditions. The Young's modulus is determined from the obtained data by the calculation taking into account the temperature dependence of a cantilever spring constant. As an example we have obtained a temperature dependence of the Young's modulus for polylysine in the temperature range stretching from 60 to 300 K (RT) using the proposed technique.

CRYOGENIC ATOMIC-FORCE MICROSCOPY, FORCE-DISTANCE CURVE, YOUNG'S MODULUS.

### REFERENCES

[1] **A.I. Zhmakin**, Fundamentals of cryobiology, Physical Phenomena and mathematical models, Springer, 2009.

[2] **A.M. Belous**, Kriobiologiya [Cryobiology], Kiev, Naukova dumka, 1994.

[3] **V.L. Mironov**, Osnovy skaniruyushchey zondovoy mikroskopii [Fundamentals of scanning probe microscopy], Nizhniy Novgorod, Institut fiziki mikrostruktur of RAS, 2004.

[4] **D. Rugar, H.J. Mamin, R. Erlandsson, J.E. Stern, B.D. Terris**, Force microscope using a fiber-optic displacement sensor, Rev. Sci. Instrum. 59 (11) (1988) 2337–2340.

[5] **L.D. Landau, E.M. Lifshits**, Teoriya uprugosti [Theory of elasticity], Moscow, Nauka, 1987.

[6] **J.E. Sader, J.W.M. Chon, P. Mulvaney**, AFM cantilevers and force measurements, Rev. Sci. Instrum. 70 (10) (1999) 3967–3969.

### THE AUTHORS

**KRYMSKAYA Kseniya I.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation  
ksenia.krymskaya@gmail.com

**ANDREEVA Nataliya V.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation  
nvandr@gmail.com

**FILIMONOV Aleksey V.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*

29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation

filimonov@rphf.spbstu.ru