

ОТЧЕТ по ТЕМЕ

«Современные тенденции и разработки в области Рамановской микроспектроскопии и фотолюминесценции для исследований конденсированных сред»

Руководители темы: Г.М. Арзуманян, Н. Кучерка

Шифр темы: 04-4-1133-2018/2020

Лаборатория: Лаборатория нейтронной физики им. Франка

Подразделение: Сектор рамановской спектроскопии

Руководители темы: Г.М. Арзуманян, Н. Кучерка

СОДЕРЖАНИЕ

- 1. Введение в спонтанную и усиленную рамановскую спектроскопию**
- 2. Научно-исследовательская работа за период 2018-2020 гг.**
- 3. Студенческая программа**
- 4. Международное сотрудничество, гранты Полномочных представителей и премия ЛНФ**
- 5. Основные публикации и участия в конференциях**

Научная деятельность в период 2018–2020 гг. осуществлялись в соответствии с основными этапами и задачами, перечисленными в теме «Современные тенденции и разработки в рамановской микроспектроскопии и фотолюминесценции для исследований конденсированных сред», включенной в тематический план ОИЯИ.

1. Введение в спонтанную и усиленную рамановскую спектроскопию

Рамановская спектроскопия - это спектроскопический метод, используемый в физике и химии конденсированных сред для изучения колебательных, вращательных и других низкочастотных колебаний в системе. Оно основано на неупругом рассеянии или комбинационного рассеяния монохроматического света, обычно от лазера в видимом, ближнем инфракрасном или ближнем ультрафиолетовом диапазоне электромагнитных спектров.

В течение многих лет спектроскопия комбинационного рассеяния признана мощным инструментом для различных применений, в том числе, биоаналитических и биомедицинских. Спектры комбинационного рассеяния регистрируют молекулярные колебания, которые обеспечивают высокоспецифичный отпечаток молекулярной структуры и биохимического состава тканей без внешних маркеров. Известно, что болезни и другие патологические отклонения приводят к химическим и структурным изменениям на молекулярном уровне, которые приводят к изменениям колебательных спектров, и, которые, могут использоваться в качестве чувствительных, фенотипических маркеров заболевания. Поскольку эти спектральные изменения очень специфичны и уникальны, их также называют отпечатками пальцев. Преимущества методов заключаются в том, что они являются неразрушающими и не требуют внешних усиливающих контраст маркеров.

С другой стороны, этот метод имеет одно существенное ограничение - низкую уровень сигнала, что ограничивает его практическое применение. Причиной этого ограничения является то, что только один фотон из 10^6 – 10^8 фотонов падающего света рассеивается. Однако, в настоящее время существуют эффективные способы преодоления этого ограничения, такие как ГКР (гигантское комбинационное рассеяние), КАРС (когерентное антистоксовое рассеяние света), их комбинация – ГКАРС (SECARS), ВКР (вынужденное комбинационное рассеяние), TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy) и др.

Научно-исследовательская деятельность в 2018-2020 гг. была в основном направлена на дальнейшее развитие ГКР и КАРС спектроскопии с тем, чтобы достичь более высоких уровней чувствительности в регистрации спектров и контрастности изображений и, в конечном итоге, их объединение как современного и недостаточно изученного спектроскопического метода.

2. Научно-исследовательская работа за период 2018-2020 гг.

Ожидаемые основные результаты по завершении темы:

- **Завершение модернизации оптической платформы под ультрачувствительную спектроскопию ГКАРС (SECARS).**
- **Тестирование и выбор наиболее оптимальных и эффективных ГКР-активных подложек для поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии.**

- **Систематические эксперименты по ГКАРС спектроскопии и построение спектральных карт интенсивности сигнала с пикосекундным возбуждением.**
- **Регистрация экстремально низких концентраций органических молекул методами ГКР и ГКАРС.**
- **Синтез и исследование структурно-спектральных характеристик ап-конверсионных люминофоров на основе наночастиц «ядро-оболочка» с различными редкоземельными элементами в ядре, и их биомедицинское тестирование.**
- **Реализация контрастной и селективной визуализации модельных образцов методами рамановской спектроскопии и ап-конверсионной люминесценции.**

2.1 ГКР спектроскопия

2.1.1. Тестирование ГКР-активных подложек различной конфигурации с целью выявления наиболее оптимальных для эффективной ГКАРС спектроскопии.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяние (ГКР) является аналитическим методом в биомедицине, экологическом мониторинге, судебной медицине и многих других областях человеческой жизнедеятельности, что позволяет получать информацию о различных соединениях при очень низких концентрациях. Высокая чувствительность этого метода обеспечивается за счет использования наноструктурированных металлических поверхностей для адсорбции на них анализируемых молекул – так называемых ГКР-активных подложек. Эффективность ГКР сильно зависит от природы самого металла, а также шероховатости поверхности. Поэтому разработка и изготовление ГКР-активной подложки является очень важной составляющей в работах по спектроскопии ГКР. Двумя наиболее распространенными ГКР-активными подложками являются коллоиды металлов Au, Ag и Cu, полученные химическим восстановлением, и поверхности металлических электродов, шероховатые одним или несколькими циклами электрохимического окисления - восстановления. Развитие нанотехнологий содействовало изготовлению различных наноструктур начиная от наночастиц до нанопроволочек, которые можно использовать в качестве ГКР-активных элементов.

В течении 2018-2019 гг. были апробированы достаточно много ГКР-активных подложек различных конфигураций. В частности, были исследованы подложки, разработанные и изготовленные в Республике Беларусь (BelSERS), Литве (ATO ID), Австралии (Flew Solutions) и России (ИТПЭ РАН, Москва) и некоторые другие. При выборе подложек мы исходили, прежде всего, из их плазмонно-спектральных характеристик, адаптированных к работе в ближней ИК-области. Это, в свою очередь, было связано с тем, что для генерации КАРС сигнала в нашем рамановском микроспектрометре используются лазеры, работающие в ИК спектральном диапазоне

Основные характеристики апробированных ГКР-активных подложек:

1. Подложки «BelSERS» (Рис.1), Беларусь, БГУИР

- материал подложки: стеклянная подложка с ГКР-активной зоной (35 или 50 мм²), состоящей из Ag или Au хаотически расположенных наночастиц или дендридов
- пределы регистрации: 10⁻³ – 10⁻¹³ М
- длины волн возбуждения: видимый, ИК
- пробоподготовка: капельная или иммерсионная
- срок годности: 6 месяцев
- хранение: вакуум, воздух



Рис.1. Внешний вид ГКР-подложек «BelSERS»

2. Подложки «MATO» и «RANDA» (Рис.2), Литва, ATO ID

- материал подложек: содово-известковое стекло с активной зоной размерами 5x5 мм: Au для MATO и Ag для RANDA
- пределы регистрации: 10⁻² – 10⁽⁻¹⁰⁻¹²⁾ М
- длины волн возбуждения: от 600 нм до ближнего ИК (MATO), от 440 нм до ближнего ИК (RANDA)
- срок годности: 2 месяца
- хранение: вакуум

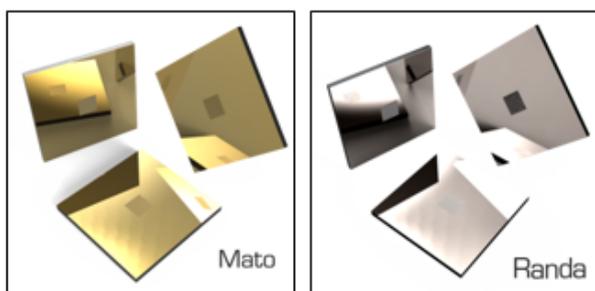


Рис.2. Внешний вид ГКР-подложек «MATO» и «RANDA»

3. Подложки «FLEW SERS» (Рис.3), Австралия, FLEW Solution

- материал подложек: стеклянная подложка с ГКР-активной зоной (12.6 мм²) состоящей из наноструктурированной Cu (CuO) и покрытой Au
- пределы регистрации: ppm/микромол. (μМ)
- длина волны возбуждения (рекомендуемая): 785 нм
- пробоподготовка: капельная или иммерсионная
- срок годности: 6 месяцев
- хранение: азот, вакуум, воздух

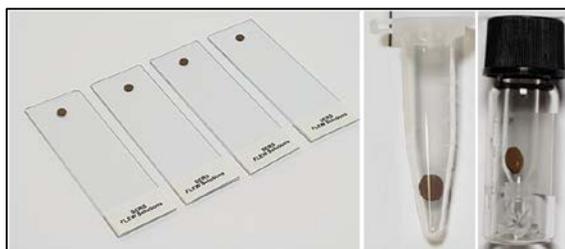


Рис.3. ГКР-подложки «FLEW SERS»

Результаты сравнительных ГКР-измерений представлены на рис.4 (возбуждение 633 нм) и рис.5 (возбуждение 785 нм). В качестве модельного аналита использовались растворы молекулы DTNB (кислота) различной концентрации.

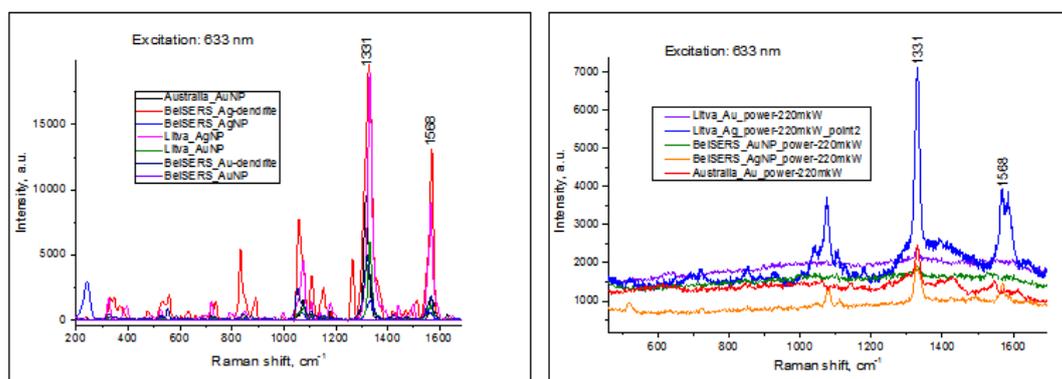


Рис.4. ГКР-спектры DTNB при концентрациях $10^{-5}M$ (слева) и $10^{-10}M$ (справа), возбуждение 633нм

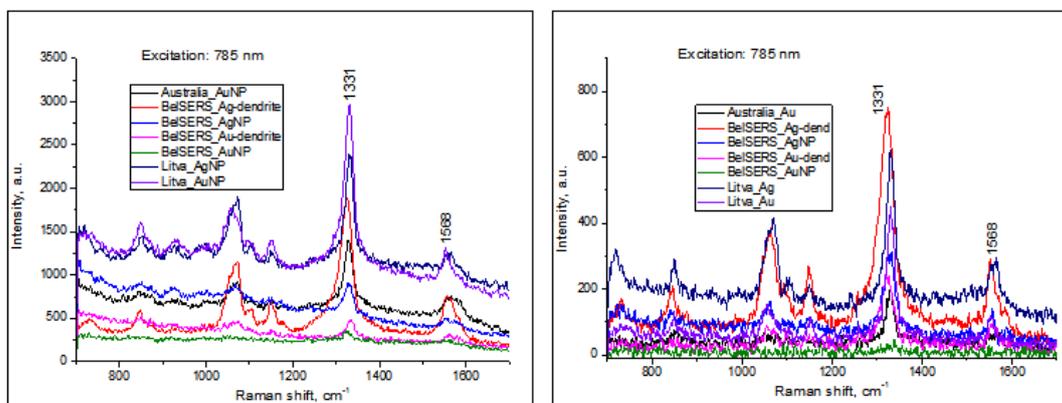


Рис.5. ГКР-спектры DTNB при концентрациях $10^{-5}M$ (слева) и $10^{-8}M$ (справа), возбуждение 785 нм

Из приведенных ГКР-спектров отчетливо видно, что ГКР-подложки «BeISERS» и «ATO ID» демонстрируют более высокую чувствительность по сравнению с австралийскими. Важно отметить, что, несмотря на то, что все эти подложки также ориентированы и на ГКР спектроскопию в области ИК-спектра, тем ни менее, наибольшая чувствительность была зарегистрирована при возбуждении красным лазером на длине волны 633 нм.

Вкратце резюмируя эту часть отчета, необходимо отметить, что накопленный опыт в апробировании различных ГКР-подложек, был важным шагом на пути к экспериментам ГКАРС (SECARS), описанным в следующей главе отчета.

2.1.2 Высокочувствительное детектирование рамановских спектров органических молекул (единицы молекул) с использованием дендритных серебряных наноструктур.

Разработка современных методов биосенсорики для решения проблемы надежного обнаружения, идентификации и структурного исследования разнообразных биоорганических молекул при сверхнизких концентрациях по-прежнему является актуальной задачей специалистов во многих областях, включая медицину, биологию, криминалистику, экологию, фармацевтику и т.д. В 2019 году мы использовали метод так называемого коррозионного осаждения серебра на матрице макропористого кремния (макро-PSi) для выращивания трехмерной серебряной дендритной структуры, которая продемонстрировала беспрецедентную чувствительность в ГКР-спектроскопии.

На рис. 6 показаны СЭМ-изображения поверхности и поперечные сечения образцов моно-Si и макро-PS, которые были обработаны в растворе соли AgNO_3 в течение 3 минут. Рассматривая осаждение Ag на поверхности моно-Si, подвергнутого ионному травлению, видно слой серебра, который состоит из наночастиц Ag различного диаметра и дендритов Ag (рис. 3а,с). Большинство наночастиц серебра имеет средний диаметр 100 нм, но есть также частицы большого диаметра, варьирующиеся в пределах от 500 до 2000 нм. Толщина слоя серебра составляет 300-500 нм, а частицы Ag имеют форму слегка сплюснутого шарика. Важно отметить, что дендриты Ag на моно-Si имеют гораздо менее развитую структуру по сравнению с дендритами Ag на макро-PS, и, кроме того, трудно отличить частицы Ag, из которых они состоят.

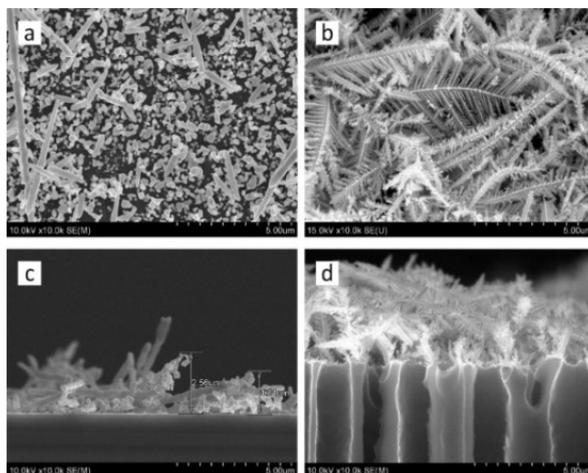


Рис. 6. СЭМ-изображения (a, b) сверху и (c, d) поперечных разрезов (a, c) моно-Si и (b, d) макро-PS с нанесенным слоем Ag

Как видно из рис. 6 b,d, на поверхности макро-PS сформирована развитая сеть Ag-NP и Ag-дендритов. Сложно корректно оценить плотность наночастиц серебра, образованных на поверхности скелета Si, так как они покрыты дендритами. Толщина дендритного слоя достаточно однородна (3-3,5 мкм). Как видно из поперечного сечения образца (рис. 6-d), внешняя поверхность макро-PS шероховата и на ней образуются Ag-NP и Ag-дендриты. Дендриты направлены как вертикально, так и продольно вдоль поверхности макро-PS. Длина центральных стволов продольных дендритов достигает 20-25 мкм, а боковых ветвей - около 3-7 мкм (рис.6-б). На боковых ветвях дендритов имеется большое количество дополнительных

побегов длиной 100-300 нм. Структура дендритов сильно развита, и все их элементы (центральный ствол и боковые ветви) состоят из хорошо различимых наночастиц серебра. Более того, из рис. 6-d ясно видно, что дендриты Ag образуются на острых участках шероховатой поверхности скелета Si. Преимущественно дендриты образуются на периферии входных отверстий пор, и их количество для одной поры составляет около 9-12 штук. Некоторые из дендритов расположены почти вертикально и имеют короткую длину порядка 1,0 - 2,5 мкм.

Лучшее понимание влияния морфологии на эффективность ГКР может быть получено с помощью компьютерного моделирования электрического поля в структурах серебра на моно- и макро-PSi. На рисунке 7 показаны примеры областей, выбранных для моделирования электрического поля в дендритах.

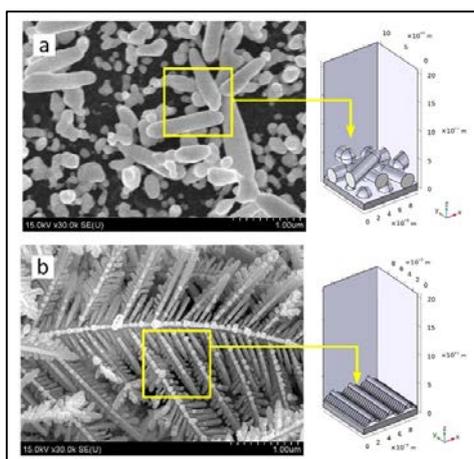


Рис. 7. Области, выбранные для моделирования напряженности электрического поля в дендритах серебра на (а) моно-Si и (б) макро-PSi

На рис. 8 показаны результаты моделирования, выполненного для изготовленных и экспериментально изученных Ag-дендритов на основе моно- и макро-PS. Моделирование показало, что максимальная напряженность электрического поля проявляется в структуре дендрита серебра на основе моно-Si. Тем не менее, есть только несколько таких горячих точек с большим усилением поля. Поэтому молекула, представляющая интерес в разбавленных растворах, будет взаимодействовать с такими горячими точками в редких случаях. С другой стороны, структуры дендрита серебра на основе PS имеют равномерно распределенные области с усилением электрического поля. Это электрическое поле имеет меньшую напряженность, но из-за большей эффективной площади вероятность обнаружения и, следовательно, общий сигнал будут лучше от таких структур, чем от дендритов на моно-Si.

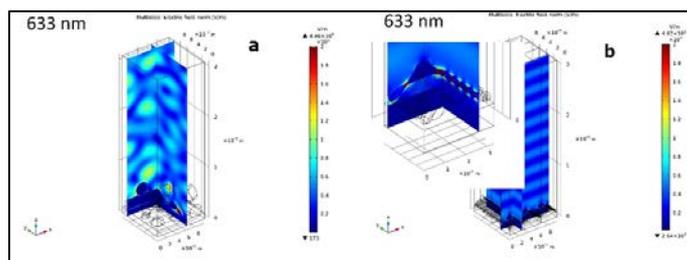


Рис. 8. Распределение напряженности электрического поля, смоделированное для серебряных дендритов на (а) моно-Si и (д) макро-PS

Что касается измерений ГКР спектров, мы выбрали кислоту 4-МВА в качестве вещества для анализа, поскольку этот анализ характеризуется меньшим поперечным сечением комбинационного рассеяния по сравнению с органическими красителями, которые чаще используются для оценки ГКР-активности. На рис. 9 приведены ГКР спектры молекул 4-МВА, нанесенных на наноструктуры Ag на подложках из моно-Si и макро-PS. Анализируемое вещество адсорбировалось методом погружения подложек в раствор 4-МВА с концентрацией 10^{-6} М в течение 1 ч с последующей сушкой при комнатной температуре. Возбуждение осуществлялось лазерным излучением на длинах волн 633 нм и 785 нм.

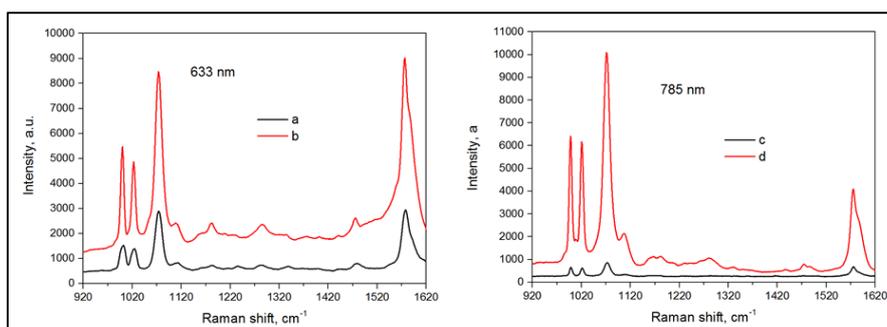


Рис. 9. ГКР спектры молекул 4-МВА с концентрацией 10^{-6} М, полученные на поверхности Ag: (а, с) моно-Si и (b, d) макро-PS, возбуждаемых лазерами на 633 и 785 нм

Далее мы выявили минимальную концентрацию раствора 4-МВА, при которой его молекулы все еще обнаруживаются после адсорбции на посеребренном макро-PS. На рис. 10 представлены ГКР спектры 4-МВА при концентрациях от 10^{-6} до 10^{-16} М, полученные путем сбора и интегрирования трех карт ГКР спектров при длине волны возбуждения 633 нм. Область сканирования составляла 100×100 мкм для каждой карты с шагом 10 мкм. Каждая точка на карте была облучена в течение 1с. Все информативные ГКР спектры характеризуются наличием линий 4-МВА. ГКР спектр 4-МВА, адсорбированного с концентрацией 10^{-6} М, является наиболее интенсивным. Снижение концентрации до 10^{-16} М приводило к постепенному снижению ГКР сигнала, но полосы на волновых числах 988, 1021, 1075 и 1573 см⁻¹ все еще остаются различимы.

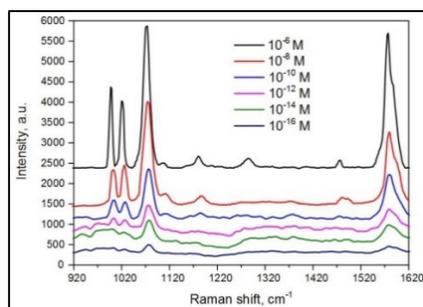


Рис. 10. Усредненные ГКР-спектры для трех карт Ag-дендритов/макро-PS, содержащихся в растворах 4-МВА с различными концентрациями. Длина волны возбуждения 633 нм

Подытоживая эту часть отчета, отметим следующее: изготовлены и исследованы трехмерные наноструктуры серебра, которые состоят из наночастиц Ag и сети Ag-дендритов, нанесенных на поверхность макро-PS. С использованием таких субстратов впервые удалось обнаружить молекулы 4-МВА с очень низкими концентрациями на уровне 10^{-16} М.

Мы также зарегистрировали ГКР-спектры молекул лактоферрина человека, адсорбированных на посеребренном пористом кремнии (por-Si) из растворов 10^{-6} – 10^{-18} М. ГКР-спектры лактоферрина, адсорбированного из 10^{-6} М раствора, были довольно слабыми, но снижение концентрации до 10^{-10} М приводило к огромному росту ГКР-сигнала. Такой эффект происходит в результате расщепления олигомеров лактоферрина до мономерных звеньев при уменьшении его концентрации. Олигомеры слишком велики для равномерного перекрытия электромагнитным полем частиц серебра. Они не могут обеспечить интенсивный сигнал ГКР от верхней части молекул в отличие от мономеров, которые могут быть полностью покрыты электромагнитным полем. ГКР-спектры лактоферрина при концентрациях 10^{-14} и 10^{-16} М были менее интенсивными и начали изменяться из-за увеличения вклада молекул, выжженных лазером. Для предотвращения перегрева молекул анализируемого вещества они были защищены графеном (рис. 11), что позволило обнаружить адсорбированный лактоферрин из раствора 10^{-18} М.

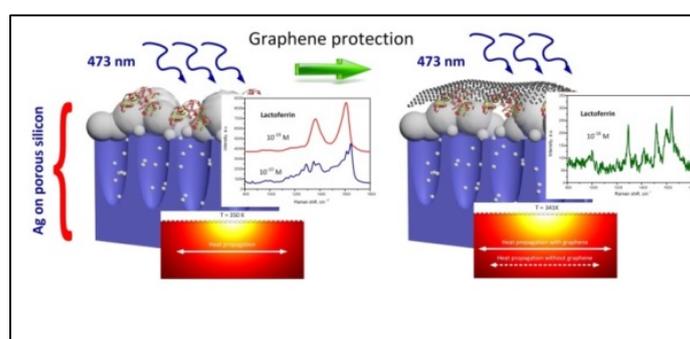


Рис. 11. Схематическое изображение защиты молекул аналита на посеребренном пор-Si с помощью графена

Первоначально, ГКР-измерения лактоферрина были нацелены на выявление возможности регистрации спектров с посеребренной подложки por-Si без изменений, вызванных взаимодействием биоорганической молекулы с металлическими частицами, а также денатурацией при лазерном облучении. Далее мы выявили минимальную концентрацию раствора лактоферрина, при которой его молекулы все еще обнаруживаются после адсорбции на посеребренном por-Si. На рисунке 12 представлены ГКР-спектры лактоферрина при концентрациях от 10^{-6} до 10^{-18} М, полученные путем сбора и интеграции карт ГКР-спектров.

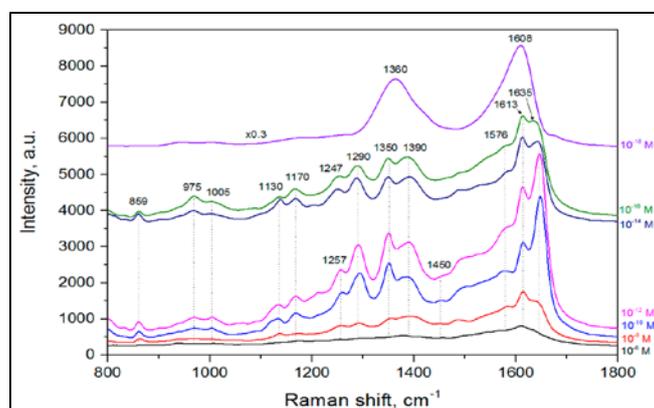


Рис. 12. ГКР-спектры молекул лактоферрина, адсорбированных на посеребренном por-Si

Мы использовали две ГКР-активные подложки из разных партий и отсканировали площадь поверхности 10x10 мкм обеих подложек с шагом в 1 мкм. Время экспозиции для каждой точки составляло 2 с. Мощность лазера была уменьшена до 0,14 мВт в отличие от предыдущих измерений, чтобы устранить негативный фототермический эффект. Все информативные ГКР-спектры характеризуются наличием полос этого анализатора.

Чтобы преодолеть ограничение по концентрации лактоферрина 10^{-16} М, при которой его все еще можно обнаружить, мы использовали защиту графеном, которая вначале была успешно протестирована на молекулах красителя R6G. На рис.13 показан ГКР спектр, полученный для молекул лактоферрина, адсорбированных из раствора аттомолярной концентрации на посеребренном *por-Si* и затем покрытых графеном. Спектры регистрировались в течение 2 с.

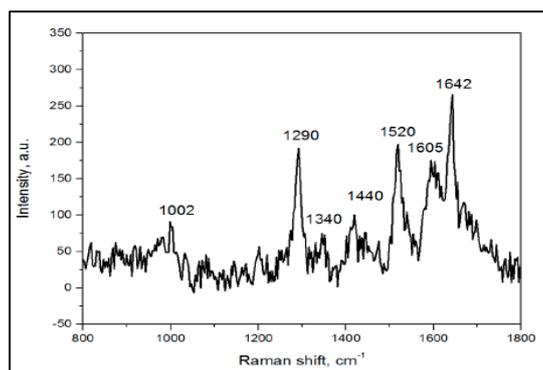


Рис. 13. ГКР-спектр молекул лактоферрина, адсорбированных на посеребренном *por-Si* из 10^{-18} М раствора и дополнительно защищенных графеном

Несмотря на то, что интенсивность ГКР-спектра была относительно низкой, большинство рамановских линий лактоферрина в спектре присутствовали: 1002 см^{-1} (Phe), 1290 см^{-1} (амид III), 1340 см^{-1} (Trp), 1440 см^{-1} (CH_2), 1605 см^{-1} (Tyr) и 1642 см^{-1} (Амид I). Таким образом, мы продемонстрировали возможность измерять ГКР-спектры молекул лактоферрина человека, адсорбированных на посеребренном *por-Si* из 10^{-6} – 10^{-18} М водных растворов.

2.1.3 Модернизация программы КАРС микроспектрометра

В 2019 году мы продолжили работы по завершению разработки модальности «сканируемый-КАРС», начатой в 2018 году, основанной на следующем техническом задании:

Инициализация модуля:

- а) запрос стартового значения длины волны накачки - $\lambda_{\text{нак.S}}$ (диалоговое окно);
- б) запрос конечного значения длины волны накачки – $\lambda_{\text{нак.F}}$ (диалоговое окно);
- в) задать шаг по длине волны (диалоговое окно):
минимальный шаг – 0.1 нм, максимальный шаг – 1/10 ($\lambda_{\text{нак.F}} - \lambda_{\text{нак.S}}$);
- г) контроль времени накопления КАРС-сигнала в каждой спектральной точке (диалоговое окно);
- д) радиокнопки: закрытие/открытие 2-х затворов (Стоксовой волны и ОПО при перестройке длине волны и стабилизации температуры);
- е) перед отправкой на исполнение – предупреждение о расчетной

- продолжительности времени записи;
- ж) формирование графического окна вывода КАРС спектра в режиме реального времени – по стандартам «NanoSP»;
- з) запуск на исполнение;
- и) по окончании сканирования открывается диалоговое окно: сохранение/стирание КАРС-спектра. Новый спектр/выход.

В течение 2019 года мы тестировали данный программный модуль на различных образцах. В качестве одного примера на рис.14 представлен скан-КАРС спектр в интервале 1620 – 1540 cm^{-1} для полистироловых шариков.

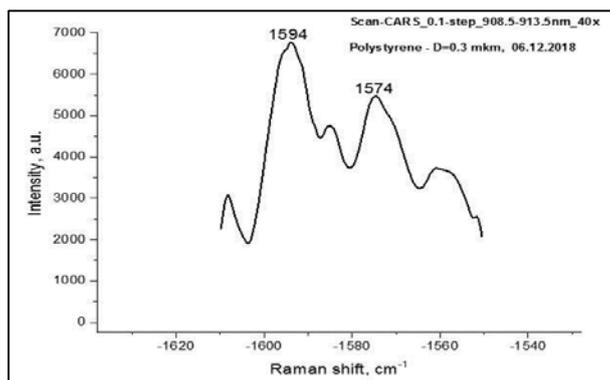


Рис. 14. Скан-КАРС спектр полистироловых шариков в интервале 1620 – 1540 cm^{-1}

Эта модальность выводит микроспектрометр «КАРС» на передовой край для экспериментов с многоволновым возбуждением, таких как «скан-КАРС» и др.

2.1.4 Изучение и сравнение спектров ГКР и ГКАРС, а также карт интенсивности сигнала, рассеянного от органических молекул анализата. Реализация метода контрастной и селективной визуализации в ГКАРС модальности.

В настоящее время исследования в области ГКР посвящены, среди прочего, выяснению физических механизмов взаимодействия лазерного излучения с ГКР-активными поверхностями и, в частности, метода поверхностно-усиленного (гигантского) когерентного антистоксова комбинационного рассеяния (ГКАРС), а также возможным применениям метода ГКР в биологии, биохимии и медицине, фармацевтики и др. В 2019 году, наши исследования были нацелены на выявление возможности обнаружения воспроизводимых сигналов ГКР и ГКАРС от молекул TNB, адсорбированной на ГКР-активной поверхности Au-NPs/CeO₂, без разрушения самой поверхности или конъюгатов.

Лазерное излучение, освещающее ГКР-активные наноструктурированные образцы тонких пленок CeO₂/Al/Al₂O₃ с конъюгатами молекулы-аналитов/Au-NP на поверхности CeO₂, может вызвать необратимые модификации конъюгатов, а также характеристик усиливающих полей с поверхностной структуры. В результате наблюдаемый рамановский сигнал уменьшается или вовсе исчезает. В нашем исследовании были оценены пределы интенсивности лазерного излучения, приемлемые для неразрушающих спектроскопических исследований с использованием непрерывного и квазинепрерывного (пс импульсы с синхронизацией мод) лазерного излучения, которое использовалось в качестве накачки для исследований линейной и нелинейной рамановской микроспектроскопии молекул-аналита,

адсорбированных на поверхности плазмонных подложек. Снижение мощности лазера ниже определенных уровней позволило нам реализовать воспроизводимое картирование интенсивностей сигналов от молекул-аналитов в режимах ГКР и ГКАРС.

Спектры и микроизображения ГКР и ГКАРС регистрировались с высоким пространственным разрешением с использованием конфокального микроспектрометра Confotec CARS (SOL Instruments Ltd., Беларусь). Часть спектрометра, отвечающая за КАРС, выполнена на основе лазера с пассивной синхронизацией мод с диодной накачкой (1064 нм, 7 пс, 85 МГц, 5 Вт, ширина линии $\sim 5-7 \text{ см}^{-1}$) и оптического параметрического генератора (ОПГ) с синхронной накачкой излучением с удвоенной частотой излучения 1064 нм. Сигнальный луч ОПГ (690–990 нм, 6 пс, 150–350 мВт) и часть излучения на 1064 нм с параллельными поляризациями коллинеарно перекрывались и использовались соответственно в качестве волны накачки (λ_p) и Стокс волны (λ_s) в КАРС процессе для генерации узких линий когерентных антистоксовых сигналов при $\lambda_{as} = \lambda_p / (2 - \lambda_p/\lambda_s)$. Регистрирующая система позволяет детектировать сигналы в диапазоне комбинационного сдвига $990 - 3580 \text{ см}^{-1}$. Сигналы КАРС регистрировались либо с помощью охлаждаемого модуля фотоумножителя, либо с помощью охлаждаемого фотоприемника с ПЗС-матрицей (2048×122 элемента). Рамановские спектры регистрировались с помощью той же CCD камеры (рис.15).

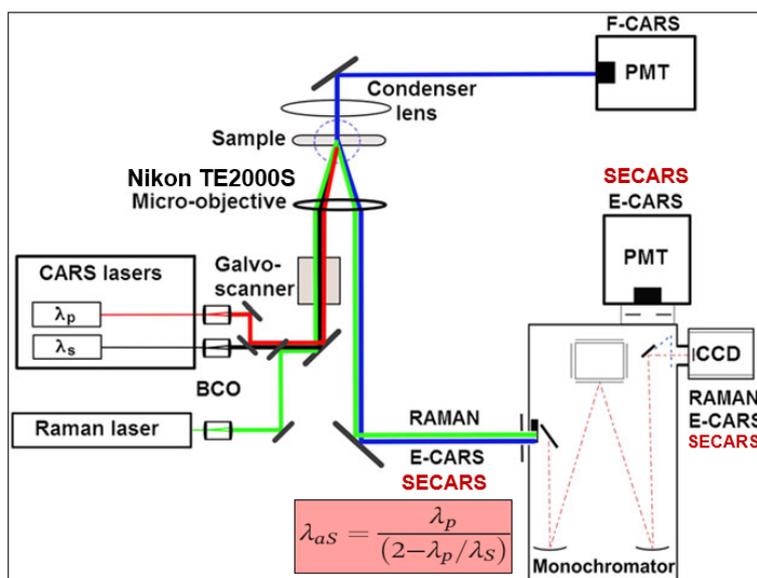


Рис.15. Оптическая схема сканирующего лазерного микроспектрометра «КАРС»

Для жесткой фокусировки пучка в микроскопии КАРС использовалась высоко-апертурная иммерсионная линза ($NA = 1.2$, UPLANAPO-60x, Olympus). В этом случае условия фазового синхронизма ослабляются из-за большого конуса волновых векторов возбуждающих пучков и малой длины взаимодействия.

Картирование сигнала осуществлялось методом 2D сканирования фокального пятна лазерного луча с помощью гальванических зеркал и записи в каждой пространственной точке спектра комбинационного рассеяния излучения с когерентным и некогерентным вкладом. Гальвано-сканер перемещает фокальное пятно по выбранной площади поверхности образца с шагом примерно $0,5-1 \text{ мкм}$ (или более). В каждой пространственной точке спектр накапливается матрицей ПЗС в течение предварительно установленного времени экспозиции, обычно это $\approx 0,5-1 \text{ с}$. Далее можно рассчитать пространственное распределение мощности,

рассеянной в заданном спектральном интервале. Эта матрица представлена в виде микроизображения или карты интенсивности сигнала. В случае резонансных сигналов интенсивность сигнала определяется как соответствующая амплитуда линии выше уровня нерезонансного фонового излучения.

ГКР при возбуждении лазером на длине волны 785нм, с частотой повторения импульсов 85 МГц и длительностью импульса 6 пс

Результаты экспериментов ГКР с пикосекундным источником возбуждения, связанные с оценкой порога повреждения образца, представлены на рисунке 16. Здесь приведена одна из ГКР-карт на линии TNB 1338 см^{-1} , записанной при излучении накачки на длине волны 785нм (рис. 16а). Эта 12×12 мкм карта была получена при самой низкой средней мощности 0,085 мВт на поверхности с диаметром лазерного пятна около 1 мкм. Интервал интенсивности линии TNB 1338 см^{-1} на рисунке 16а составляет от ~ 70 (черный) до ~ 1100 (белый) отсчетов аналого-цифрового преобразователя CCD, (фоновый сигнал вычтен).

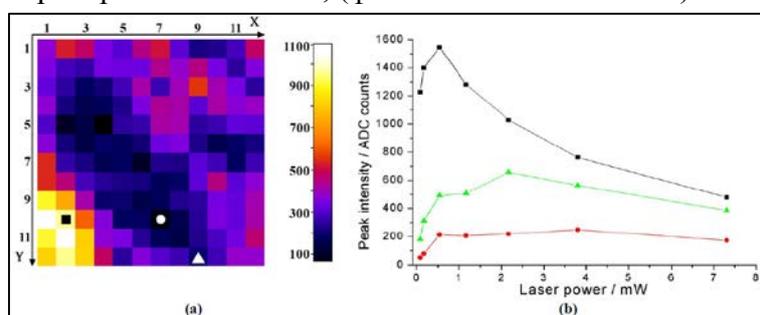


Рис. 16. (а) ГКР-карта на линии 1338 см^{-1} TNB с поверхности площадью $12\text{ мкм} \times 12\text{ мкм}$ (пространственное разрешение 1 мкм , экспозиция 1 с) при средней мощности $0,085\text{ мВт}$ на длине волны 785 нм и (b) изменение интенсивности ГКР сигнала в зависимости от средней мощности возбуждения в трех разных пикселях карты: $X=2, Y=10$ (■), $X=7, Y=10$ (●) и $X=9, Y=12$ (▲). Символы на карте указывают на соответствие между выбранными пикселями и кривыми на рис. 16b

Графики, иллюстрирующие изменение уровня сигнала ГКР со средней мощностью возбуждения в некоторых конкретных пикселях карты на рисунке 16а приведены на рисунке 16b. Для сравнения были выбраны пиксели с наименьшим, промежуточным и наибольшим уровнями сигнала ГКР при самой низкой мощности. Из рисунка 16 ясно видно, что наклоны роста сигнала в этих пикселях также отличаются друг от друга в пределах одного порядка величины. Скорее всего, это связано с различным усилением рамановского сигнала на различных структурах золотых наночастиц, попадающих в лазерном пятне. Таким образом, зависимости мощности ГКР-сигнала, представленные на рисунке 16b, показывают, что средняя мощность возбуждения должна поддерживаться значительно ниже $0,5\text{ мВт}$.

ГКАРС при возбуждении лазером с частотой повторения импульсов 85 МГц и длительностью 6 пс

В экспериментах ГКАРС с пикосекундной накачкой оптическое повреждение поверхности образца были исследованы с использованием лазерных пучков $\lambda_p = 931\text{ нм}$ и $\lambda_s = 1,064\text{ нм}$, являющихся резонансными для рамановской линии TNB 1338 см^{-1} и обеспечиваемых нашей системой КАРС. Полученные результаты показывают, что после одного сканирования карты даже при умеренной интенсивности лазера накачки, активная поверхность Au-NPs/CeO₂ может быть значительно разрушена во всей области сканирования.

При самых низких используемых мощностях картирование достаточно хорошо воспроизводится, когда последовательные сканирования карт выполняется при одном и том же уровне мощности лазера.

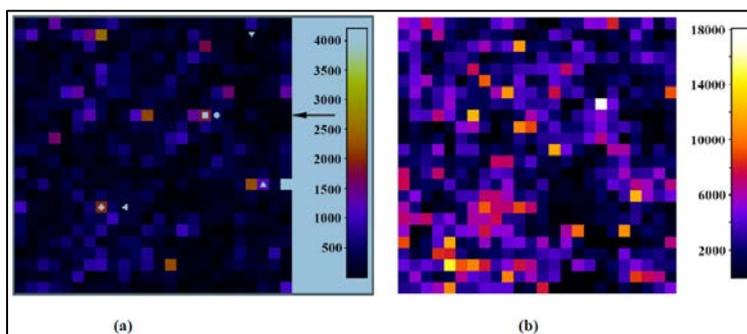


Рис. 17. ГКАРС-карта на линии 1338 см^{-1} TNB с поверхности того же образца площадью $24\text{ мкм}\times 24\text{ мкм}$ (пространственное разрешение 1 мкм , экспозиция 1 с) при двух значениях мощности лазера: (a) $P_p = 70\text{ мкВт}$, $P_s = 125\text{ мкВт}$ и (b) $P_p = 300\text{ мкВт}$, $P_s = 534\text{ мкВт}$; $\lambda_p = 931\text{ нм}$, $\lambda_S = 1,064\text{ нм}$, и $\lambda_{aS} = 828\text{ нм}$

Воспроизводимая ГКАРС-карта, представленная на рис. 17а представляет собой пример данных, полученных на самых низких уровнях раман-резонансного возбуждения молекул TNB, иммобилизованных с золотыми наночастицами. Яркие пятна в записанных ГКАРС-изображениях со средними расстояниями между пятнами порядка 5 мкм , предположительно соответствуют пространственному распределению конъюгатов TNB/Au-NP разных размеров. В этом случае предполагается, что кластеры и островки Au-NP усиливают либо все, либо некоторые электромагнитные поля на волнах λ_p , λ_S и λ_{aS} .

Наши оценки показывают, что для конкретных образцов и рамановского микроспектрометра КАРС средние мощности лазеров ($P_p + P_s$), рекомендуемые для более или менее неразрушающих и воспроизводимых измерений, должны поддерживаться ниже $0,4\text{--}0,5\text{ мВт}$ (что соответствует интенсивностям $0,4\text{--}0,5\text{ мВт/мкм}^2$), что согласуется с результатами наших ГКР-измерений, представленными ранее.

Таким образом, экспериментально были оценены пределы интенсивности для непрерывных или квазинепрерывных лазерных пучков с пикосекундными импульсами, используемых при ГКР или ГКАРС детектировании Au-NP-иммобилизованных молекул-репортеров TNB. При частоте повторения лазерных импульсов 85 МГц и длительностью 6 пс в диапазоне длин волн $785\text{--}1064\text{ нм}$ средняя пороговая интенсивность была оценена на уровне не более $0,5\text{ мВт/мкм}^2$, что соответствует пиковой интенсивности 1000 мВт/мкм^2 . Результаты экспериментов показывают, что следует проявлять должную осторожность в отношении мощности лазера при использовании ГКР-активных структур для аналитических целей в линейных или нелинейных рамановских экспериментах.

Однако, эксперименты также показали, что при раман-резонансном дву-волновом лазерном возбуждении молекул-репортеров, могут генерироваться достаточно интенсивные ГКАРС-сигналы при мощности лазера, которая не разрушает конъюгаты органика-металл, и, при этом, чувствительность ГКАРС измерений все еще остается довольно высокой.

Высокий химический контраст изображений, демонстрируемый зарегистрированными ГКАРС микроизображениями с поверхности образцов Au-NPs/CeO₂/Al/Al₂O₃, представляется перспективен с точки зрения достижения высокого уровня регистрации ГКАРС сигнала исследуемых молекул аналита, а также исследования механизмов генерации сигнала ГКАРС в дальнейших экспериментах.

2.1.5 Синтез наноструктур ядро-оболочка $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+},\text{Tm}^{3+}@\text{SiO}_2$: биовизуализация и предварительные тесты для биомедицинских исследований

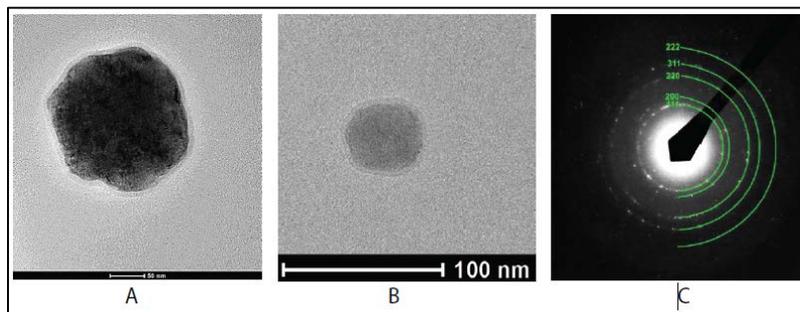


Рис. 18. ПЭМ-изображения наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}@\text{SiO}_2$ с различными размерами ядра: А) ~ 200 нм, В) ~ 45 нм и толщиной оболочки 5 нм, С) картина выбранной области электронной дифракции (SAED)

Для усиления люминесцентных показателей наночастиц «ядро-оболочка», было предложено прямое внедрение серебряных наночастиц в оболочку SiO_2 параллельно с ее формированием, что позволило исключить многостадийный формат синтеза. Коллоидный раствор серебряных наночастиц добавлялся к смеси гексан-циклогексан-изопропиловый спирт с последующим образованием SiO_2 оболочки. В результате внедрения серебряных наночастиц в структуру «ядро-оболочка», интенсивность апконверсионной люминесценции была увеличена в 85 и 29 раз для структур с толщиной оболочки 5 нм и 14 нм, соответственно (рис. 19, а, б).

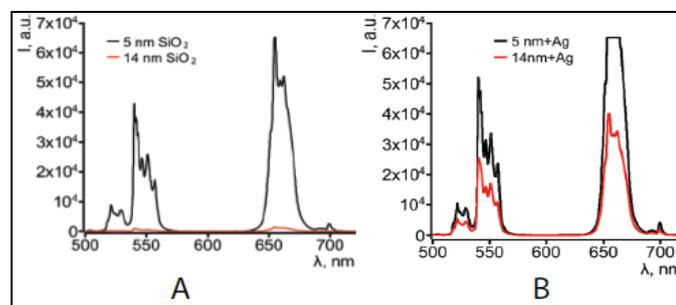


Рис. 19. АКЛ спектры наночастиц «ядро-оболочка» А) $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}@\text{SiO}_2$ и В) $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}@\text{SiO}_2@\text{Ag}$ с двумя разными толщинами SiO_2 оболочки: 5 нм и 14 нм

Были проведены тесты по биовизуализации нейтрофильных клеток методом АКЛ. Клетки нейтрофилов погружали в физиологический раствор с наночастицами «ядро-оболочка» на 30 минут для захвата некоторого количества наночастиц люминофора. Затем нейтрофилы осаждали на покровном стекле микроскопа и фиксировали спиртовым раствором, дважды промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. На рисунке 20 показано АКЛ-изображение нейтрофильной клетки полученное в красной полосе спектра люминесценции.

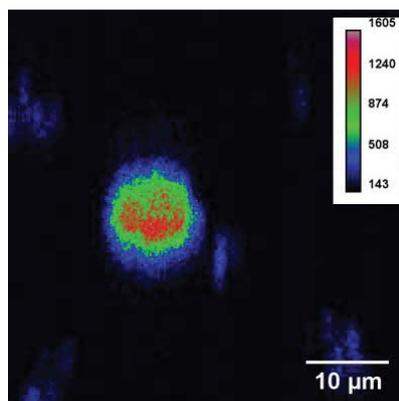


Рис. 20. АКЛ изображение нейтрофильной клетки

Таким образом, первый тест по биовизуализации синтезированных наночастиц «ядро-оболочка», как внутриклеточных люминофоров, показал возможность получения контрастных биоизображений на примере клеток нейтрофилов.

Мы также апробировали эти наночастицы в наших первых тестах по фотодинамической терапии (ФДТ) с использованием клеток фибробластов в качестве клеток-мишеней и хлорофилла в качестве фотосенсибилизатора. Результаты по измерению цитотоксичности клеток фибробластов до и после облучения их лазером представлены ниже в таблице 1.

Таблица 1.

Окрашивание с помощью трипанового красителя			
№	Образец	Отрицательный контроль (без облучения)	Положительный контроль (с облучением)
1.	Клетки (фибробласты)	92 ± 3 %	90 ± 5 %
2.	Клетки + НЧ ЯО (200ppm)	90 ± 4 %	87 ± 4 %
3.	Клетки + НЧ ЯО (200ppm) + хлорофилл	94 ± 3 %	69 ± 5 %

Предварительно полученный результат по количеству погибших в ФДТ клеток фибробластов представляются нам обнадеживающим (~25%), и требует дальнейшей оптимизации этого процесса.

3. Студенческая программа

- 1) **2018 – 2020:** 3 студентов защитили свои магистерские диссертации
- 2) **2018 – 2019:** 2 студента защитили бакалаврские дипломы
- 3) **2018 – 2019:** 2 студента, Летняя школа УНЦ ОИЯИ, Сербия и Египет
- 4) **2018 – 2020:** 6 студентов участвовали в летней практике



4. Международное сотрудничество, гранты Полномочных представителей и премия ЛНФ.

Сотрудничество:

Армения, Беларусь, Болгария, Египет, Куба, Латвия, Польша, Россия, Румыния, Словакия, Узбекистан, Украина.

Гранты Полномочных представителей:

Болгария, Польша, Румыния, Словакия.

Количество публикаций 2018-2020: 15 (до конца 2020 г. ожидается еще 2-3 публикации)

Конференции с нашим участием 2018-2020: 21

Первая премия ЛНФ за 2019 год по разделу «Экспериментальные работы»

Основные публикации

1. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., et al., "Surface-enhanced micro-CARS mapping of a nanostructured cerium dioxide/aluminum film surface with gold nanoparticle-bound organic molecules", *JRS*, 49, **2018**, 7(2), pp. 1145-1154.
2. Poimanova O.Yu., Radio S.V., Arzumanyan G.M., et al., "Hexakis(dimethylsulfoxide-O)-cobalt(II) hexatungstate, $[\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS})_6][\text{W}_6\text{O}_{19}]$: synthesis from aqueous diethylsulfoxide solution, crystal structure determination, FT-IR and Raman spectroscopy analysis, and surface micromorphology", *J. Coord. Chem.*, 71(3), **2018**, pp. 1-19.
3. Sarychev A.K., Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., et al., "Optical properties of mesoscopic, multiscale silver films: surface plasmon localization and giant SERS", *Proceedings of SPIE-2018*, Paper No.: OP101-87
4. Пойманова Е.Ю., Медведь А.О., Арзуманян Г.М. и др., «Декавольфрамат никеля $[\text{Ni}(\text{C}_2\text{H}_6\text{SO})_5(\text{H}_2\text{O})_2][\text{W}_{10}\text{O}_{32}]$: синтез из водно-диметилсульфоксидного раствора, определение кристаллической структуры, ИК- и КР-спектроскопический анализ, микроморфология поверхности», *Ж. структ. химии*, 59(1), **2018**, с. 149-157.
5. Арзуманян Г.М., А.В. Мудрый, О.С. Дымшиц и др., «Фотолюминесценция и структурные характеристики стеклокерамики, содержащей нанокристаллы оксида цинка и ионы европия», *Труды конференции ФТТ-2018*, 24-28 сент. **2018**, Т.2, с.254-257
6. Арзуманян Г.М., Линник Д.С., Маматкулов К.З., Глазунова В.С., «Синтез ап-конверсионных наночастиц $\text{SrF}_2:\text{Yb,Er}@\text{SrF}_2$ », *Труды III межд. конф. «Донецкие чтения-2018»*, 25 окт. **2018**, Т.2, с. 122-124
7. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., et al., "Laser intensity limits in surface-enhanced linear and nonlinear Raman micro-spectroscopy of organic molecule/Au-nanoparticle conjugates", *JRS*, **2019**; 50, pp 1311–1320.
8. Arzumanyan G.M., Linnik D.S., Mamatkulov K.Z., Vorobeva M.Yu., et al., "Synthesis of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}@\text{SiO}_2@\text{Ag}$ core-shell nanoparticles for plasmon-enhanced upconversion luminescence in bio-applications", *Annals of Biomedical Science and Engineering*, **2019**, 3, pp 013-019.
9. Zavatski Sergey, Khinevich Nadia, Arzumanyan Grigory, Bandarenka Hanna et al., "Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Lactoferrin Adsorbed on Silvered Porous Silicon Covered with Graphene", *Biosensors*, **2019**, 9, 34, pp. 1-19.
10. Арзуманян Г.М., Марченко А.С., Маматкулов К.З., Врещагин К.А., Волкоа А.Ю., "К вопросу о спектральной идентификации активированных и не активированных нейтрофилов методом комбинационного рассеяния света". *Труды 61-ой Всероссийской научной конференции МФТИ*, Москва, **2019**, стр. 27-28.
11. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., et al., "Micro-SECARS Studies of Organic Molecules on Randomly -Nanostructured SERS-Active Surfaces", *Proceedings of the 18-th European conference on non-linear optical spectroscopy (ECONOS)*, **2019**, April 7-10, Rouen, France, p.74, (Microspectrometer "CARS").
12. Yakimchuk D.V., Kaniukov E.Yu., Arzumanyan G.M., et al., "Self-organized spatially separated silver 3D dendrites as efficient plasmonic nanostructures for Surface-enhanced Raman spectroscopy applications", *J. Appl. Phys*, **2019**, 126
13. Arzumanyan G.M., Gur'ev A.S., Mamatkulov K.Z., et al. "Micro Raman spectroscopy for NETosis detection", *JRS*, **2020**, 1-10

Участие в конференциях

1. Арзуманян Г.М., «Поверхностно-усиленное микро-КАРС картирование органических молекул», Российская конференция и школа молодых ученых по актуальным проблемам спектроскопии комбинационного рассеяния света: «КР – 90 лет исследований», 28 мая – 01 июня **2018 г.**, г. Новосибирск, Россия. **Keynote report**
2. Arzumanyan G.M., “Polarization-sensitive CARS imaging and surface-enhanced micro-CARS of organic molecules”, BIT’s 2nd International Biotechnology Congress-2018, October 14-16, **2018**, Fukuoka, Japan. Oral report.
3. Doroshkevich N.V., “Detection of DNA molecules by SERS spectroscopy with silver porous silicon as an active substrate”, International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences: “IC-ANMBES 2018”, 23-25 May, **2018**, Brasov, Romania.
4. Sarychev A.K., Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., et al., “Optical properties of mesoscopic, multiscale silver films: surface plasmon localization and giant SERS”, Int. conf. SPIE-2018, 19-23 August, **2018**, San Diego, California, United States. Oral report.
5. Мудрый А.В., Арзуманян Г.М., «Фотолюминесценция и структурные характеристики стеклокерамики, содержащей нанокристаллы оксида цинка и ионы европия». VIII международная научная конференция ФТТ-2018, 24 – 28 сентября **2018г.**, Минск, Беларусь, Oral report
6. Bandarenka H.V., Arzumanyan G.M., Mamatkulov k.Z., et al., “Comparison of SERS-activity of Silver Dendrites and Nanoparticles on Structured Silicon”, Advanced Photonics Congress, 02 – 05 July, **2018**, ETH Zurich, Zürich, Switzerland, Oral report.
7. Арзуманян Г.М., «Спектрально-структурные характеристики стеклокерамики на основе нанокристаллов ZnO и активированных редкоземельных элементов», Всероссийская научно-практическая конференция гос. Университета «ДУБНА», 21 – 23 ноября, **2018**, Дубна, Россия. **Plenary report**.
8. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., “Polarization-sensitive CARS imaging and surface-enhanced micro-CARS of organic molecules”, First International Conference on Molecular Modeling and Spectroscopy, **2019**, 19-22 February, Cairo, Egypt. **Keynote report**
9. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., “Coherent surface-enhanced raman scattering: chemical imaging and intensity limits”, EuroSciCon Conference on Nanotechnology and Smart Materials, **2019**, 08-10 July, Prague, Czech Republic. **Keynote report**
10. Arzumanyan G.M., “Modern Trends in Raman Microspectroscopy”, International School of Nuclear Physics «JINR Days in Bulgaria», **2019**, 13 -17 May, Borovets, Bulgaria. **Oral report**
11. Mamatkulov K.Zh., Vorobeva M.Ju., Bandarenko H.V., Arzumanyan G.M. “Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Organic Molecules Adsorbed on Silvered Porous Silicon Covered with Graphene”, 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, ICNBME-2019, September 18-21, **2019**, Chisinau, Moldova. **Oral report**
12. Vereshchagin K.A. Volkov A. Yu., Gurev A.S., Kravtsunova D.E., Mamatkulov k.Zh., Marchenko A.S., Arzumanyan G.M., “Peculiarities of Micro Raman Spectra of Blood Neutrophils Transformed during NETosis as a Possible Marker of Sepsis Mortality”, 18-th European conference on non-linear optical spectroscopy (ECONOS), **2019**, 7-10 April, Rouen, France. **Oral report**
13. Рудных С.К., Воробьева М.Ю., Маматкулов К.З., Арзуманян Г.М., “Структурно-функциональные особенности и колебательная спектроскопия фосфолипидов”, «Площадка открытых коммуникаций» - Openbio-2019, Новосибирская область, наукоград Кольцово, 22-25 октября, **2019 г.** **Oral report**
14. Bandarenka Hanna, Khinevich Nadia, Zavatski Sergey, Mamatkulov kahramon, Vorobyeva Maria and Grigory Arzumanyan, “Study of proteomic analytes by surface enhanced Raman spectroscopy”, VI International Caparica Conference on Analytical Proteomics **2019**, 08 – 11 July 2019, Caparica, Portugal. **Oral report**
15. Марченко А.С., Арзуманян Г.М., «Способы активации и микроспектроскопия нейтрофилов», 26-ая научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых специалистов государственного университета «Дубна», г. Дубна, 18-19 апреля **2019 г.** **Oral report**
16. Marchenko A.S., Vereshchagin K.A., Volkov A.Yu., Mamatkulov K.Zh., Arzumanyan G.M., “Raman spectroscopy of NETosis: search for spectral biomarker”, International Conference on Radiation Applications (RAP 2019), September 16-19, **2019**, Serbia, Belgrade. **poster**
17. Vorobeva M.Yu., Mamatkulov K.Zh., Bandarenka H.V., Arzumanyan G.M., “Highly Sensitive Surface-enhanced Raman scattering based on Silver Dendritic Nanostructures”, EuroSciCon Conference on Nanotechnology and Smart Materials, **2019**, 08-10 July, Prague, Czech Republic, **Oral report**
18. Arzumanyan G.M., Bandarenko A.V., Mamatkulov K.Zh., “Ultrasensitive detection of analyte molecules at attomolar concentration by Raman spectroscopy”, **2020**, Feb. 21-22, EuroSciCon-2020, Amsterdam, Netherlands, **Keynote report**