

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М.  
ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

На правах рукописи

Залыгин Антон Владленович

СИСТЕМА ЗОНДОВО-ОПТИЧЕСКОЙ 3D  
КОРРЕЛЯЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ И ЕЁ ПРИМЕНЕНИЕ  
В ИССЛЕДОВАНИИ СВОЙСТВ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Специальность: 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

Доктор физико-математических наук,  
Олейников Владимир Александрович

Научный консультант:

Доктор химических наук,  
профессор Разумовская Ирина Васильевна

Москва - 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Методы СЗМ .....	12
1.1.1 АСМ .....	12
1.1.2 МСМ.....	16
1.2 Методы оптической микроскопии .....	19
1.2.1 Флуоресцентная конфокальная микроскопия.....	20
1.2.2 Поляризационная оптическая микроскопия.....	23
1.2.3 Область применимости .....	24
1.3 Микротомия .....	25
1.3.1 Механизм секционирования .....	25
1.3.2 Виды микротомов .....	26
1.3.3 Ножи для микротомов .....	27
1.3.4 Современные модификации микротомов.....	28
1.3.4 Предварительная подготовка материалов к секционированию .....	29
1.3.2 Область применения.....	30
1.4 Современные подходы корреляционной микроскопии .....	31
1.4.1 ОМ–ЭМ.....	31
1.4.2 АСМ–ОМ/ЭМ.....	34
1.4.3 СЗНТ.....	36
1.5 Жидкие кристаллы.....	41
1.5.1 Свойства ЖК .....	41
1.5.2 Виды ЖК.....	42
1.5.3 Области применения ЖК .....	45
1.6 Квантовые точки.....	46
1.6.1 Типы КТ .....	47
1.6.2 Оптические свойства КТ .....	48
1.6.3 Области применения КТ .....	49
1.7 Оптически кодированные микросферы как инструмент для диагностики.....	50
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	52
2.1. Исследование поверхностной структуры плёнок ЖК .....	53
2.1.1. Методики синтеза используемых материалов .....	54
2.1.2. Инструментальная база .....	56
2.1.3. Результаты исследования.....	58
2.1.4. Общие выводы по результатам исследования .....	65

2.2. Исследование трёхмерной структурной организации и оптических характеристик гибридного материала, содержащего холестерические ЖК матрицы с инкорпорированными в них КТ .....	66
2.2.1. Методики синтеза использованных материалов.....	66
2.2.2. Инструментальная база .....	67
2.2.3. Методика исследования .....	70
2.2.4. Результаты исследования .....	71
2.2.5. Общие выводы по результатам исследования .....	79
3. СИСТЕМА ЗОНДОВО-ОПТИЧЕСКОЙ 3D КОРРЕЛЯЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	80
3.1 Корреляционная схема СЗНТ – ОМ .....	80
3.2. Разработка методики исследования материалов с помощью уникальной установки СЗНТ – ОМ на примере флуоресцентных коммерчески доступных магнитных микрометровых микросфер, используемых в иммунодиагностике.....	84
3.2.1. Подготовка материалов .....	85
3.2.2. Методика исследования .....	85
3.2.3. Результаты исследования .....	87
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	91
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	92

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования.**

Темп и качество развития современной нанотехнологичной продукции, а также грамотная корректировка и усовершенствование технологий её производства напрямую зависят от технических возможностей оборудования, используемого для исследования наноматериалов [1-3]. Кроме того, важными факторами являются доступность необходимого для исследований оборудования и его многофункциональность.

Сегодня одними из приоритетных направлений исследований являются исследования семейства родопсинов архей, исследование влияния жидких кристаллов в составе наноматериала на его структуру и физические свойства, а также поэтапное исследование инструментов для современной иммунодиагностики. Исследование этих объектов при помощи существующего на сегодняшний день современного оборудования осложнено спецификой работы с данными объектами. В случае с родопсинами и инструментами иммунодиагностики мы говорим о мягких биологических и полимерных материалах, крайне чувствительных к радиационному излучению. В случае с жидкими кристаллами зависимость свойств гибридного наноматериала от конкретного распределения этих кристаллов внутри структуры и на её поверхности можно оценить лишь при проведении быстрого и последовательного анализа его химических свойств, а также 2D и, обязательно, 3D структуры, необходимой для максимально верной оценки исследуемого материала.

Сегодня для изучения внутренней структуры и элементного анализа различных биологических материалов, нанокompозитов и полупроводниковых наноматериалов в основном используют корреляционную микроскопию. Её главным достоинством является возможность получения качественно разных комплементарных данных в одной и той же области образца за счёт объединения различных микроскопических и спектроскопических методов. Посредством такого подхода возможно определить наномасштабную трёхмерную морфологию, химический состав, физические параметры образца, а также произвести оценку корреляции между этими характеристиками [4-6].

Чаще всего используют схему, представляющую собой совокупность электронной микроскопии (ЭМ) и оптической микроспектроскопии (ОМ) [4,5,7,8]. И, хотя, данная сборка способна обеспечить высокое пространственное разрешение в сочетании с возможностью анализа флуоресценции образца и проведения комбинационной или ИК-спектроскопии, неоспоримыми минусами сборки являются низкая контрастность и повреждающий эффект электронного луча применительно к биологическим образцам и полимерам. Более того,

необходимость использования двумерных проекций трёхмерного образца ограничивает применимость многих методов ЭМ к ряду биологических объектов [9-11].

Другим распространённым вариантом сборки является соединение ОМ со сканирующим зондовым микроскопом (СЗМ). В отличие от электронного микроскопа СЗМ не оказывает разрушающего воздействия на образцы и, в первую очередь, предназначен для характеристики тех поверхностей, повреждения которых радиацией должны быть полностью исключены [6,12,13]. Однако данную сборку нельзя использовать для анализа 3D – наноструктур, что также является существенным недостатком.

Оба недостатка вышеупомянутыхборок можно решить с помощью подхода, основанного на комбинации методов СЗМ и ультрамикротомии (УМТ) – сканирующей зондовой нанотомографией (СЗНТ) [14-18]. Этот подход заключается в создании нескольких ультратонких (до 20 нм) срезов участка образца с последующим получением их изображений при помощи СЗМ. Таким образом СЗНТ применим к чувствительным к радиационному воздействию материалам и одновременно с этим позволяет восстанавливать 3D-морфологию исследуемых объектов. Кроме того, данный метод можно использовать для оценки трёхмерных распределений физических параметров исследуемого образца (модуля упругости, вязкости, магнитных свойств, электропроводности) [15], а работу с исследуемым материалом возможно проводить как при комнатной температуре, так и в криокамере микротомы [16], что является существенным плюсом при исследовании родопсинов и инструментов современной иммунодиагностики. Единственным недостатком данного подхода является невозможность одновременного проведения ещё и наномасштабного анализа химического состава образца.

Данную проблему возможно решить посредством разработки единой экспериментальной установки, в которой будет осуществлена корреляционная связь СЗНТ с ОМ. Создание такого универсального устройства позволит быстро и при минимальной пересборке установки получать корреляционные данные от применения различных методов СЗМ и различных спектральных методик. Таким образом, будет возможно производить трёхмерное многопараметрическое исследование интересующих материалов. Причём, за счёт отсутствия в схеме ЭМ, данной установкой возможно одинаково качественно исследовать как наноконпозиты, с внедрёнными в них жидкими кристаллами, так и мягкие полимерные инструменты иммунодиагностики, а также родопсины. Кроме того, такая система без каких-либо существенных модификаций её ключевых параметров также отлично подойдёт для проведения таких передовых типов высокоразрешающих измерений, как стохастическая оптическая реконструктивная микроскопия (STORM) [19], фотоактивируемая локализационная микроскопия (PALM) [20] и стимулированная эмиссионная микроскопия (STED) [21]. Также важно отметить, что принцип

использования эффектов перераспределения и экстремальной локализации электромагнитного (э/м) поля в окрестностях наконечников сканирующих зондов, используемый для осуществления корреляционной связи СЗНТ с ОМ, подойдёт и для разработки 3D – версий почти всех ближнепольных СЗМ, активно развивающихся в последнее время. При этом также будет решена проблема с закупкой и/или поиском широкого спектра различного оборудования, так как все необходимые данные смогут быть получены с одного прибора. Кроме того, разработка устройства, объединяющего СЗНТ с ОМ в одном приборном блоке позволит осуществлять исследования в крайне актуальной на сегодняшний день области нанотехнологий независимо от иностранных технологических разработок, так как данная разработка является уникальным отечественным высокотехнологичным прибором.

**Цель работы:** осуществление корреляционной связи СЗНТ с ОМ в единой экспериментальной установке таким образом, чтобы с её помощью возможно было быстро и при минимальной модификации получать данные о наномасштабной трёхмерной морфологии, физических параметрах и химическом составе, и изучение посредством неё свойств полимерных инструментов иммунодиагностики, а также нанокompозитных материалов с инкорпорированными в них квантовыми точками.

Исходя из этой цели, были поставлены следующие **задачи:**

1. Разработать специализированную систему сканирования СЗМ для решения проблем, связанных с отсутствием оптического доступа для высокоапертурных линз и с высоким уровнем шума.
2. Разработать технологию отведения головки специализированной системы сканирования СЗМ для уменьшения веса ультрамикротомы (УМТ) в процессе осуществления разреза и для реализации пространственной изоляции держателя кантилевера от ножа УМТ в момент разделения УМТ.
3. Разработать схему комбинации модернизированного блока СЗНТ и оптической части устройства.
4. Исследовать с помощью собранной установки образование кратеров на плёнках жидких кристаллов.
5. Исследовать с помощью собранной установки распределение квантовых точек (КТ) в жидких кристаллах.

6. Исследовать с помощью собранной установки флуоресцентные магнитные микросферы COOH QuantumPlex™ размером 5,5 мкм (Bangs Laboratories, Inc., США), используемые на сегодняшний день в иммунодиагностике.

7. Разработать методики изучения для каждого из перечисленных в пунктах 4-6 материалов.

### **Научная новизна.**

В отличие от существующих на сегодняшний день корреляционных схем, используемых для исследования различных нанотехнологических материалов, представленная в данной работе система позволяет проводить многопараметрический корреляционный анализ объемных наноструктурных композиционных материалов, включающий в себя данные с АСМ, МСМ, а также построение карты расположения флуоресцентных источников и снятие спектров их флуоресценции. Кроме того, современное состояние разработанной системы корреляции СЗНТ с ОМ позволяет выполнять 3D – версии усиленного остриемьщсрф комбинационного рассеяния [22] и сканирующей ближнепольной оптической микроскопии [23]. Также при реализации несущественных изменений в системе возбуждения лазера возможно реализовать 3D – версию новой технологии фотоиндуцированной силовой микроскопии [24]. Ещё одним новшеством является возможность одинаково качественно исследовать как твёрдые полупроводниковые наноматериалы, так и мягкие полимерные композиты, содержащие в своём составе различные наночастицы, а также непрозрачные биологические образцы. При этом чувствительные к радиационному излучению полимеры и биологические образцы не подвергаются риску, так как в собранной схеме отсутствует ЭМ. Кроме того, высокая скорость снятия данных позволяет исследовать образцы, характеризующиеся короткоживущими фотоциклами, например, БР D96N [25].

### **Практическая значимость полученных результатов.**

Разработанное устройство позволяет осуществлять единовременную характеризацию наномасштабных морфологических, а также магнитных и оптических характеристик исследуемых нанотехнологических образцов, в том числе мягких композитных полимеров и биологических образцов. Были разработаны и продемонстрированы методики исследования плёнок жидких кристаллов, нанокомпозитов жидких кристаллов и КТ, а также флуоресцентных магнитных микросфер, являющихся современным инструментом иммунодиагностики. Это позволяет улучшить контроль качества подобных структур и, тем самым, ускорить темп развития нано- и микроустройств. Кроме того, разработанное в данной работе устройство позволяет занять отечественной отрасли развития и разработки нанотехнологий гораздо более независимое от

иностранных разработок положение, а также уменьшит финансовые и временные затраты исследовательских лабораторий на закупку и поиск разнообразного подходящего оборудования.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Сфокусированное лазерное излучение формирует кратеры в плёнках ЖК микронной толщины и не оказывает воздействия на плёнки толщиной до 200 нм. Хиральность плёнок не влияет на это свойство.

2. Разработанная методика и приборный комплекс позволяют оценить, что CdSe/ZnS КТ растворяются в гибридной матрице холестерических ЖК в массовой концентрации  $5 - 7,5 \cdot 10^{-4}$  % не нарушая её структуры, среднее расстояние между КТ составляет 150 нм. Избыточные КТ скапливаются в областях дефектов ЖК-матрицы в виде кластеров диаметром 1,5 мкм и занимают меньшую часть образца.

3. Созданная научная установка, объединяющая СЗМ, ОМ и УМ в едином устройстве, позволяет реализовать специально разработанный метод СЗНТ- ОМ, возможности которого по 3D-анализу гибридных наноматериалов продемонстрированы на флуоресцентных магнитных микросферах. Данное устройство позволяет получать 3D-характеристику морфологии, химического состава, межкомпонентного взаимодействия, механических, электрических, магнитных, а также других свойств объёмных композитных материалов

### **Методология и методы проведённых исследований.**

В качестве образца – представителя современной линии инструментов для иммунодиагностики были использованы флуоресцентные магнитные микросферы COOH QuantumPlex™ размером 5,5 мкм (Bangs Laboratories, Inc., США).

Исследование образца в общем было произведено по следующей **методике (более подробное описание методики см. пункт 3.2 диссертации) (Рис. 1):**

1. При отсоединении объектива и отсоединении головки СЗМ производится первый разрез УМТ для формирования четкой и плоской поверхности исследуемого образца, позволяющей одновременно выполнять измерения СЗМ и ОМ.

2. Головка СЗМ устанавливается на место, после чего объектив продвигается и фокусируется на поверхности образца.

3. Головка СЗМ приземляется, а точное выравнивание СЗМ и конфокального сканирования выполняется путем получения конфокального изображения кончика кантилевера с использованием лазерного конфокального режима. В данном случае фокус объектива регулируется до максимума отраженного сигнала лазерного излучения возбуждения,



записанного с помощью детектора. Сканирование выполняется в области 10x10 мкм (512 × 512 пикселей) с частотой 2 Гц. Полученное изображение консольного наконечника представляет собой круглое пятно со средним диаметром около 200 нм.

4. Кантилевер помещается в центр пятна и удерживается в этом положении во время последующих измерений в замкнутом контуре, что обеспечивает согласование между СЗМ и конфокальными областями сканирования с точностью до нескольких десятков нанометров.

5. Проводятся одновременные измерения методами СЗМ (в данном случае, АСМ и МСМ) и ОМ (в данном случае, конфокальной флуоресцентной микроскопии).

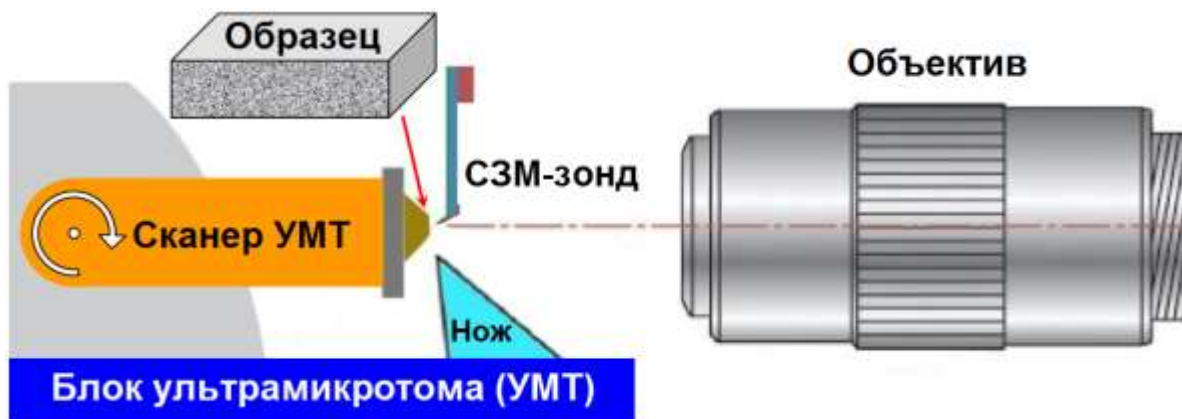
6. Головка СЗМ убирается, после чего рычаг УМТ перемещается из рабочего положения вниз, что приводит к отсоединению головки СЗМ от рычага УМТ и его фиксации на специальных опорах.

7. Рычаг УМТ перемещается вниз, что приводит к следующему разрезу образца. Толщина среза регулируется вытягивающим устройством плеча УМТ с минимальным шагом около 20 нм.

8. Система сканирования с фиксированным на ней образцом приводится в верхнюю рабочую точку.

9. Шаги 3-8 повторяются до тех пор, пока накопленный массив 2D данных СЗМ и ОМ не станет достаточным для получения информативного трехмерного рисунка.

В этом исследовании мы использовали только один разрез микросфер в их центральной части (этапы 1-5), поскольку этого было достаточно для получения полной корреляционной информации о центрически симметричных объектах, таких как изученные микросферы. Возможность получения 3D-изображений в режиме СЗМ с использованием этой системы была продемонстрирована ранее, с подробными экспериментальными условиями [26].



**Рисунок 1.** Схема методики проводимого с помощью корреляции СЗНТ и ОМ анализа образца магнитных флуоресцентных микросфер.

Для исследования кратеров на поверхности плёнок жидких кристаллов и для исследования распределения КТ в жидких кристаллах в качестве холестерической матрицы был выбран стеклообразующий холестерический циклосилоксан Sil Green производства фирмы Wacker Company. В качестве полимера в данном исследовании был использован полимер PAzo4M. В качестве КТ – CdSe/ZnS КТ со структурой ядро/оболочка, характеризующихся  $\lambda_{\text{фл1}}=530$  нм  $\lambda_{\text{фл2}}=604$  нм.

#### **Личный вклад соискателя.**

Все этапы работы, включая разработку методик, проведение экспериментов, обработку и анализ полученных результатов были проведены лично автором или при его непосредственном участии.

### **Степень достоверности и апробация работы.**

Основные материалы диссертации были доложены и обсуждены на международной конференции «Advances in Functional Materials Conference» (Университет Стони Брук, США, 2015, июнь 29 – июль 3), стендовый доклад и устный доклад, Первой международной научной конференции «Наука будущего» (С.-Петербург, 2014, 17-20 сентября), стендовый доклад, международной конференции «Integrated photonics: materials, devices, and applications II» (Гренобль, Франция, 2013, 24-26 апреля), стендовый доклад, международной конференции International Workshop «Laser Physics» (Прага, Чехия, 2013, 15-19 июля), стендовый доклад, международной конференции «Европейский полимерный конгресс» «EPF-2013» (Пиза, Италия, 2013, 16-21 июня), стендовый доклад и устный доклад, XXII международной молодежной научной школе «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия» (Казань, 2018, 9-11 октября), стендовый доклад, Конференции-школе молодых учёных с международным участием «Достижения и перспективы супрамолекулярной и биологической химии в биомедицине и сельском хозяйстве» (Москва, 2017, 4-8 декабря), устный доклад, V Съезде физиологов СНГ, V Съезде Биохимиков (Сочи, 2016, 4-9 октября), стендовый доклад.

### **Опубликованные результаты.**

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ: 15 статей (в том числе 13, входящих в базы Scopus и Web of Science; 5 – по материалам конференций) и 1 патент на изобретения.

### **Структура и объём диссертации.**

Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, заключения и списка литературы. Полный объём диссертации составляет 101 страницу текста с 41 рисунком. Список литературы включает 116 наименований.

Автор работы глубоко признателен всем, кто прямо или косвенно принимал участие и способствовал выполнению данной работы: научному руководителю Олейникову В.А., научному консультанту проф. Разумовской И.В., коллегам Мочалову К.Е., Соловьёвой Д.О., Сизовой С.В., Ефимову А.Е. и проф. Бобровскому А.Ю., а также Радюку А.Л.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Методы СЗМ**

К основным и наиболее распространённым методам СЗМ относятся: сканирующая туннельная микроскопия (СТМ), АСМ, электросиловая микроскопия (ЭСМ), МСМ и ближнепольная оптическая микроскопия (БОМ). И хотя представленная в данной работе корреляционная схема позволяет манипулировать всеми этими методами, в рамках диссертации будут использованы только АСМ и МСМ, в связи с этим далее будет приведено развёрнутое объяснение физических принципов, на которых основаны именно эти методы. Кроме того, будут рассмотрены преимущества и недостатки АСМ и МСМ, область их применимости, а также «слепые пятна», остающиеся при исследовании образцов посредством лишь только этих методов в отдельности.

#### **1.1.1 АСМ**

##### **1.1.1.1 Принцип работы**

Атомно – силовой микроскоп - сканирующий зондовый микроскоп высокого разрешения. Он используется для определения рельефа поверхности с разрешением от десятков ангстрем вплоть до атомарного [27].

Физическим принципом, на котором построена работа АСМ, является наличие Ван-дер-Ваальсовых сил и сил отталкивания между зондом микроскопа и исследуемой поверхностью. Для регистрации этих силовых взаимодействий используются датчики с особым устройством. Они представляют собой упругую консоль с острой конусообразной иглой – зондом на конце (рис. 2) [28]. Радиус самого кончика такой иглы колеблется от 5 до 90 нм в зависимости от производителя и целей исследования. Сама же консоль состоит из вытянутой части – кантилевера и крупного прямоугольного основания. Важной особенностью устройства кантилевера является тот факт, что одна из его сторон – зеркальная. Это необходимо для работы оптической системы микроскопа, описанной ниже [27].



**Рисунок 2.** Схематическое изображение зондового датчика АСМ [28].

Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Контроль силы взаимодействия зонда с образцом реализуется за счёт регистрации величины этого изгиба. Оценить эту силу позволяет потенциал Леннарда – Джонса:

$$U_{LD}(r) = U_0 \left\{ -2 \left( \frac{r_0}{r} \right)^6 + \left( \frac{r_0}{r} \right)^{12} \right\}, \text{ где}$$

$U_{LD}$  – потенциал Леннарда – Джонса;

$r$  – расстояние между двумя атомами;

$r_0$  – равновесное расстояние между атомами;

$U_0$  – значение энергии в минимуме [28].

Общая энергия системы получается при суммировании элементарных взаимодействий каждого из атомов зонда и образца. Таким образом сила, которая оказывает воздействие на зонд со стороны поверхности, может быть вычислена по формуле:

$$\vec{F}_{PS} = -grad(W_{PS}), \text{ где}$$

$F_{PS}$  – сила, действующая на зонд со стороны поверхности;

$W_{PS}$  – общая энергия системы.

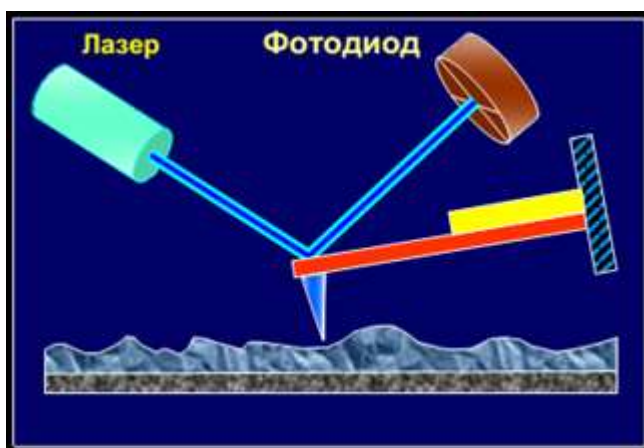
Эта сила характеризуется двумя составляющими – нормальной и латеральной. При этом, важно понимать, что несмотря на то, что в реальном случае количество условий и расчёты намного сложнее, всё же общий принцип остаётся тот же: на малом расстоянии зонд АСМ отталкивается образцом, на большом притягивается [28].

Регистрация всех даже самых малых изгибов консоли осуществляется посредством специальной оптической системы (рис.3). Именно для её работы одну из сторон кантилевера делают зеркальной. Эта система включает в себя полупроводниковый лазер, отъюстированный

таким образом, чтобы его излучение фокусировалось точно на зеркальной части кантилевера. Далее отражённый от кантилевера пучок попадает на фотоприёмник, представляющий собой фотодиод из четырёх секций. Таким образом, описанная выше оптическая система осуществляет регистрацию деформации изгиба консоли под действием нормальных компонент сил притяжения/отталкивания и под действием латеральных компонент сил взаимодействия зонда с поверхностью [28].

Исходя из всего вышесказанного естественным следствием является то, что разность исходных значений фототоков и значений после изменения положения зонда определяет величину и вектор изгиба зондового датчика микроскопа [28]. Именно по такой методике происходит регистрация изгиба кантилевера в большинстве современных АСМ.

Обратная связь осуществляется с использованием значения разности фототоков в качестве входного параметра посредством пьезоэлектрического элемента, поддерживающего изгиб консоли равным величине, заданной изначально оператором [28].

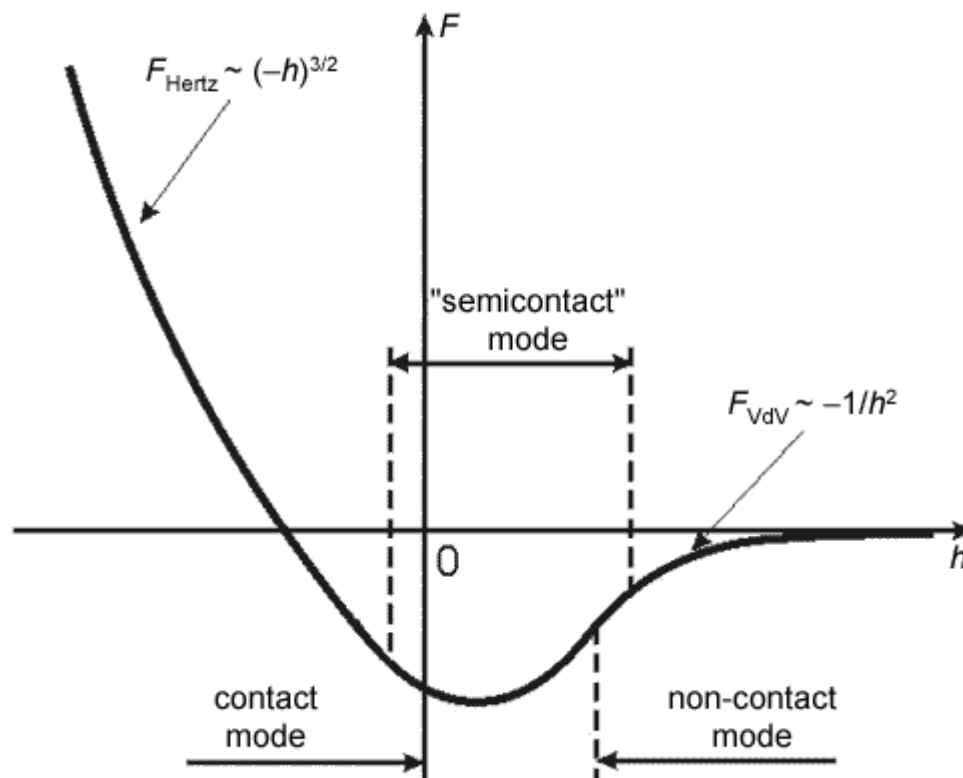


*Рисунок 3.* Упрощённое изображение регистрации изгиба кантилевера посредством оптической системы АСМ [28].

### **1.1.1.2 Контактные квазистатические методы получения информации**

Главной отличительной особенностью любых (как статических, так и динамических) контактных методик исследования в АСМ является непосредственное соприкосновение зонда микроскопа с поверхностью исследуемого образца. При таком подходе силы упругости кантилевера уравновешивают силы притяжения и отталкивания со стороны исследуемого материала (рис.4). Контактные методики позволяют реализовать два режима исследования материала. В первом рельеф поверхности исследуемого материала анализируется при постоянной силе взаимодействия зонда с образцом (силе притяжения или отталкивания, соответственно). Во втором режиме анализ поверхности производят при постоянном среднем расстоянии между кончиком зонда и поверхностью образца [28].

К плюсам контактных методик можно отнести хорошее латеральное разрешение, а также возможность определять деформацию в системе острие – поверхность. К минусам можно отнести потенциальный риск повреждения поверхности исследуемого образца, а также низкое силовое разрешение и подверженность температурному дрейфу. Кроме того, такая методика не подходит для исследования мягких чувствительных к физическим повреждениям биологических образцов [29].



**Рисунок 4.** Расстановка сил при разных режимах работы АСМ.

### 1.1.1.3 Бесконтактные колебательные методы получения информации

Главным отличием колебательных методик является исследование интересующего образца посредством колеблющегося кантилевера [28]. Определяющим параметром в данном случае являются Ван-дер-Ваальсовы силы, возникающие между кончиком зонда микроскопа и поверхностью исследуемого материала. Остриё зонда колеблется в районе 5 – 10 нм от образца. На таком расстоянии электронные орбитали атомов зонда синхронизируются с электронными орбиталями атомов исследуемого материала. При этом в результате того, что атомы зонда и образца в любой момент времени поляризованы в одном и том же направлении, возникает слабое притяжение. В свободном пространстве эти атомы будут сближаться до тех пор, пока сильное электростатическое отталкивание не станет преобладающим (рис.4) [29].

К существенному плюсу бесконтактных методик можно отнести работу без риска повредить поверхность исследуемого образца. К тому же, бесконтактные и полуконтактные методики наилучшим образом подходят для исследования разных мягких биологических образцов. К минусам можно отнести низкое силовое и пространственное разрешение, а также подверженность температурному дрейфу [29].

#### **1.1.1.4 Область применимости АСМ**

В целом АСМ является универсальным инструментом для исследования рельефа поверхности как твёрдых образцов вроде полупроводниковых наноматериалов, так и мягких биологических образцов вроде клеток и полимерных плёнок. Возможность широкой вариации методик исследования интересующих поверхностей позволяет получать максимально точные карты рельефа качественно разных поверхностей. Однако этим всё и ограничивается. АСМ не предоставляет никакой информации о химическом составе образца или о его подповерхностной структуре, также он не позволяет получать оптические изображения поверхности исследуемого материала.

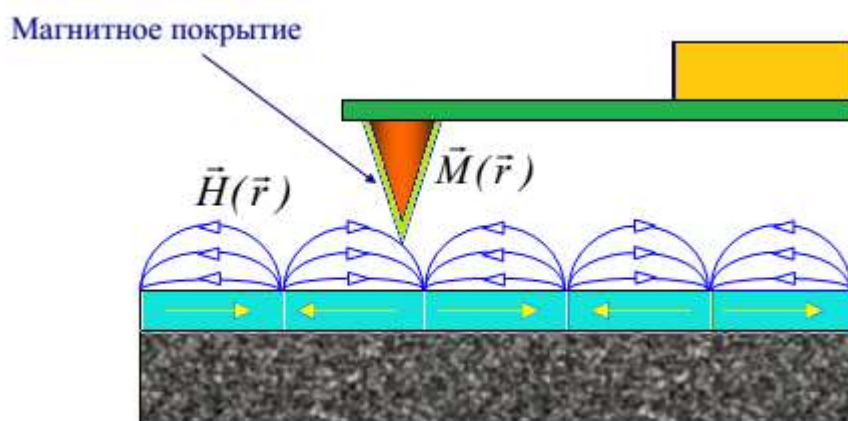
Для преодоления этих ограничений обычно используют комбинации методов АСМ с другими методами исследований. АСМ в сочетании с флуоресцентной и конфокальной микроскопией, а также со спектроскопией комбинационного рассеяния в разы улучшает качество исследования, позволяя получать почти полный спектр характеристик о любом мягком биологическом или твёрдом образце. АСМ в сочетании с конфокальной микроскопией часто используется для изучения, например, клеток млекопитающих и зоопланктона. Такой подход позволяет заранее определять зоны, в которых будет проводиться тщательное последующее изучение рельефа поверхности, а также сопоставлять полученные результаты с имеющимися оптическими изображениями [30].

### **1.1.2 МСМ**

#### **1.1.2.1 Принцип работы**

Магнитно – силовой микроскоп (МСМ) был изобретен для исследования локальных магнитных свойств образцов. Он представляет собой атомно – силовой микроскоп, у которого зонд покрыт слоем ферромагнитного материала с удельной намагниченностью  $\vec{M}(\vec{r})$  (рис.5) [28].





**Рисунок 5.** Зонд МСМ в магнитном поле образца [28].

Во время работы зонд, покрытый ферромагнетиком, перемещают вблизи поверхности образца, регистрируя силы взаимодействия с ним. Для перемещения зонда относительно исследуемой поверхности так же, как и в АСМ используется прецизионный трехкоординатный микроманипулятор – пьезоэлемент [31].

### **1.1.2.2 Метод получения информации**

Важной особенностью при работе с МСМ является необходимость прохождения зондом во время сканирования образца по одному и тому же месту дважды. Первый раз необходим для определения профиля исследуемой поверхности. Зонд движется по поверхности образца в контакте с ним. При первом проходе магнитные свойства не оказывают никакого влияния на траекторию движения зонда. Во время второго прохода зонд движется по той же траектории и над тем же участком поверхности, что и во время первого, но происходит это уже на расстоянии 10 – 50 нм. На таком расстоянии универсальное Ван-дер-Ваальсово притяжение затухает, и остаются только дальнедействующие магнитные силы. Таким образом, отклонение иглы от заранее обусловленной траектории будет определяться именно магнитными свойствами исследуемого образца [31].

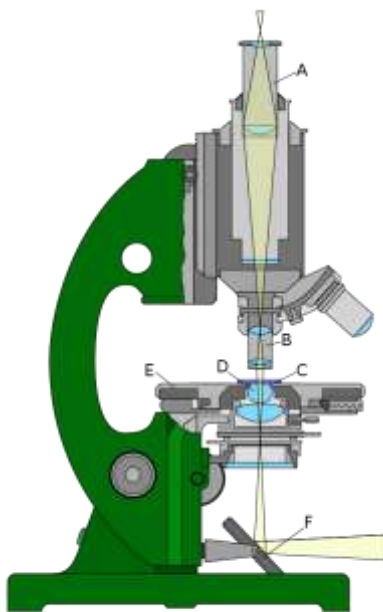
### **1.1.2.3 Область применимости МСМ**

МСМ применяют при разработке и конструировании магнитных носителей информации — магнитных лент, винчестеров, магнитооптических дисков и пр. Он позволяет увидеть в материале отдельные магнитные области (до 10 нм). Кроме того, МСМ можно использовать для магнитной сверхплотной записи информации, а также для исследования бактерий, обладающих магнетосомами – образованиями, сформированными цепочками из кристаллов, представляющих собой постоянные магниты, например, *Aquaspirillum magnetotacticum* [31].

Однако, так же, как и АСМ, МСМ не позволяет проводить какие-либо оптические исследования изучаемых структур, у МСМ нет никаких инструментов, способных реализовать химический анализ образцов. Поэтому наиболее рациональным решением, так же, как и в случае с АСМ, является комбинация МСМ с другими инструментами исследования для получения наиболее полной характеристики исследуемых образцов.

## 1.2 Методы оптической микроскопии

Оптическая микроскопия – один из самых разносторонних и распространённых методов исследования. Посредством оптической микроскопии исследуют как не прозрачные объекты, так и прозрачные биологические. Методы оптической микроскопии широко варьируются в зависимости от источника освещения, способа его доведения до образца, а также наличия различных промежуточных элементов в конструкции микроскопа. Тем не менее, все оптические микроскопы обладают схожей конструкцией. Общая схема устройства оптического микроскопа представлена на рисунке 6.



**Рисунок 6.** Общая схема элементов оптического микроскопа: А — окуляр; В — объектив; С — объект; D — конденсор; Е — предметный столик; F — зеркало.

Главной характеристикой любого оптического микроскопа (ОМ) является его разрешающая способность, которую можно определить из уравнения:

$$d = 1.22(\lambda/2 * NA), \quad \text{где}$$

**d** – расстояние между двумя соседними элементами изображения;

$\lambda$  – длина волны;

**NA** – числовая апертура объектива микроскопа [32].

Физический смысл данного уравнения заключается в том, что формируемое посредством объектива изображение представляет собой дифракционный диск Эйри (рис.7). Причём чем больше числовая апертура объектива, тем больше размер диска Эйри, т.к. изображение в таком случае составлено из большего количества пучков. Несколько элементов изображения возможно

отличить друг от друга только в том случае, когда центр диска Эйри одного из них отстоит от первого дифракционного минимума другого на расстоянии большем и равном радиусу первого дифракционного минимума [32].



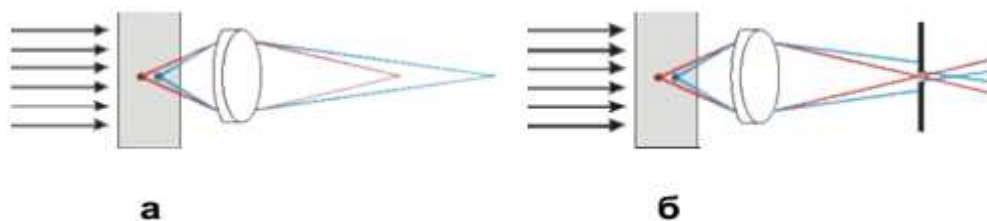
**Рисунок 7.** На рисунке показаны зависимости размеров дисков Эйри и относительной интенсивности дифракционных изображений от числовой апертуры объективов. От (а) к (с) числовая апертура растёт; (d) – интенсивности двух дифракционных изображений находятся на пределе разрешения; (e) – интенсивности двух дифракционных изображений перекрываются [32].

В данной работе будет использован метод флуоресцентной конфокальной и поляризационной ОМ. Эти методики будут расписаны в подробностях ниже.

### 1.2.1 Флуоресцентная конфокальная микроскопия

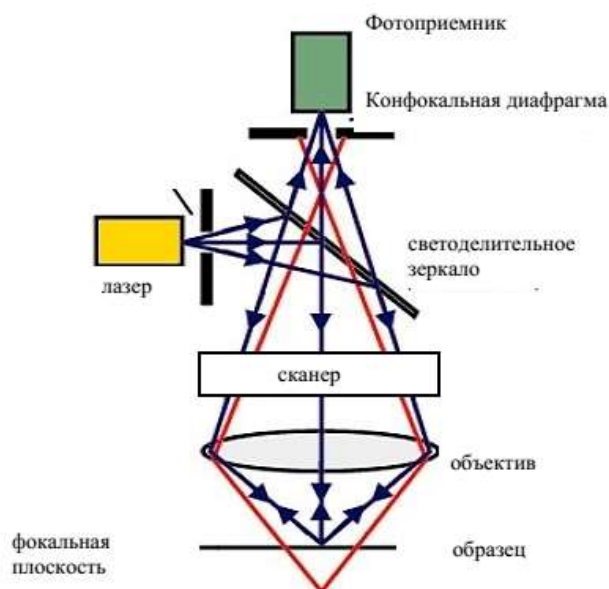
Главной характерной чертой конфокального микроскопа (КМ) является увеличенная контрастность изображения в сравнении с другими световыми ОМ. Она реализуется за счёт фильтрации внефокусных лучей, «загрязняющих» изображение в обычном светом ОМ. Фильтрация внефокусных лучей в КМ осуществляется посредством специальной диафрагмы, расположенной в плоскости промежуточного изображения (рис.8). Такая диафрагма пропускает лишь лучи, исходящие из крайне малой области исследуемого объекта, причём чем меньше диафрагма, тем, соответственно, меньше эта область. Изображение всего объекта целиком при таком подходе получают посредством снятия изображений всех элементарных объёмов,

умещающихся в нём, и последующем их накоплении с использованием электронных запоминающих устройств и фотоприёмников [33].



**Рисунок 8.** (а) – внефокусные лучи в обычном световом ОМ; (б) – фильтрация внефокусных лучей с помощью специальной диафрагмы в конфокальном микроскопе [33].

В качестве источника света в современных КМ используются лазеры, которые в сравнении со светом обычной лампы, обладают крайне высокой монохроматичностью и интенсивностью излучения. При этом вся система такого микроскопа регулируется и управляется посредством компьютера. КМ, источником света в которых является лазер, называют лазерными сканирующими конфокальными микроскопами (ЛСМК). На рисунке 9 представлена общая оптическая схема ЛСМК.



**Рисунок 9.** Общая оптическая схема ЛСМК.

ЛСМК позволяют получать так называемый «оптический срез» - изображение с очень тонкого слоя исследуемого объекта. Причём, толщина этого среза варьируется зависимо от диаметра конфокальной диафрагмы и может быть выражена как:

$$\Delta Z_{cp} = ([0.88 \times \lambda_{фл} / (n - (n^2 - A^2)*0.5)]^2 + 2 \times n^2 \times (D/\Gamma)^2 / A^2)*0.5, \quad \text{где}$$

$\Delta Z_{\text{ср}}$  – толщина оптического среза;

$\lambda_{\text{фл}}$  – длина волны испускания флуоресценции;

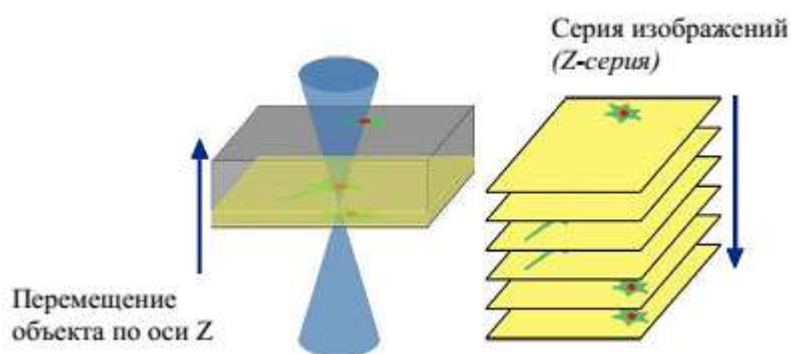
$A$  – числовая апертура объектива;

$n$  – показатель преломления иммерсионной среды между объективом и покровным стеклом препарата;

$\Gamma$  – увеличение оптической системы микроскопа между фокальной плоскостью объектива и сопряженной фокальной плоскостью, в которой расположена конфокальная диафрагма;

$D$  – диаметр конфокальной диафрагмы [34].

Кроме того, ЛСМК позволяет проводить объёмную реконструкцию объекта и построение, соответственно, его трёхмерного изображения (рис.10).



**Рисунок 10.** Принцип построение трёхмерного изображения с помощью ЛСМК. Образец перемещают вдоль вертикальной оси  $Z$ , получая при этом последовательную серию изображений исследуемого объекта. Затем эти изображения накладываются друг на друга.

Таким образом происходит объёмная реконструкция исследуемого образца [33].

Ещё одним достоинством ЛСМК является возможность анализа флуоресценции исследуемого объекта, причём современные ЛСМК зачастую обладают несколькими фотоприёмниками, что позволяет получать изображения сразу в нескольких спектральных областях. Таким образом, появление ЛСМК сильно упростило исследование различных меченных разными флуорофорами биологических объектов [33].

Кроме того, на базе ЛСМК реализовано множество различных методик исследования, позволяющих повысить качество изучения того или иного объекта. К таким методикам можно отнести, например, FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), в которой за счёт диффузии молекулы из необлучённой зоны образца движутся в его облучённую зону, и по времени нарастания флуоресценции этой зоне определяется подвижность исследуемых молекул;

или FRET (Forster Resonance Energy Transfer), в которой за счёт эффекта резонансной передачи энергии от донора к акцептору на малых расстояниях (в районе 10 нм) определяется расстояние между исследуемыми молекулами [33].

Однако, как и для любого другого оптического прибора, для ЛСКМ актуален ряд ограничений, свойственный таким приборам, например, дифракционные эффекты, зависящие от длины волны излучения. А это значит, что разрешающая способность такого микроскопа ограничена (максимальное расстояние между двумя точками, которые всё ещё возможно различать, примерно 200 – 300 нм) [33].

### 1.2.2 Поляризационная оптическая микроскопия

Поляризационная микроскопия (ПМ) возникла благодаря существованию явления двулучепреломления. Данное явление характерно для анизотропных кристаллов и заключено в том, что их показатель преломления меняется в зависимости от направления оптических осей поляризуемости самого кристалла. Иначе говоря, оптические свойства таких кристаллов различны в разных направлениях. При вхождении луча в такой кристалл, этот луч разделяется на два, причём эти лучи характеризуются различной скоростью распространения. Такие лучи принято делить на ординарный, для которого скорость никак не зависит от направления, и экстраординарный, для которого зависимость скорости от направления существует. Величину двулучепреломления определяет соотношение:

$$B = n_{\max} - n_{\min}, \quad \text{где}$$

$n_{\max}$  – максимальный показатель преломления;

$n_{\min}$  – минимальный показатель преломления.

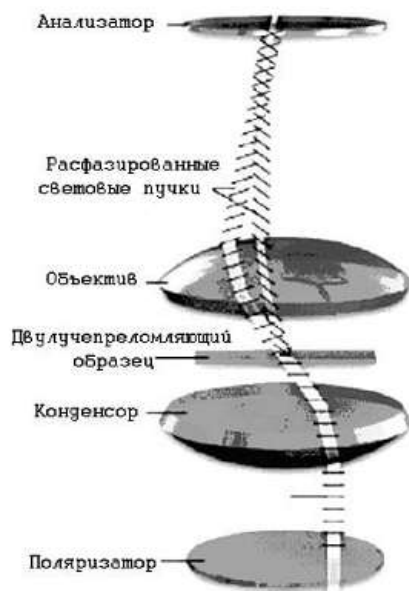
При этом между ординарным и экстраординарным лучами существует разность хода, увеличивающаяся по мере увеличения толщины кристалла и описанная формулой:

$$\Gamma = t (n_{\max} - n_{\min}), \quad \text{где}$$

$t$  – толщина кристалла.

На рисунке 11 представлена общая схема поляризационного микроскопа. На образец с помощью конденсора направлен свет, предварительно прошедший через поляризатор. При прохождении через анизотропный образец, как уже было сказано выше, свет расщепляется на два разных луча, характеризующихся определённой разностью хода. Затем эти лучи собираются в фокусе объектива, где анализатор сводит их в одну плоскость для того, чтобы эти лучи смогли

между собой интерферировать. Оптические оси поляризатора и анализатора скрещены под углом  $90^\circ$ , что способствует повышению контраста. При этом важно понимать, что цвет образца, наблюдаемого в микроскоп, является лишь результатом интерференции, а не реальным цветом исследуемого объекта [32].



**Рисунок 11.** Принципиальная схема устройства поляризационного микроскопа [32].

Поляризационная микроскопия является крайне полезным инструментом исследования различных биоструктур. Это связано с тем, что большинство из них характеризуются сильной прозрачностью и при этом, зачастую, представляя собой сложные структурные композиции, являются анизотропными объектами.

### 1.2.3 Область применимости

Наиболее успешными областями применения как ЛСМК, так и ПМ являются биологические и медицинские исследования. Тем не менее для каждой из этих методик присутствует ряд ограничений. На ЛСМК невозможно исследовать прозрачные объекты, а ПМ подходит лишь для анизотропных материалов. Кроме того, поскольку это оптические приборы, также присутствует дифракционное ограничение на разрешающую способность микроскопов. Таким образом, наиболее рациональным подходом является объединение данных методик с методиками СЗМ, позволяющими осуществлять подробный анализ рельефа исследуемых материалов на атомарном уровне.

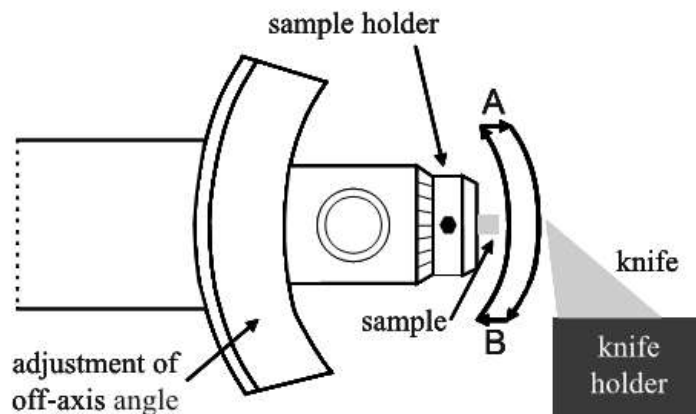


### **1.3 Микротомия**

Микротомия представляет собой один из методов пробоподготовки для световой и просвечивающей электронной микроскопии. Уже с 1950 года микротомия широко использовалась при подготовке мягких материалов. А в 1970-е годы, благодаря появлению коммерчески доступных алмазных ножей, её стали использовать и для пробоподготовки твёрдых образцов. Более того, в связи с тем, что при подготовке образцов методом микротомии будущий предмет исследования не подвергается облучению и химическому смешиванию, а также с тем, что этот метод позволяет в короткие сроки изготавливать большое количество срезов одинаковой толщины, микротомия успешно вытеснила такие ранее популярные методы пробоподготовки как механическое или ионное размельчение [35]. Сегодня микротомия является стандартной методикой для подготовки ультратонких срезов, а также для выравнивания поверхности пластиковых, биологических и биомедицинских образцов [36].

#### **1.3.1 Механизм секционирования**

Для изготовления тонких срезов образцов (секционирования) в любом микротоме используется специальный нож. Такой нож бывает нескольких типов: стеклянным или алмазным. Для проведения процедуры секционирования образец помещают на специально предназначенный для этого держатель, который затем в течение каждого цикла секционирования перемещается на заранее определённое расстояние к ножу микротомы. Как конкретно движется образец относительно ножа микротомы в процессе изготовления среза показано на рисунке 12 [36].



**Рисунок 12.** Принципиальная схема перемещения образца относительно ножа в процессе изготовления тонкого среза (секционирования). **A** – движение вперед: **A→B** – разрезание; **B** – движение назад: **B→A** – движение вверх. Длина “**A**” = длина “**B**” + “толщина сечения” [36].

Во время движения образца из “**A**” в “**B**” (рис.12) осуществляется разрез, толщина которого равна разности “**A**” и “**B**”. При этом надо понимать, что на толщину среза также оказывают влияние тип и качество ножа, которым осуществляется срез, его угол наклона и, конечно же, свойства самого секционируемого материала. Все микротомы позволяют регулировать скорость секционирования, а современные микротомы также оснащены видеомикроскопами и компьютерами, позволяющими отображать и осуществлять запись параметров секционирования [36].

### 1.3.2 Виды микротомов

В зависимости от желаемого конечного результата и ограничений по температуре, при которой необходимо работать с образцом, применяются разные типы микротомов. И, хотя, общая механика осуществления среза для всех микротомов одинакова, всё же для каждого из них существуют свои особенности и рамки применимости. К основным типам микротомов относят обычный микротом, ультрамикротом (УМ), а также криомикротом (КМ) и криоультрамикротом (КУМ) [36].

Обычный микротом позволяет делать тонкие (>5 мкм) и полутонкие (0,5 – 5 мкм) срезы при комнатной температуре. Такие срезы, а также выровненные за счёт осуществления среза поверхности можно использовать для дальнейшего исследования методами СЗМ, ЭМ и ОМ [36].

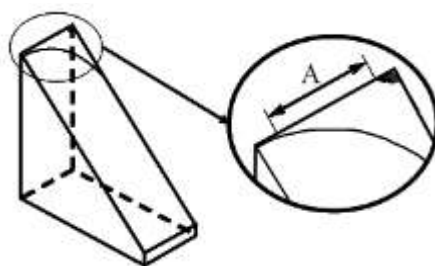
Ультрамикротом позволяет делать полутонкие срезы с толщиной 0,2 – 3 мкм и ультратонкие с толщиной <0,2 мкм. Такие срезы и выровненные за счёт таких срезов поверхности точно так же можно в дальнейшем изучать методами СЗМ, ЭМ и ОМ [36].

Ещё одним отдельным типом микротомов являются КМ и КУМ. Такие микротомы обычно используют в том случае, когда материал, секционирование которого необходимо провести, мягкий, а предварительная химическая подготовка материала по каким бы то ни было причинам не желательна. В таких микротоме и нож, и сам материал охлаждаются при помощи жидкого азота. Нижний предел температуры может достигать  $-185^{\circ}\text{C}$ . Толщина получаемых при помощи таких микротомов срезов соответствует толщине срезов микротоме и УМ. Исследование срезов и выровненных поверхностей можно осуществлять методами СЗМ, ЭМ и ОМ [36].

### 1.3.3 Ножи для микротомов

Существует два основных типа ножей для микротомов: стеклянные и алмазные. Каждый из них обладает как преимуществами, так и недостатками. Выбор того или другого ножа определяется стоимостью этого ножа или материалом, секционирование которого необходимо провести [36].

Стеклянные ножи представляют собой острые стеклянные призмы, изготовленные из специального вида стекла. Обычный коммерчески доступный стеклянный нож характеризуется длиной, равной 400 мм, шириной, равной 25 мм и толщиной, равной 6,4, 8 или 10 мм. Необходимая толщина ножа определяется исходя из свойств секционируемого материала (его природы и размера) и плана дальнейшего микроскопического исследования. На рисунке 13 показана острая сторона стеклянного ножа, используемого для получения тонких и ультратонких срезов. [36].



**Рисунок 13.** На рисунке показано остриё стеклянного ножа (А), которым выполняют тонкие и ультратонкие срезы материалов [36].

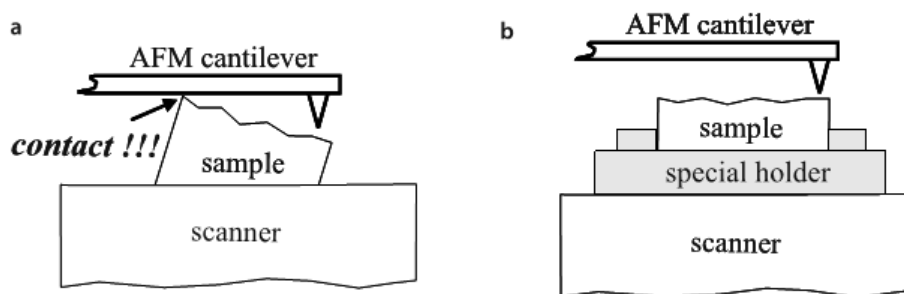
Алмазные ножи изготавливают из природных алмазов. По сравнению со стеклянными ножами, алмазные ножи характеризуются меньшим углом наклона относительно образца, что значительно уменьшает выгибание и сжатие секционируемого материала. Кроме того, т.к. алмаз является наиболее твёрдым материалом на сегодняшний день, то ему под силу разрезать любой материал, а при аккуратном применении такой нож может быть использован в течение гораздо

более длительного периода времени, нежели стеклянный. Главным и, пожалуй, единственным минусом алмазных ножей является их высокая стоимость в сравнении с их стеклянными вариантами, однако качество выполняемых ими срезов, а также долгий срок службы обычно перекрывают разовые затраты на покупку алмазного ножа [36].

#### **1.3.4 Современные модификации микротомов**

Один из современных вариантов модификации микротомов был предложен компанией Diatome Ltd. (Biel, Switzerland). Он заключается в использовании осциллирующего алмазного ножа, который за счёт движения назад-вперёд во время секционирования снижает давление, оказываемое на секционируемый материал, уменьшая, таким образом, усадку полученных срезов [36].

Другой модификацией стал специальный держатель образцов, разработанный компанией Leica Microsystems. В тех случаях, когда микротомированную поверхность необходимо в дальнейшем исследовать с помощью АСМ, во избежание нежелательного соприкосновения кантилевера с образцом и возможным его механическим травмированием крайне важным условием является параллельное выравнивание этой поверхности. Leica разработали специальный миниатюрный держатель для образцов, устанавливающийся внутрь стандартного держателя, которым оборудованы все микротомы. Ключевым моментом является то, что эту же подложку можно переносить вместе с микротомированной поверхностью в АСМ, минимизируя, таким образом, возможность нежелательного соприкосновения кантилевера с образцом (рис.13) [36].



**Рисунок 13.** На рисунках изображён перенос ультрамикротомированной плоской поверхности из микротомата в держатель образца в АСМ. (а) - вариант переноса с высоким уровнем риска нежелательного и вредоносного контакта кантилевера с образцом; (b) - перенос вместе со специальным держателем, разработанным компанией Leica Microsystems [36].

### 1.3.4 Предварительная подготовка материалов к секционированию

Как уже стало ясно, для секционирования какого-либо материала этот материал должен быть относительно твёрдым. А именно этот материал должен быть твёрдым настолько, чтобы его возможно было разрезать, не деформируя ни сам образец, ни его срез. В связи с этим все мягкие биологические, биомедицинские и полимерные образцы необходимо предварительно обрабатывать.

Один из способов такой обработки уже был описан выше – обработка жидким азотом. Но данный способ возможно реализовать лишь при наличии какого-либо из криомикротомов. К тому же, часто необходимы более долговечные и простые в хранении и транспортировке срезы материалов. В таком случае используют другой тип предварительной обработки.

Другим и, пожалуй, наиболее распространённым вариантом является способ предварительной обработки материала посредством помещения его в стабильную среду, никак не взаимодействующую с самим материалом. Обычно используют три разных типа сред: эпоксидные смолы, полиэфировые смолы и метакрилаты. Определяющим фактором при выборе среды зачастую являются то, насколько удобно заключённый в неё материал будет секционировать, степень прозрачности этой среды, а также её устойчивость в условиях высокого вакуума и, в случае последующего исследования методами ЭМ, устойчивость к воздействию электронного пучка. В связи с этим общие технологии подготовки того или иного образца в основном отсутствуют, т.к. индивидуальные рецептуры сред и методик их нанесения дают гораздо более качественные результаты [36].

### **1.3.2 Область применения**

Подводя итоги, можно отметить, что наиболее широкое применение микротомия нашла в подготовке тонких срезов мягких биологических и биомедицинских материалов, а также полимеров. Тем не менее, данный метод также успешно применим и для изготовления срезов твёрдых материалов, например срезов меди, алюминия, стали, керамики и даже сапфиров и карбидов [36].

Однако, важно отметить, что так как микротомия является лишь одним из вариантов пробоподготовки, то она по определению не может иметь самостоятельный характер. Микротомия – замечательный инструмент, облегчающий и вообще делающий возможным исследование большой разновидности материалов всеми методами СЗМ, ЭМ и ОМ.

## 1.4 Современные подходы корреляционной микроскопии

К наиболее известным на сегодняшний день подходам в организации схем корреляционной микроскопии относятся: ОМ–ЭМ, АСМ–ОМ/ЭМ, СЗНТ и, наконец, СЗНТ–ОМ. Далее будут кратко описаны особенности и основные недостатки присущие каждому из этих подходов. Для облегчения понимания логики устройства каждой последующей корреляционной схемы, а также для возможности оценки общей динамики развития корреляционной микроскопии, все указанные выше методы описаны в хронологическом порядке.

### 1.4.1 ОМ–ЭМ

В течение многих лет оптическая и электронная микроскопия были двумя абсолютно отдельными техниками, никак совместно не использующимися. Это было связано, в том числе, с тем, что технология работы и методики пробоподготовки исследуемых образцов сильно различались, начиная от фиксации формалином или осаждением ацетоном/метанолом и заканчивая высокотехнологичными схемами криоподготовки. Кроме того, почти что не было специалистов, владеющих обоими этими методами исследования. И хотя и ОМ и ЭМ хорошие и информативные методики визуализации, для каждой из них существуют свои минусы и плюсы, а также ряд специфичных ограничений [37].

Основным применением ОМ является идентификация и локализации мелких объектов, являющихся предметом изучения, в больших объёмах исследуемого образца. Электронную же микроскопию обычно используют для исследования их структурных деталей [38]. Существенным плюсом ЭМ является высокое пространственное разрешение, позволяющее напрямую распознавать клеточные компоненты. Тем не менее, ограниченное поле зрения и невозможность исследования "живого" материала накладывают весомые ограничения на данный метод исследования. Кроме того, многие мягкие биологические образцы и полимеры крайне чувствительны к радиационному излучению, оказываемому пучком электронов ЭМ. Оптическая же микроскопия позволяет проводить исследования в режиме реального времени с использованием, например, меченых флуорофорами молекул. Однако по уровню пространственного разрешения любой вид ОМ однозначно уступает ЭМ. ОМ не позволяет получать информацию о полной клеточной структуре исследуемых материалов [37].

Применяя корреляционную схему, включающую в себя одновременно как ОМ, так и ЭМ возможно быстро и беспрепятственно получить подробную информацию об интересующих объектах, локально распределённых по большому участку исследуемого материала [38]. Впервые ОМ и ЭМ были успешно объединены в одну корреляционную схему для изучения микротрубочек в клетках PtK2 в 1978 году [39,40].

#### **1.4.1.1 Особенности пробоподготовки биологических образцов для исследования их корреляционной схемой ОМ – ЭМ**

Так как биологические образцы характеризуются высокой степенью дисперсности компонент, из которых они состоят, именно для их исследования в первую очередь используется корреляция оптического и электронного микроскопов. Как уже было сказано выше методики пробоподготовки образцов для ОМ и ЭМ сильно разнятся, однако общим моментом, пожалуй, можно считать необходимость предварительного мечения интересующих компонентов исследуемого образца флуорофорами (в случае исследования на ОМ) или наночастицами, усиливающими контрастность меченных ими участков на изображении (в случае исследования на ЭМ) [37].

Сегодня уже разработана широкая база методик пробоподготовки, позволяющих подготовить образец таким образом, чтобы его возможно было исследовать посредством корреляционной схемы ОМ-ЭМ. Самым простым способом является маркировка тонких и ультратонких секций образца, полученных с помощью микротомы. Он реализуется посредством химической фиксации и добавления метакрилата, крио-фиксацией, низкотемпературным замещением или крио-секционированием по методу Токуяшу. Выбор того или иного способа реализации маркировки срезов образца зависит от целей исследования и материала исследования, однако зачастую наиболее впечатляющие результаты можно увидеть, исследуя образцы, подготовленные по различным крио-методикам [37].

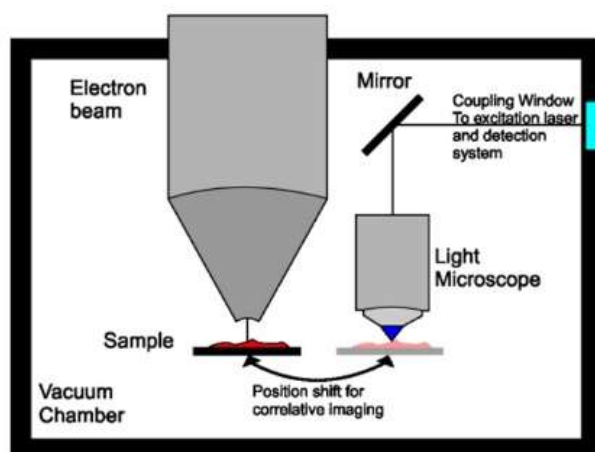
#### **1.4.1.2 Техническая сторона корреляционной схемы ОМ - ЭМ**

Корреляцию ОМ и ЭМ возможно осуществить с любым флуоресцентным ОМ и ЭМ. Впервые идея комбинации двух этих типов микроскопов появилась в 1982 году [41]. Прибор был собран и уже использовался в простой диагностике типовых хирургических патологий. Однако собранный прибор никогда не был коммерциализирован, и со временем про него забыли [37].

Впоследствии идея создания корреляционной схемы ОМ-ЭМ была развита группой профессоров Арье Верклея и Ганса Геррицена из Университета Утрехта. Именно они сконструировали первую полноценно функционирующую корреляционную схему ОМ-ЭМ на базе лазерного ОМ, к которому через боковой порт под углом 90° к стержню держателя образца была присоединена двойная линза электронного микроскопа фирмы FEI Company (Eindhoven, Netherlands) [42].



В разработанной ими схеме меченые флуоресцентными маркерами секции исследуемого образца загружаются в микроскоп под углом  $90^\circ$  относительно направления электронного пучка. Затем посредством лазерного ОМ, включённого в схему можно визуализировать флуоресценцию этих секций в вакууме. Данные о распределении флуоресценции внутри секции сохраняются, после чего держатель с образцом проворачивается таким образом, что оказывается непосредственно под электронным пучком (рис.14).



**Рисунок 14.** Схема вакуумной камеры сканирующего ЭМ с развязывающей оптикой для корреляционной ОМ [5].

Таким образом происходит исследование интересующих областей уже посредством электронной микроскопии. Распределение флуоресценции, получаемое на первом этапе работы, по сути используется в качестве карты, по которой исследователь может определять те элементы секции, которые ему интересны больше всего. Важным моментом является то, что исследование распределения флуоресценции обязательно должно быть произведено перед воздействием на образец пучком электронов, т.к. после определённой дозы излучения уже будет нельзя наблюдать специфическую флуоресценцию на облучённом участке [37].

### 1.4.1.3 Преимущества и недостатки корреляционной схемы ОМ – ЭМ

Корреляция ОМ и ЭМ сильно облегчила исследование многих структур, особенно биологических. Однако многие биологические и полимерные образцы сильно чувствительны к радиационному излучению. Таким образом во время исследования разного рода мягких материалов на них оказывается повреждающий эффект, что является однозначным минусом. Кроме того, по этой причине подготовленные для исследования образцы затруднительно использовать многократно. Ещё одним недостатком данной корреляционной схемы является отсутствие 3D изображения. Таким образом, исследователи вынуждены использовать двумерные

проекции трёхмерных образцов, что также накладывает ограничения на применение данной корреляционной схемы для исследования некоторых биологических объектов [9-11].

Однозначным плюсом является преодоление проблемы с определением интересующих внутри исследуемой секции зон. При использовании ОМ и ЭМ по отдельности необходимо наносить на образец как флуоресцентные маркеры, так и усиливающие контрастность изображения наночастицы. Кроме того, образец может быть повреждён при переносе или положен не той стороной, что также затруднит дальнейшее его исследование. При объединении ОМ с ЭМ в один прибор, во всём этом нет необходимости. Исследуемую секцию достаточно пометить флуоресцентными маркерами, чтобы получить карту интересующих зон, которую посредством специальной программы можно совместить с изображением, полученным на ЭМ, включённом в корреляционную схему [5].

#### **1.4.2 АСМ–ОМ/ЭМ**

Каждый из микроскопических методов исследования в отдельности не в состоянии предоставить исчерпывающую информацию об исследуемом объекте [4]. Выше уже была описана схема первого корреляционного микроскопа, включающего в себя ОМ и ЭМ. В данном разделе будет говориться о логичном развитии данной схемы.

Итак, следующим шагом в эволюции корреляционной микроскопии является включение в корреляционную схему ОМ - ЭМ ещё и АСМ (АСМ–ОМ/ЭМ), а также замена обычного флуоресцентного ОМ, на высокоразрешающий. Такая схема способна с одной стороны предоставить подробную информацию об исследуемой структуре на клеточном уровне, а с другой – изучить эту же структуру в нанометровом масштабе [43].

Для реализации данной корреляционной схемы, необходимы высокоразрешающий ОМ (STED – микроскоп), АСМ и ПЭМ или СЭМ. Оптическая составляющая обеспечивает возможность идентификации составных (высокодисперсных) клеточных объектов (молекул и органелл), в том числе в наномасштабе (до 10 нм), на фиксированных и живых клетках; АСМ обеспечивает данными о топографии и эластичности как зафиксированных, так и живых клеток; ЭМ, в свою очередь, позволяет в подробностях разглядеть ультраструктуру исследуемого объекта, однако только в фиксированных клетках [43].

Технология пробоподготовки в целом совпадает с таковой в разделе **1.4.1.1**, поэтому отдельно на этом в данном разделе внимание заостряться не будет.

### **1.4.2.1 Техническая сторона корреляционной схемы АСМ–ОМ/ЭМ**

Построение корреляционной схемы, включающей в себя три разных вида микроскопов, можно разбить на несколько этапов [43].

Первый шаг заключается в корреляции STED с АСМ. Он представляет собой крайне точную калибровку пропорций STED изображения и положения иглы кантилевера АСМ посредством x-y пьезосканера. Калибровка происходит в полуавтоматическом режиме в результате перемещения иглы кантилевера по матрице с площадью 30 мкм<sup>2</sup>. Контроллер АСМ последовательно посылает сигнал транзистор-транзисторной логики (ТТЛ) на контролер STED для захвата иглы кантилевера АСМ. Захват выполняется в режиме отражения при возбуждении лазером и работе фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Важным моментом является то, что размер и разрешение калибровочных изображений должны соответствовать последующим экспериментальным изображениям. После всего вышеперечисленного пользователь позиционирует местоположение иглы кантилевера на одном изображении, в результате чего по специальному алгоритму происходит автоматическое опознавание положения иглы на остальных изображениях. В результате всех этих манипуляций программное обеспечение АСМ будет иметь возможность импортировать и преобразовывать каждое STED изображение, задавая его ориентацию и размер, подходящие для дальнейшего сканирования АСМ [43].

Следующий шаг заключается в осуществлении корреляционной связи между уже скоррелированными АСМ и STED с ЭМ. После получения изображения на АСМ и STED, образец обрабатывают таким образом, чтобы он был пригоден для исследования методом ЭМ. Для компенсации растяжения/сжатия исследуемого материала в результате пробоподготовки, изображения, полученные с ЭМ, линейно или не линейно растягивают соответственно деформации материала [43].

### **1.4.2.2 Преимущества и недостатки корреляционной схемы АСМ–ОМ/ЭМ**

К минусам данной схемы можно отнести частные недостатки включённых в корреляционную схему микроскопов, не перекрывающиеся другими составляющими схемы. К ним можно отнести, например, слабую возможность обнаружения АСМ очень мягких объектов, а также мелких и глубоко расположенных внутри клетки объектов. Данная проблема по большей степени возникает из-за присутствия плазматической мембраны, цитоплазмы и цитоскелета. Для некоторых биологических объектов возможно решение данной проблемы путём удаления плазматической мембраны и цитоплазмы. Тем не менее для многих других объектов, например, для клеточных органелл и бактерий, такое решение не приемлемо, в связи с тем, что они содержат

вакуоли, которые легко можно повредить в результате подобной процедуры. Также, в связи с тем, что в данной схеме присутствует ЭМ, биологические и мягкие полимерные материалы необходимо исследовать однократно и максимально быстро, ведь электронный пучок микроскопа оказывает повреждающий эффект на данный вид материалов [43]. Кроме того, несмотря на наличие возможности 3D реконструкции, важно понимать, что доступная в данной корреляционной схеме 3D информация относится лишь к поверхностному слою исследуемых образцов [44].

Плюсами данной схемы является возможность получения вместе со всеми данными, доступными для схемы ОМ – ЭМ, данных о топографии образца, его эластичности и вязкости его мембраны, а также повышенное разрешение оптической составляющей [43].

### **1.4.3 СЗНТ**

Несмотря на то, что совмещение АСМ, ОМ и ЭМ в одной корреляционной схеме позволило получать довольно широкий объём информации об исследуемом материале, вопрос трёхмерной микро- и наноструктурной характеристики объектов всё ещё оставался открытым. Все перечисленные выше подходы, как уже было указано, хотя и имели возможность 3D визуализации, осуществляли её лишь на поверхностном слое, в то время как для составления полного представления о структуре и свойствах исследуемого объекта исследователю необходимо понимать его трёхмерную наноморфологию, распределение нано- и микропор, а также разного рода нановключений в общем объёме исследуемого материала [44].

Решением проблемы отсутствия полноценной информации о 3D структуре исследуемых материалов стала комбинация СЗМ, УМ и криокамеры в единой корреляционной схеме. Схема, при которой все вышеперечисленные составляющие объединены в один прибор, получила название – сканирующая зондовая нанотомография (СЗНТ). СЗНТ позволяет осуществлять анализ трёхмерной морфологии разного рода био- и синтетических материалов с наноразмерным разрешением. Для получения максимально тонких срезов на УМ используется алмазный нож с шириной режущей кромки 3 мкм. Пробоподготовка образцов для исследования методом СЗНТ осуществляется в соответствии с методикой пробоподготовки для УМ [44].

#### **1.4.3.1 Принцип работы СЗНТ**

Принцип работы СЗНТ заключается в последовательном анализе каждого произведённого посредством УМ среза методом СЗМ. Важным моментом является то, что СЗНТ позволяет

исследовать образец, не передвигая его, сразу же после получения сверхтонкого среза в рабочем цикле УМ [44].

Для получения изображения одного и того же участка поверхности сперва производят последовательные срезы исследуемого объекта с заранее заданной толщиной (от 20 нм). Затем для каждого среза строго последовательно осуществляют исследование морфологии поверхности и карт распределения физических свойств СЗМ [44].

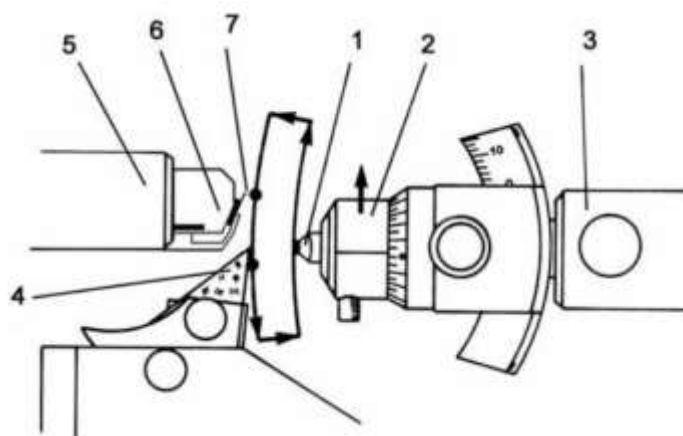
#### **1.4.3.2 Техническая сторона СЗНТ**

Экспериментальная установка для СЗНТ изображена на рисунке 15. Всего существуют две основные конфигурации для установки СЗНТ: одна представляет собой СЗНТ со сканирующим зондом, а другая – СЗНТ со сканированием образцом [44].



**Рисунок 15.** Экспериментальная установка для СЗНТ Ntegra [44].

В конфигурации, представленной на рисунке 15, острие зонда СЗМ сканирует поверхность блока посредством горизонтально ориентированного сканера с пьезотрубками в диапазоне сканирования 100 x 100 x 10 мкм (рис. 16) [44].



**Рисунок 16.** Схематическое изображение комбинации измерительной системы СЗМ и режущей части микротома. 1 – образец; 2 – держатель образца; 3 – подвижная консоль ультрамикротома; 4 – нож ультрамикротома; 5 – сканер СЗМ; 6 – держатель зонда СЗМ; 7 – СЗМ зонд [44].

Выравнивание изображений каждого из полученных срезов, а также визуализация воксельных 3D изображений происходит автоматически при помощи программы Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., США) с опцией 3D Constructor. Такая установка позволяет проводить исследование трёхмерных структур с использованием контактной и полуконтактной АСМ, латерально – силовой микроскопии, метода отображения фазы, а также контактного метода рассогласования и МСМ. К недостаткам данной конфигурации можно отнести значительную ошибку возвращения СЗМ – зонда в ту же точку поверхности в плоскости ХУ после среза (до 5 мкм); ограниченный оптический доступ к зоне измерений, а также ограничение по скорости сканирования пьезотрубочного сканера [44].

Рассмотрим другую конфигурацию установки СЗНТ, в которой сканирование происходит образцом, а не сканирующим зондом. Фото установки СЗНТ в такой конфигурации представлено на рисунке 17 [44].



*Рисунок 17.* Система СЗНТ со сканированием образцом [44].

В такой конфигурации образец закреплён на XYZ плоском пьезостейдже с возможностью быстрого сканирования в диапазоне 50 x 50 x 5 мкм. Пьезостейдж оснащён специальными оптическими датчиками позиционирования. При такой конфигурации на подвижной консоли УМ установлены измерительная голова СЗМ с держателем зонда, полупроводниковый лазер и 4-секционный фотодиод. Такое устройство системы СЗНТ позволяет сократить время измерений, повышая, тем самым, эффективность 3D реконструкций наноструктур исследуемых образцов [44].

#### **1.4.3.3 Преимущества и недостатки СЗНТ**

Главным достоинством технологии СЗНТ является возможность получения наномасштабной 3D реконструкции исследуемых материалов во всём объёме образца, а не только на его поверхности. СЗНТ позволяет получать уникальную информацию о наноструктуре и функциональной активности клеток, тканей и синтетических материалов [44]. Эта технология может быть использована для исследования 3D распределения модуля упругости, вязкости, магнитных свойств, а также электропроводности как при комнатной температуре, так и в криокамере УМ [45]. С помощью СЗНТ можно крайне подробно изучить структуру разного рода волокон, клеток, а также биомедицинских микроустройств, вроде кодированных КТ и МНЧ микросфер [44].

Основным недостатком СЗНТ является отсутствие возможности спектрального анализа исследуемых структур, а также отсутствие оптической составляющей [44].

СЗНТ ознаменовало собой прорыв в корреляционной 3D микроскопии. Однако, несмотря на крайне качественную 3D визуализацию исследуемых объектов, технология СЗНТ не в

состоянии предоставить полноценный многогранный и всесторонний анализ исследуемых материалов, т.к. она не способна предоставить какую – либо информацию относительно химического состава исследуемых веществ, а также не обладает никакой оптической составляющей. В связи с этим наиболее логичным является разработка корреляционной схемы СЗНТ–ОМ, при которой СЗНТ и ОМ будут находиться в одном устройстве. Разработка такого устройства, а также демонстрация его работы на примере реальных нанообъектов как раз является целью данной диссертационной работы.



## 1.5 Жидкие кристаллы

Открытие жидких кристаллов (ЖК) произошло благодаря попыткам Рейнитцера определить химическую формулу холестерина. В результате опытов он получил 2 соединения: холестеринацетат и холестеринбензоат. Во время исследований Рейнитцер заметил, что при плавлении данные вещества становятся анизотропными, а также приобретают окраску, изменяющуюся со временем, а затем снова исчезающую, более того, он обратил внимание на то, что плавление этих соединений происходит в несколько стадий, включающих в себя образование анизотропного расплава в начале и бесцветного изотропного в конце. Отто Леман, специалист в области молекулярной физики, изучив свойства этих соединений, пришёл к выводу о том, что они представляют собой новое фазовое состояние вещества, характеризующееся одновременно и свойствами жидкости, и свойствами кристалла. Новое фазовое состояние Леман назвал жидкокристаллическим. Однако научное сообщество в тот момент не поддержало его инновационных идей [46,47]. В глазах научного мира реальность существования жидких кристаллов была подтверждена посредством многочисленных опытов химика Даниеля Форлендера. Он установил, что жидкокристаллической фазой обладают только те соединения, молекулы которых характеризуются существенными анизометричностью и жёсткостью. Форлендер объяснил, что главное отличие такого рода соединений от аморфных жидкостей заключается в том, что при встряхивании их молекулы приобретают параллельную ориентацию, в то время как молекулы любой аморфной жидкости стремятся самоорганизоваться в шар [48].

### 1.5.1 Свойства ЖК

Как уже было сказано выше, ЖК являются промежуточным состоянием между кристаллическим телом и жидкостью. Важной отличительной чертой жидкокристаллического состояния является тот факт, что вещества в нём обладают анизотропией механических, магнитных, оптических, а также электрических свойств. Кроме того, для молекул ЖК характерно стремление к параллельной взаимоориентации [49]. Другим важным свойством ЖК является их способность осуществлять инверсию знака оптической активности, т.е. изменять знак вращения поляризационной плоскости в зависимости от длины волны света. Также важно отметить, что физические свойства ЖК находятся в сильной зависимости от внешних электрических и магнитных полей, а также температуры [48].

Жидкокристаллическая фаза свойственна далеко не всем веществам: обычно к ЖК относятся органические вещества, состоящие из сложных молекул вытянутой формы. Для перевода соединения в состояние ЖК его необходимо нагреть до температуры плавления или повысить его концентрацию. При этом важно понимать, что жидкокристаллическое состояние

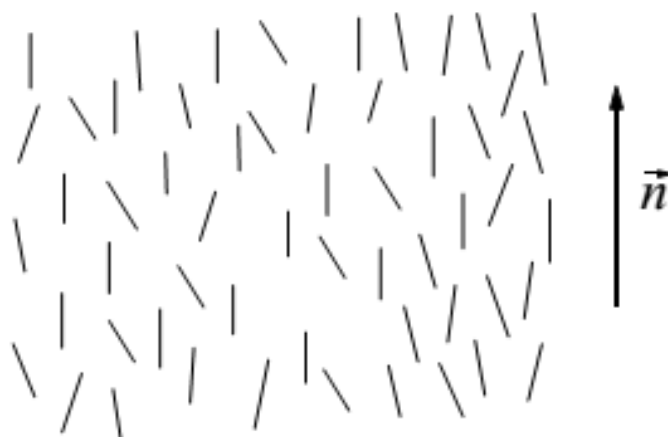
такого рода веществ также ограничено верхним температурным пределом, т.е. при дальнейшем повышении температуры сверх температуры плавления для данного конкретного вещества — это соединение вновь принимает форму обычной жидкости [50-53].

К свойствам аморфных жидкостей, присущим веществам в жидкокристаллическом состоянии, можно отнести текучесть, позволяющую ЖК принимать форму сосуда, в который их поместили; к свойствам твёрдых кристаллических тел – пространственную упорядоченность молекул, образующих ЖК. При этом стоит отметить, что упорядоченность ЖК отличается от таковой у твёрдых тел. У ЖК нет кристаллической решётки, жёстко закрепляющей порядок расположения центров тяжести молекул в пространстве, однако частичный порядок молекул относительно друг друга всё же существует и может проявляться, например, в одинаковой ориентации всех молекулярных осей. Именно благодаря сочетанию этих качеств жидкостей и твёрдых тел ЖК представляют собой промежуточную мезоморфную фазу [50-53].

### **1.5.2 Виды ЖК**

Все ЖК можно разделить две группы по типу их образования: термотропные – образующиеся в результате нагрева, и лиотропные – образующиеся в результате изменения концентрации поверхностно – активных веществ в растворителе. Термотропные ЖК, в свою очередь, подразделяют на нематические, смектические и холестерические [54-55]. Эти три подтипа ЖК прежде всего отличаются друг от друга своими оптическими свойствами, обусловленными разницей в структуре каждого из подтипов [49].

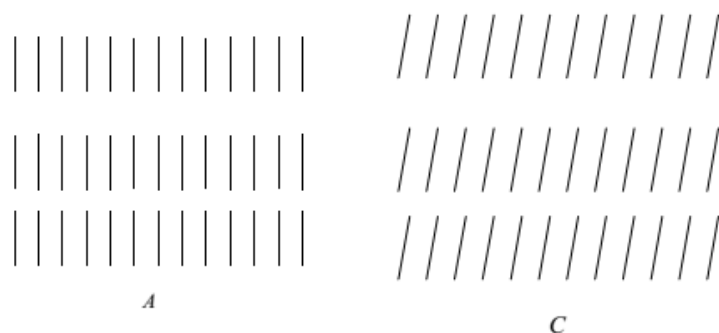
Нематические ЖК (НЖК) характеризуются микроструктурой, визуально напоминающей нити. Эти нити обычно находятся либо в свободном состоянии, либо в связанном стенками сосуда, в котором находится вещество (рис.18).



**Рисунок 18.** Расположение молекул в НЖК [49].

Характерной чертой НЖК является возможность свободного перемещения центров тяжести молекул в пространстве при наличии дальнего порядка в ориентации молекул и, соответственно, тенденции к выстраиванию этих молекул вдоль некой общей оси [49]. Нити ЖК при этом имеют возможность свободно скользить вдоль друг друга [54-55]. Важным моментом является то, что нематическая фаза может существовать лишь у соединений, чьи правая и левая форма совпадают [49]. НЖК оптически анизотропны, а также реагируют на электрические и магнитные поля, причём их реакция подобна реакции железных опилок: они располагаются упорядоченным образом вдоль силовых линий поля [54-55].

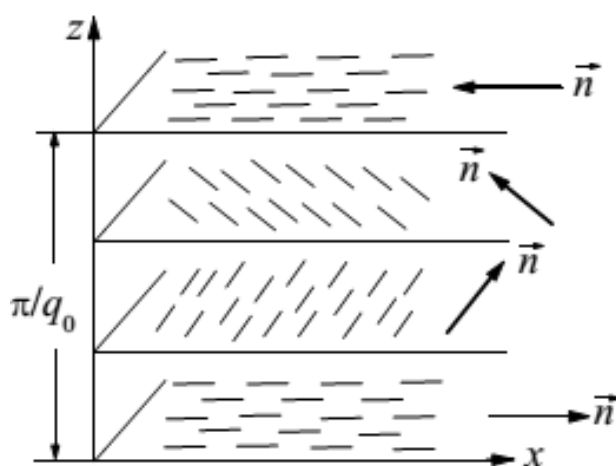
Смектические ЖК (СЖК) более близки к твёрдой фазе, чем другие типы ЖК. Для них характерно наличие слоистой микроструктуры [49]. Молекулы СЖК характеризуются вытянутой формой, напоминающей стержень. Для них характерно параллельное ориентирование друг другу с образованием оптически анизотропного тонкого слоя. Важным моментом является то, что по боковым направлениям у таких слоёв строгая периодичность молекул СЖК отсутствует [54-55]. Также интересным моментом является возможность образования различных типов молекулярных упаковок внутри слоёв. Данное явление называется полиморфизмом смектиков. Существует две смектические фазы (рис.19): прямая – фаза А; и наклонная – фаза С. В фазе А длинные оси молекул ориентированы перпендикулярно слоям смектика, такие ЖК оптически одноосны. СЖК в фазе С характеризуются оптической двуосностью. Причём С – фаза также бывает нескольких видов: первый характеризуется большим углом наклона, не зависящим от температуры; второй – малым углом наклона, проявляющим сильную температурную зависимость [49].



**Рисунок 19.** Расположение молекул СЖК в фазе А (слева) и в фазе (С) [49].

В качестве примера СЖК можно привести оболочку мыльного пузыря, в которой изоляция воды внутри происходит за счёт взаимного притяжения молекул мыла в поверхностных слоях [49].

Холестерические ЖК (ХЖК) представляют собой производные холестерина. Для них характерны плоские и длинные молекулы, ориентированные, так же, как и у СЖК, в слои. Однако внутреннее расположение молекул в слое больше напоминает собой таковое в НЖК. Интересным моментом является то, что соседние слои молекул в ХЖК немного развёрнуты относительно друг друга и образуют, таким образом, спираль (рис.20) [54-55]. Это связано с тем, что во всех производных холестерина есть боковая метильная  $\text{CH}_3$  – группа, обуславливающая отклонение ориентации длинных молекулярных осей в каждом из слоёв примерно на  $15^\circ$  в сравнении с предшествующим слоем [49].



**Рисунок 20.** Расположение молекул в ХЖК [49].

Так же, как и в С – фазе СЖК, в ХЖК проходящий через них свет распадается на два по-разному преломляющихся луча. Кроме того, обычно бесцветные ХЖК реагируют на изменение температуры посредством приобретения яркой цветной окраски [54-55].

### 1.5.3 Области применения ЖК

Конечно же, наиболее известным применением ЖК является их использование в изготовлении дисплеев. Обычно, для таких целей используют НЖК. Это обусловлено тем, что для них существует хорошо отработанная методика их пространственной ориентации, для них свойственны малые флуктуации в электрическом и магнитном полях, многие из них устойчивы к электрохимическому разложению при воздействии на них постоянным напряжением и, к тому же, их промышленный выпуск уже хорошо отлажен [49].

Менее известным, но от того не менее важным применением ЖК является термография. За счёт свойства ЖК изменять под воздействием температуры свою окраску, были изготовлены приборы ночного видения. Кроме того, термография активно используется в медицинских целях [49].

Важным научным применением ЖК является производство разного рода композитных систем ЖК с НЧ. Различные магнитные, диэлектрические, а также полупроводниковые (п/п) НЧ могут приводить к изменению ориентации молекул ЖК, диэлектрической анизотропии, проводимости ЖК, а также к изменению их оптических свойств. Композитные структуры такого рода в основном находят применение в различных фотонных устройствах [49].

## 1.6 Квантовые точки

Квантовая точка (КТ) представляет собой полупроводниковую (п/п) частицу с размером, колеблющимся в среднем от 1 до 10 нм. За счёт того, что размер КТ близок к длине волны электрона, потенциальная энергия электрона внутри неё ниже, чем за её пределами. По сути своей КТ является потенциальной ямой [56].

Важнейшей особенностью КТ является устройство их электронного спектра. При том, что реальная КТ может состоять из тысяч атомов, её электронный спектр соответствует таковому у одиночного атома. Т.е. энергия квантовой точки представляет собой набор дискретных уровней, разделённых областями запрещённых состояний [56]. За счёт такого устройства КТ возможно изменять ширину их запрещённой зоны  $E_g$  просто посредством изменения размера самой КТ. Такой эффект характерен только для кристаллов, размеры которых сопоставимы или меньше Боровского радиуса экситона [57].

Стоит также отметить, что КТ не обязательно должны состоять только из одного какого-либо п/п. Технология производства КТ подразумевает в том числе их многокомпонентный синтез из нескольких разных типов п/п материалов, отличающихся друг от друга шириной запрещённой зоны. В данной работе исследованы композитные микросферы, содержащие CdSe/ZnS КТ (рис.21). В них в качестве оболочки выступает более широкозонный п/п ZnS. В данном случае оболочка работает, как пассиватор поверхностных состояний ядра КТ, локализуя пару электрон-дырка внутри него [58].



**Рисунок 21.** Схема строения CdSe/ZnS КТ со структурой ядро/оболочка.

КТ являются прекрасными неорганическими флуорохромами. Сразу по нескольким параметрам они во много раз превосходят традиционные органические красители, вроде флуоресцеина, родамина и их производных FITC и TRITC, а также такие флуоресцентные белки,

как фикоэритрин и зелёный флуоресцентный белок [59]. Впервые флуоресцирующие КТ были получены в 1993 г. командой Мюррея, Мориса и Бавенди [60]. И хотя те КТ характеризовались выходом флуоресценции в районе всего 1%, уже в 1996-1997 гг. были произведены все необходимые усовершенствования по производству флуоресцирующих КТ, и на рынок были выпущены CdSe/ZnS КТ, характеризующиеся выходом флуоресценции вплоть до 90% [61-63]. Сегодня на рынке доступны КТ с квантовым выходом флуоресценции от 70 до 90% и с эмиссией, варьирующейся в диапазоне от УФ области до ИК [57].

### 1.6.1 Типы КТ

По способу синтеза все КТ принято разделять на две основные группы: эпитаксиальные и коллоидные [58].

К эпитаксиальным КТ относятся КТ, выращенные на специальных матрицах внутри вакуумных камер и инкубаторов [58]. Существуют две основные методики производства такого типа КТ: молекулярно – лучевая эпитаксия и мосгидридная газофазовая эпитаксия. При молекулярно – лучевой эпитаксии КТ выращивают на тщательно очищенных подложках в условиях глубокого вакуума. Суть технологии заключается в направлении потоков молекул и атомов, получаемых посредством испарения специально подобранного источника, на подготовленную подложку. Данный метод является наиболее распространённым и отработанным на сегодняшний день. Качество получаемых таким способом КТ зависит от степени чистоты используемых материалов, кристаллической решётки подложки и её физико – химических свойств, а также от температуры при которой происходит сам процесс напыления и от многих других факторов. При мосгидридной газофазной эпитаксии КТ выращиваются внутри газофазного реактора. В качестве газовой фазы обычно выступает смесь горячего потока водорода с атомами осаждаемого вещества. Эпитаксиальные КТ в основном нашли своё применение в различных областях нанoeлектроники [64] (солнечных батареях, дисплеях, диодах белого света [65,66]).

Коллоидные КТ радикально отличаются от эпитаксиальных тем, что они могут существовать в виде золя. Они растворимы в неполярных растворителях и зачастую применяются в биологических и медицинских исследованиях. Коллоидные КТ синтезируют в органических растворителях посредством добавления разного рода прекурсоров. Их синтез подразделяют на три основные стадии, включающие нуклеацию, рост зародышей и стадию созревания Оствальда. Стадия нуклеации является спонтанной и происходит в пересыщенном растворе будущих составляющих КТ. Процесс нуклеации обусловлен тем, что пересыщенный

раствор энергетически нестабилен. В результате этой стадии на некоторых участках пересыщенного раствора происходит спонтанное кристаллообразование молекул и ионов растворённого вещества, т.е. образуются зародыши. Рост зародышей по сути является чисто диффузионным процессом. Повлиять на течение этого этапа производства коллоидных КТ возможно лишь посредством изменения температурного режима. В тот момент, когда реагенты исчерпываются, начинается стадия Оствальда. Более крупные частицы за неимением реагентов начинают поглощать более мелкие, уменьшая, таким образом, поверхностную энергию всей системы. В итоге остаются только те частицы, которые по своим размерам превышают определённый критический рубеж, остальные растворяются [58]. Для получения КТ с минимальным распределением по размерам стадию Оствальда прерывают на самых ранних этапах методом взрывной нуклеации [57]. Ключевым моментом в производстве коллоидных КТ является их последующая стабилизация. Стабилизатор дисперсной системы КТ должен, адсорбируясь на границе раздела фаз, создавать структурно – механический барьер, препятствующий агрегации частиц и дальнейшему росту КТ. Удачный выбор стабилизатора зачастую имеет решающее значение в синтезе коллоидных КТ: от него будет зависеть время жизни произведённых КТ, а также параметры их флуоресценции.

### **1.6.2 Оптические свойства КТ**

Столь широким распространением как в мире нано- и оптоэлектроники, так и в биомедицине и технологиях КТ обязаны своими абсолютно уникальными в сравнении с любыми другими органическими флуорофорами оптическими свойствами. В отличие от органических флуорофоров, для которых характерен длинноволновый хвост, КТ характеризуются узким и симметричным пиком флуоресценции. Кроме того, для них характерна очень широкая полоса возбуждения, что является очень значимым фактором при производстве систем с многоцветным кодированием, ведь исследователь получает возможность, работая на одной и той же длине волны излучения, изучить свойства сразу нескольких разных типов КТ, включённых в исследуемый материал. Также крайне важными свойствами КТ являются их крайне высокая яркость и, главное, уникальная фотостабильность, позволяющая использовать источники с высокой мощностью излучения (лазеры), не опасаясь внезапного выгорания флуорофора в процессе исследования [67].



### **1.6.3 Области применения КТ**

КТ благодаря своим уникальным оптическим свойствам и фотостабильности нашли множественное применение в технологиях производства дисплеев и диодов. Кроме того, соединение КТ с ЖК позволило также усовершенствовать технологию производства солнечных батарей [64-66].

Особую роль КТ занимают в области биотехнологии и биомедицины. Конъюгация КТ с биологическими молекулами позволяет усовершенствовать технологии гибридизации ДНК, иммунологические диагностические системы, а также методы флуоресцентной визуализации разного рода биологических объектов. Кроме того, КТ применяются при визуализации движения разного рода моторных белков, например, кинезина, а комбинация КТ с полимерными микросферами позволяет осуществлять качественное многоцветное кодирование и, соответственно, параллельную регистрацию миллионов разных белков [68].

## 1.7 Оптически кодированные микросферы как инструмент для диагностики

Все современные биоаналитические методы обязаны своим возникновением Жан-Мари Лену, Д. Дж. Краму и Ч. Дж. Педерсену, получившим в 1987 году Нобелевскую премию по химии за описание теоретических основ супрамолекулярной химии [69], занимающейся вопросами межмолекулярных связей и химии ансамблей молекул. Этот же раздел химии описывает основы молекулярного узнавания – способности молекул с высокой аффинностью и специфичностью взаимодействовать друг с другом. Именно на принципе молекулярного узнавания построены все существующие биоаналитические методы исследования [70,71].

Оптически кодированные микросферы, о которых и идёт речь в данном разделе, в качестве биоаналитического инструмента появились далеко не сразу. Сперва был пройден долгий путь от электронных биосенсоров, первым из которых является электрод Кларка [72], до биочипов [73] и, наконец, наносенсоров, к которым и относятся кодированные микросферы. Принцип работы современных кодированных микросфер наиболее наглядно можно рассмотреть на примере работы биочипов, ведь, по сути своей, кодированные микросферы являются лишь их усовершенствованным более продуктивным вариантом. Итак, биочипы представляют собой платформу, изготовленную из стекла, пластика или кремния, на которую упорядоченно нанесены разного рода биологические молекулы, обладающие возможностью избирательного связывания интересующих исследователя веществ в анализируемом растворе. Примером таких молекул могут служить ДНК или ферменты. В принципе, во многих медицинских тестах, биочипы, особенно ДНК-биочипы, используются и по сей день. Однако у данного метода есть несколько минусов. К ним относятся невозможность многопараметрического анализа, а также анализа *in vivo* [73]. Для преодоления именно этих сложностей и были разработаны оптически кодированные микросферы.

Сама возможность разработки оптически кодированных микросфер связана с появлением КТ и широкого разнообразия самых разных коммерчески доступных полимеров. Структурные особенности полимеров позволяют достаточно легко внедрять внутрь полимерных микросфер или на их поверхность КТ, причём ключевым моментом является возможность одновременного внедрения нескольких типов КТ. Однако такие микросферы также изготавливают и без КТ, используя в качестве флуорофора флуоресцентные белки. Поверхность микросфер обычно модифицирована специфичными биологическими молекулами, которые так же, как и в биочипах, способны с высокой аффинностью связывать интересующие исследователя компоненты. Причём за счёт того, что весь сенсор, по сути, строится на полимерной микросфере, для него не нужна дополнительная жёсткая подложка [74]. Таким образом, при изготовлении биосовместимого композита такого рода, возможно также проводить исследования *in vivo*, а исследования *in vitro*

протекают быстрее по причине чисто технического повышения удобства проведения процедуры анализа, а также благодаря возможности одновременно анализировать сразу несколько интересующих параметров.

Оптически кодированные микросферы, а в особенности мультикодированные микросферы, наиболее активно применяются в диагностике раковых заболеваний. По сравнению с традиционными методами диагностики (например, ИФА) диагностика с помощью кодированных микросфер характеризуется более эффективной кинетикой связывания, расширенным диапазоном определяемых концентраций, а также позволяет одновременно и с высокой скоростью и точностью измерять уровень сразу нескольких онкомаркеров [75-77]. К тому же, системы диагностики, основанные на оптически кодированных микросферах, существенно дешевле традиционных ИФА – систем [77]. Кроме того, сенсорные системы, основанные на кодированных микросферах, можно использовать и для диагностики разного рода физических параметров, вроде температуры [78,79] и pH [80].

В данной работе будут исследованы флуоресцентные магнитные микросферы COOH QuantumPlex™ размером 5,5 мкм (Bangs Laboratories, Inc., США), используемые на сегодняшний день в иммунодиагностике.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Как стало ясно из предыдущей главы, СЗНТ ознаменовала собой прорыв в корреляционной 3D микроскопии. Однако, несмотря на крайне качественную 3D визуализацию исследуемых объектов, технология СЗНТ не в состоянии предоставить полноценный многогранный и всесторонний анализ исследуемых материалов, т.к. она не располагает инструментами получения какой – либо информации насчёт химического состава исследуемых веществ, а также не обладает никакой оптической составляющей.

Решением всех вышеперечисленных недостатков стала единая установка, совмещающая в себе одновременно и СЗНТ, и ОМ. Однако данная установка в своём конечном виде появилась далеко не сразу. Её актуальный вид и её разработка в целом связаны с решением трёх крупных исследовательских задач, в результате которых она была неоднократно усовершенствована и реконструирована. К таким задачам относятся сравнительное исследование фотоиндуцированных изменений топографии (кратеров) на частично упорядоченных плёнках, включающих в себя полимер и разные типы ЖК; исследование характера распределения КТ в ЖК, а также подробное исследование структуры популярного на сегодняшний день инструмента для иммунодиагностики – флуоресцентных микросфер.

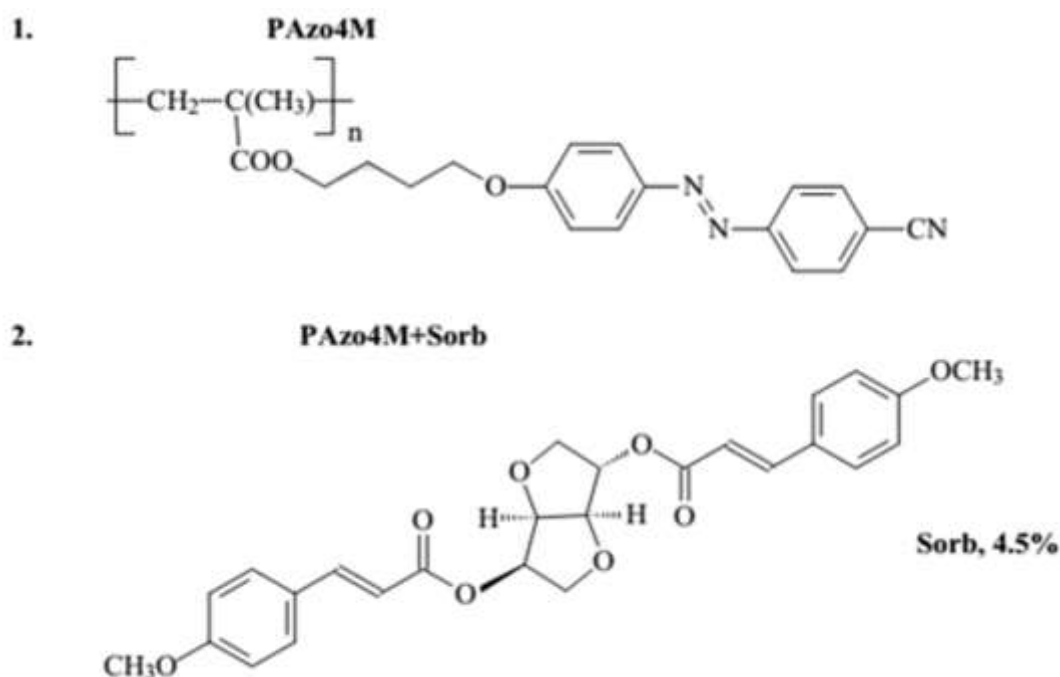
Структура экспериментальной части данной работы построена в соответствии с хронологией проводимых экспериментов и, соответственно, доработок общей конструкции уникальной установки. Первым экспериментом стало исследование кратеров на плёнках из полимеров и ЖК.

## 2.1. Исследование поверхностной структуры плёнок ЖК

В последние годы всё большее внимание уделяется феномену фотоиндуцированного массопереноса в полимерах и низкомолекулярных материалах. Повышенный интерес к данной теме обусловлен широкими возможностями применения данного эффекта в голографии, наноустройствах, оптоэлектронике и во многих других современных высокотехнологичных областях [81-88]. В качестве примера данного явления можно привести образование дыр или, по-другому, кратеров на поверхности аморфных азобензольных полимеров. Сфокусированное лазерное облучение таких полимеров приводит к деформации их поверхности и, соответственно, к направленному массопереносу, как раз и выражающемуся через образование кратеров на поверхности полимера [89, 90]. Иначе данный процесс ещё называют формированием поверхностной рельефной решётки (ПРР) [91, 92].

Анализируя общий спектр работ, посвящённых данной тематике, не трудно заметить, что подавляющее большинство исследований было произведено исключительно для плёнок аморфных полимеров, в то время как упорядоченные или частично упорядоченные структуры незаслуженно остались в стороне [89, 90, 93].

В связи с данным обстоятельством была поставлена цель, произвести сравнительное исследование фотоиндуцированных изменений топографии в нескольких разных типах частично упорядоченных сред, а именно в азобензолсодержащем нематическом полиакрилате **PAzo4M** и в холестерической смеси того же полимера с хиральной фотохромной легирующей добавкой **Sorb**. На рисунке 22 представлены формулы исследуемых типов сред.



**Рисунок 22.** Химические формулы исследуемых двух разных исследуемых сред. №1 – азобензолсодержащий нематический полиакрилат PAzo4M; №2 – холестерическая смесь полиакрилата PAzo4M с хиральной фотохромной легирующей добавкой Sorb.

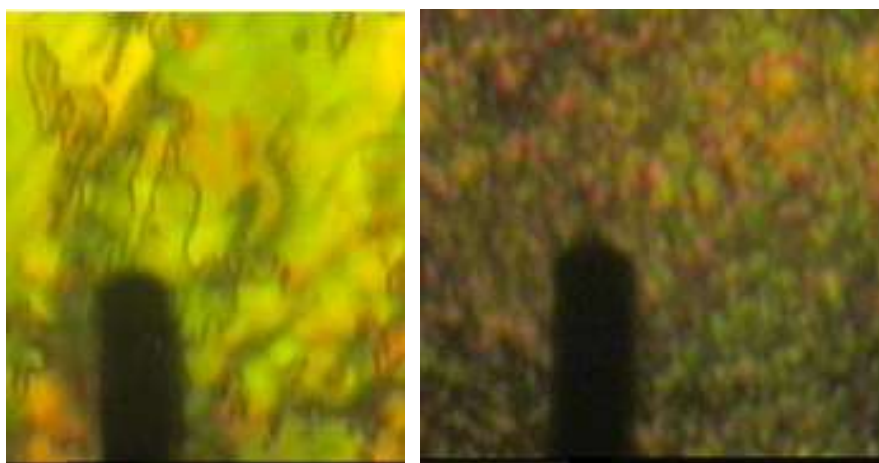
### 2.1.1. Методики синтеза используемых материалов

Синтез полимера PAzo4M был выполнен методом радикальной полимеризации соответствующего акрилового мономера в растворе бензола с добавлением AIBN (2 % по массе). После синтеза полимер в течение трёх суток выдерживали при температуре 65°C. По истечению трёх суток раствор полимера выпаривали и проводили промывку оставшейся твёрдой части продукта посредством кипячения её в этаноле. Молекулярные массы и полидисперсность полученного полимера были определены методом гель проникающей хроматографии с использованием прибора "Knauer". Полученные масса и полидисперсность соответствовали показателям  $M_w \sim 19500$ ,  $M_w/M_n \sim 2.1$ .

Легирующая хиральная фотохромная добавка Sorb была синтезирована в соответствии с методикой, описанной в работе [94]. Смесь PAzo4M + Sorb была изготовлена путём растворения её компонентов в хлороформе с последующим его медленным испарением и сушкой в вакууме при температуре 120°C.

Для получения плёнок нематического полимера и холестерической смеси было использовано два разных подхода.

В первом подходе небольшое количество вышеуказанных полимеров было помещено между двумя стеклянными пластинами и нагрето до 150°C для нематического полимера и до 140°C для холестерической смеси. Во время нагревания вещества между пластинами были подвергнуты деформации сдвига. Эти действия необходимы для достижения плоской ориентации полимеров между пластинами. Отжиг при вышеуказанных температурах продолжался в течение 30 мин, после чего стеклянные пластины были разрезаны и подвергнуты отжигу в течение ещё примерно 30 мин. По истечении этого времени пластины были медленно остужены до комнатной температуры. Таким образом были получены стеклянные пластины с плотно нанесённой на них плёнкой соответствующих полимеров. При этом плёнки нематического полимера демонстрировали "мраморную" текстуру, а плёнки с холестерической смесью остались плоскими, но характеризовались наличием плотной "сети" так называемых масляных полос (рис. 23).



**Рисунок 23.** Слева: Фото поверхности плёнки нематического полимера PAzo4M; справа: фото поверхности плёнки холестерической смеси. Изображения получены с помощью поляризационного ОМ. Оба типа плёнок получены методом, включающим в себя отжиг при фиксированном температурном режиме.

Чтобы полученные плёнки были одноосно выровнены, стеклянные пластины, на которые их наносили, были предварительно облучены поляризованным полихроматическим светом ртутной лампы (DRSh-350, ~15 мВт/см<sup>2</sup>) в течение 20 мин, а затем методом спин – коутинга покрыты поли[1-[4-(3-карбоксит-4-гидроксифенилазо) бензенсульфонамидо] -1,2-этандинилом и раствором натриевой соли (Aldrich) в хлороформе (концентрация 2мг/мл). Также для повышения упорядоченности ЖК в полимерных плёнках PAzo4M эти плёнки были подвержены дополнительному отжигу при температуре 150°C в течение одной ночи.

Во втором подходе плёнки нематического полимера и холестерической смеси были нанесены на стеклянные подложки методом спин – коутинга из раствора хлороформа. Их толщина составила примерно 100 нм.

### **2.1.2. Инструментальная база**

Для полноценного изучения изменения топографии вышеуказанных материалов было необходимо провести исследование спектра пропускания экспериментальных плёнок, получить их оптическое изображение и карту рельефа, рассмотреть фотоориентационные процессы, происходящие в них, рассчитать фотоиндуцированный дихроизм, а также провести их колориметрическое исследование. Для этого была сконструирована специальная отдельная совершенно новая экспериментальная установка. И, хотя, она не включала в себя весь набор необходимых для данного эксперимента инструментов, именно она стала предшественником будущего корреляционного микроскопа, сочетающего в себе СЗНТ с ОМ.

Экспериментальная установка, разработанная для данного эксперимента, представляет собой комбинацию системы сканирования АСМ, вертикального ОМ, столика для инвертированной оптической микроскопии и системы кросс-поляризованного излучения (рис. 24).

Для исследования образцов с помощью такой установки после предварительной подготовки эти образцы помещали в верхнюю часть сканирующей XY - пьезоплатформы (SmartSPM, AIST - NT), присоединённой к XY - спозиционированному столику для инвертированной оптической микроскопии. К этому же столику была присоединена голова АСМ (SmartAFM, AIST-NT), причём таким образом, чтобы наконечник зонда АСМ был расположен всего в нескольких микрометрах от оптической оси.

В качестве источника излучения в установке был использован перестраиваемый Ar лазер, настроенный на длину волны излучения равную 532 нм. (LCM-S-111, LASER-EXPORT Co. Ltd). Положение лазерного пучка было отрегулировано таким образом, чтобы он был направлен в ту же область, где находится наконечник зонда АСМ. Регулировка осуществлялась посредством зеркала на АСМ - голове (см. рис. 24 пунктирная коробка). Интенсивность излучения в соответствии с измерениями, произведёнными с помощью измерителя интенсивности LaserMate-Q (Coherent), была равна 0.063 мВт. Диаметр лазерного пучка был равен 30 мкм.

Все оптические изображения были получены с помощью вертикального микроскопа Optem Zoom 125C, настроенного на общую оптическую ось, проходящую через ту же точку, в которой находится остриё зонда АСМ. Система кросс - поляризованного освещения была составлена из ACE®Light Source, самодельной системы конденсаторных линз, двух полимерных



линейных поляризационных плёнок, одна из которых была помещена напрямую на конденсер под фиксированным углом и выполняла роль поляризатора, а другая помещена во вращающийся соединитель CCD с микроскопом и выполняла роль анализатора.

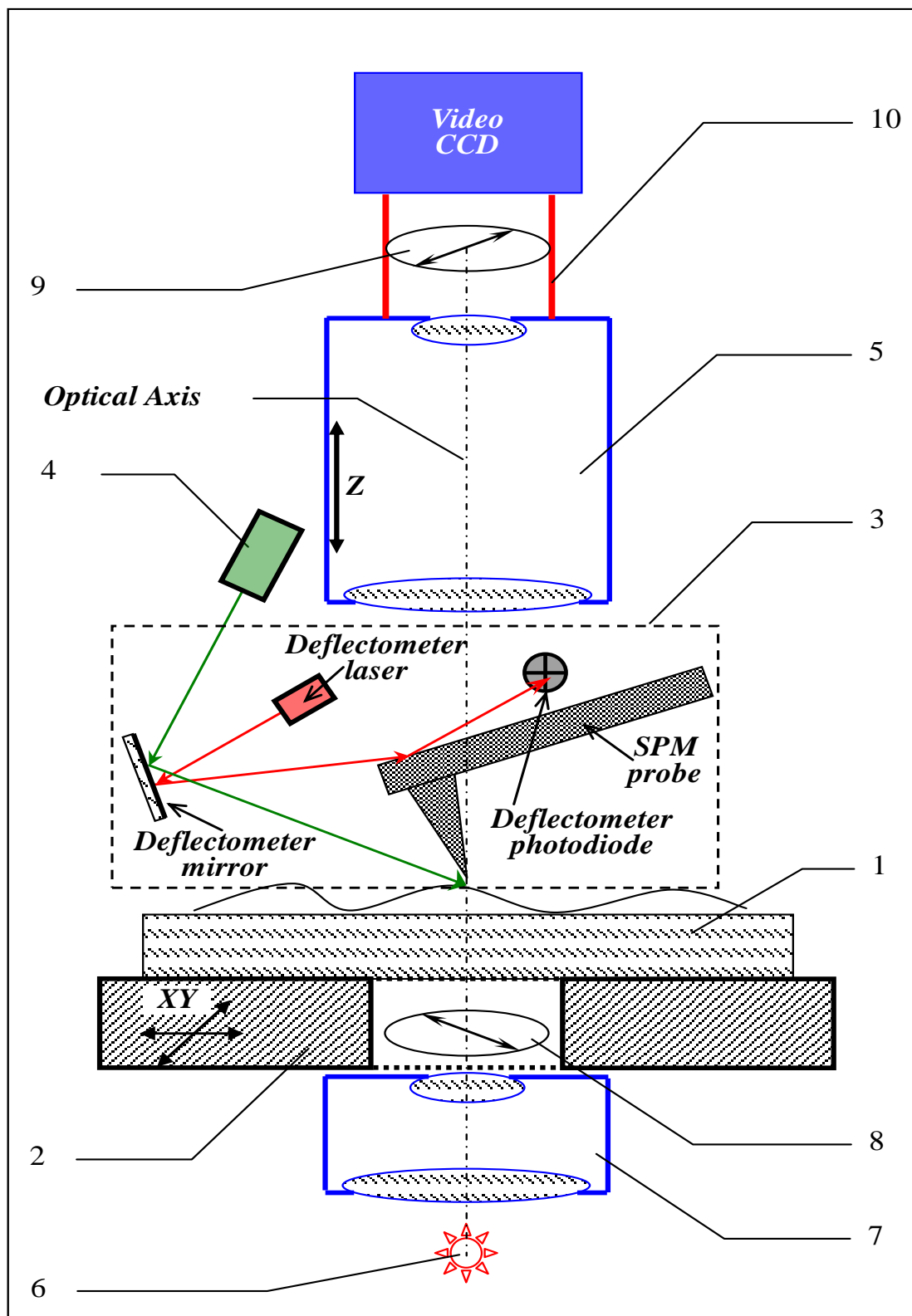


Рисунок 24. Схема установки АСМ/ПОМ, собранной для исследования топографии плёнок полимер/ЖК.

Исследования с помощью поляризационного микроскопа были произведены посредством поляризационного микроскопа LOMO P-112, оснащённого нагревающей насадкой фирмы Mettler TA-400. Дифференциальная сканирующая калориметрия была сделана с помощью термо – анализатора Perkin Elmer DSC-7. Спектр пропускания был получен с помощью спектрофотометра компании Hitachi U3400 UV-Vis-NIR. Линейно поляризованные спектры образцов плёнок изучались с помощью спектрометра TIDAS (J&M), оснащённого вращающимся поляризатором. Значения дихроизма полимерных плёнок (D) были рассчитаны из спектров в соответствии со следующим уравнением:

$$D=(A_{\parallel}-A_{\perp})/(A_{\parallel}+A_{\perp}), \text{ где}$$

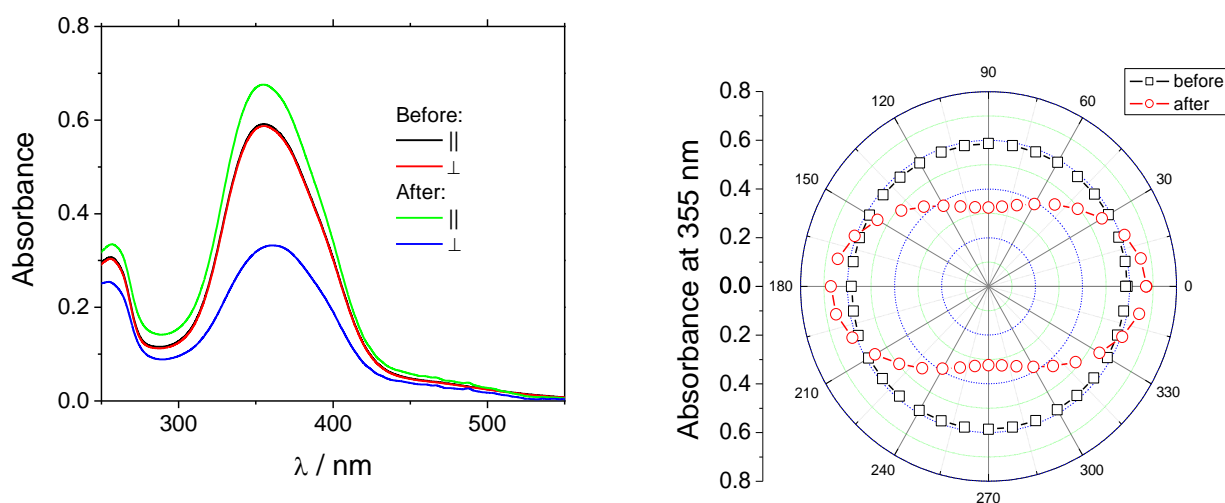
$A_{\parallel}$ ,  $A_{\perp}$  - поглощение, параллельное и перпендикулярное предпочтительному направлению ориентации азобензольного хромофора, соответственно.

### **2.1.3. Результаты исследования**

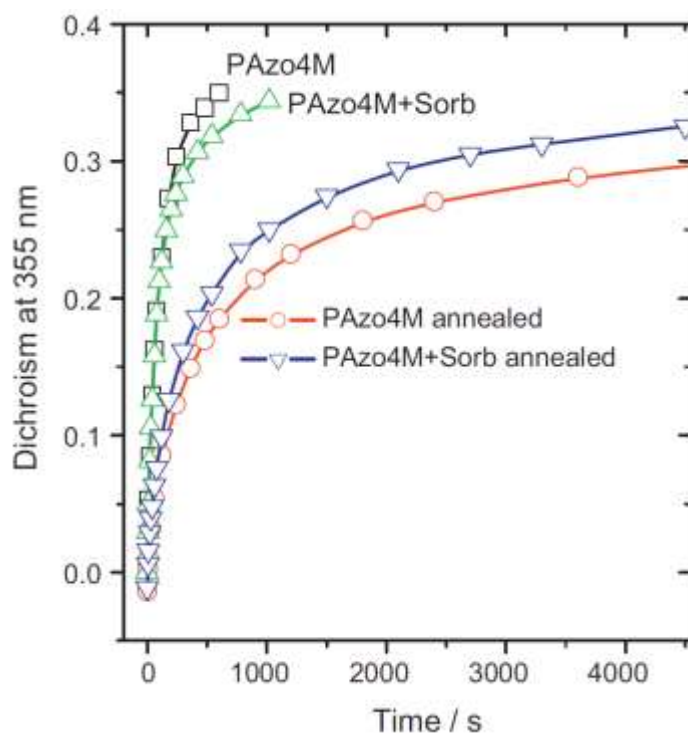
Для сравнения были рассмотрены данные о поверхностной топографии и процессах фотоориентации в плёнках нематического полимера и холестерической смеси до сфокусированного лазерного облучения и после него. Отдельно были рассмотрены плёнки полимеров, нанесённые методом, включающим отжиг и нет [95].

В первую очередь были рассмотрены плёнки нематического полимера и холестерической смеси, нанесённые методом спин – коутинга. Толщина этих плёнок колеблется между 100 – 200 нм. В связи с тем, что в качестве растворителя при нанесении плёнок использовался высоко летучий хлороформ, полученные плёнки были аморфными и изотропными, ведь быстрое испарение растворителя предотвращает образование ЖК фазы. Облучение этих плёнок поляризованным зелёным светом привело к появлению оптической анизотропии (рис. 25) и ощутимому росту дихроизма (рис. 26). Причём данный эффект возникает даже при относительно малых значениях интенсивности возбуждающего излучения и, несмотря на низкое поглощение плёнок при 532 нм (рис. 25 Слева). Стоит также отметить, что скорость роста дихроизма почти одинакова как для нематического полимера, так и для холестерической смеси (рис. 26). Природа данного явления связана с фотоиндуцированной ориентацией азобензольных хромофоров, расположенных перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего излучения. Воздействие же на плёнки излучением высокой интенсивности (0,85 мВт, 5 мин) провоцирует

образование неправильных интерференционных участков. Скорее всего это связано с самодифракцией лазерного излучения (рис. 27).

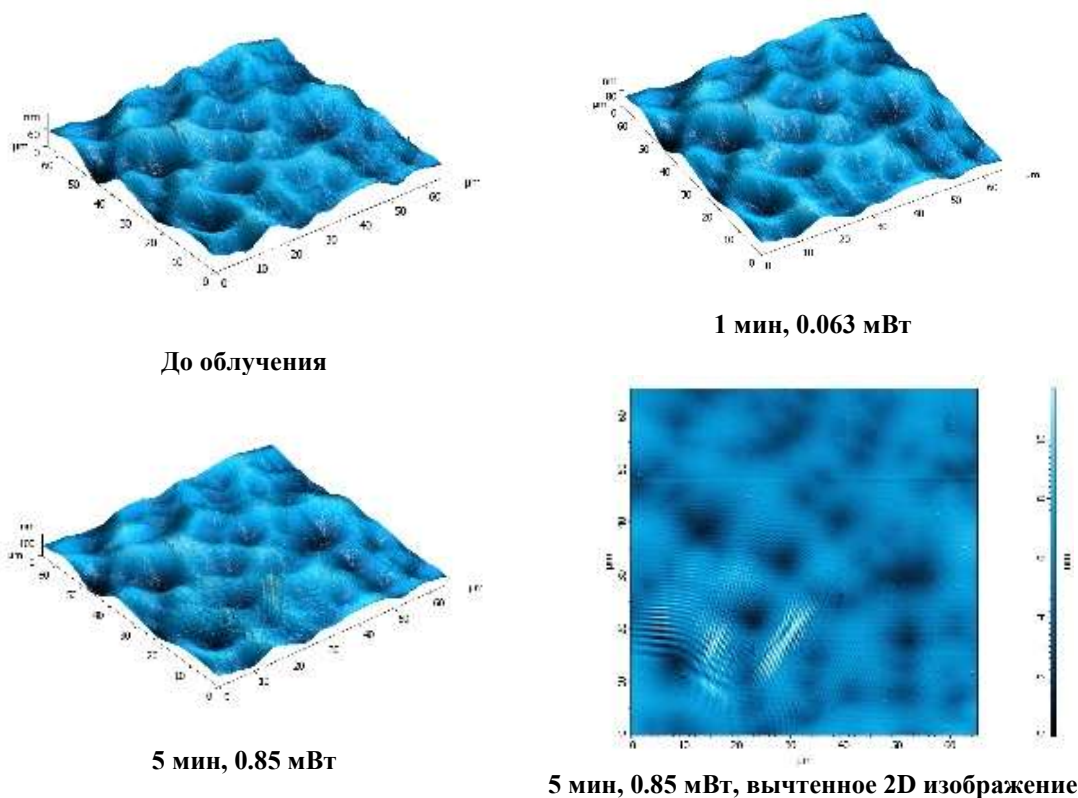


**Рисунок 25.** Слева: поляризованные спектры поглощения плёнки PAzo4M, подготовленной методом спин - коутинга до и после облучения лазером на длине волны 532 нм в течение 600 с.; справа: соответствующий полярный график поглощения.



**Рисунок 26.** Кинетика роста дихроизма под воздействием лазерного излучения плёнок нематического полимера и холестерической смеси, подготовленных методом спин – коутинга и методом, включающим в себя отжиг полимерных плёнок на стеклянных пластинах.

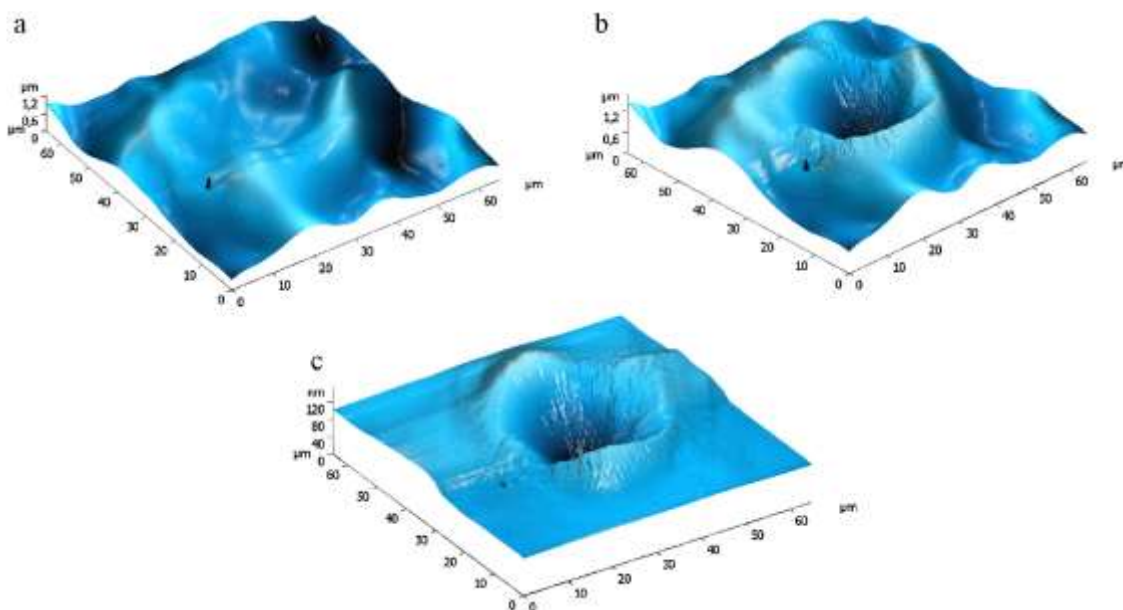
При исследовании этих плёнок посредством установки с АСМ не было выявлено каких-либо изменений в топографии их поверхности до и после воздействия на них сфокусированным лучом лазера (рис. 27).



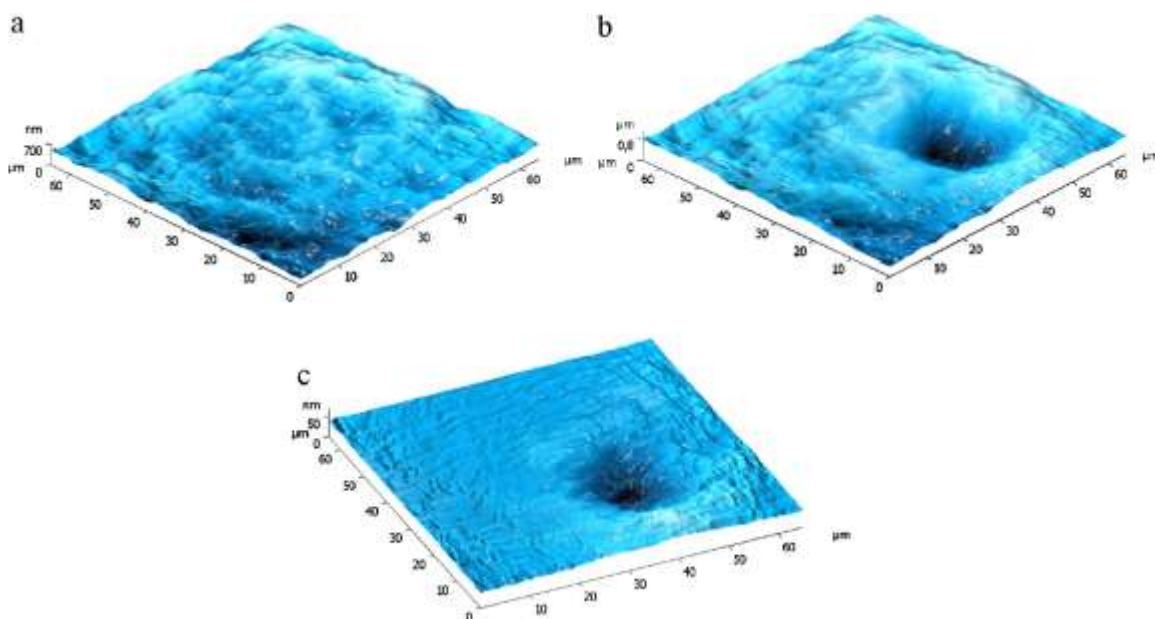
**Рисунок 27.** АСМ - изображения плёнки PAzo4M + Sorb, полученной методом спин - коутинга до и после облучения лазером на длине волны 532 нм при разной интенсивности облучения (см. рисунок). (Вычитенное изображение получено путём вычитания изображения, полученного через 2 минуты после облучения из изображения, полученного до облучения.)

Далее были изучены полимерные плёнки, полученные методом, включающим в себя отжиг нематического полимера и холестерической смеси на стеклянных пластинах. Толщина этих плёнок варьировалась от 10 до 20 мкм. Плёнка нематического полимера характеризовалась "мраморной" текстурой, характерной для нематической фазы, и не имела какой-либо предпочтительной ориентации хромофоров (рис. 23 слева). Холестерическая смесь характеризовалась плоской текстурой, селективно отражающей свет в ближнем ИК диапазоне, и состояла из плотной "сети" дефектов, также называемых маслянистыми полосами (рис. 23 справа). С помощью установки с АСМ было проведено сравнение шероховатости поверхности обоих типов плёнок (рис. 28, 29). Для плёнок нематического полимера амплитуда колебаний

высоты поверхности примерно в два раза больше, чем для плёнок холестерической смеси, а шероховатость и RMS дисперсия больше в три раза. Скорее всего это связано со спиральной структурой холестерической смеси. Ровный и одинаковый шаг спирали, а также плоская ориентация хромофоров может обеспечивать равномерную толщину образца и, следовательно, гладкую поверхность плёнки. При сравнении АСМ изображений и оптических изображений, полученных с помощью поляризационного микроскопа, не было обнаружено какой-либо связи между топографией поверхности обоих типов плёнок и дефектами их текстуры, наблюдаемыми в поляризационный микроскоп.

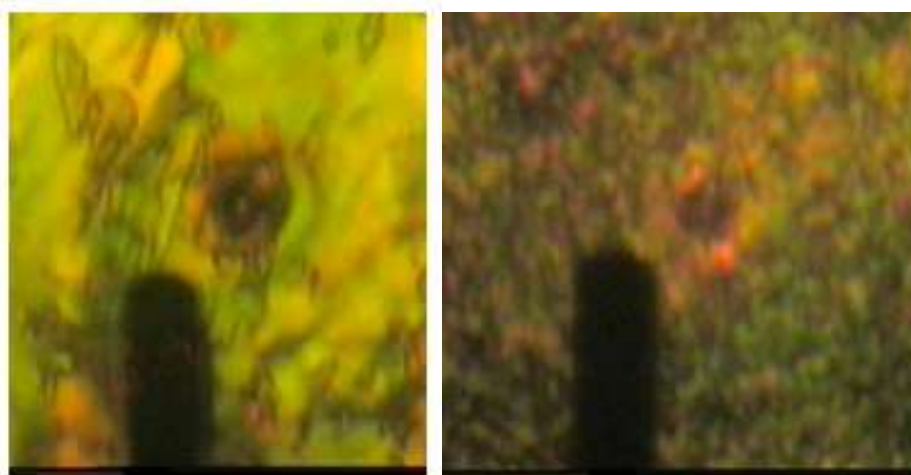


**Рисунок 28.** АСМ изображения рельефа поверхности плёнки нематического полимера PAzo4M до (а) и после 4 минутного облучения лазером (b). Изображение (с) представляет собой вычитание изображения (b) из (а).



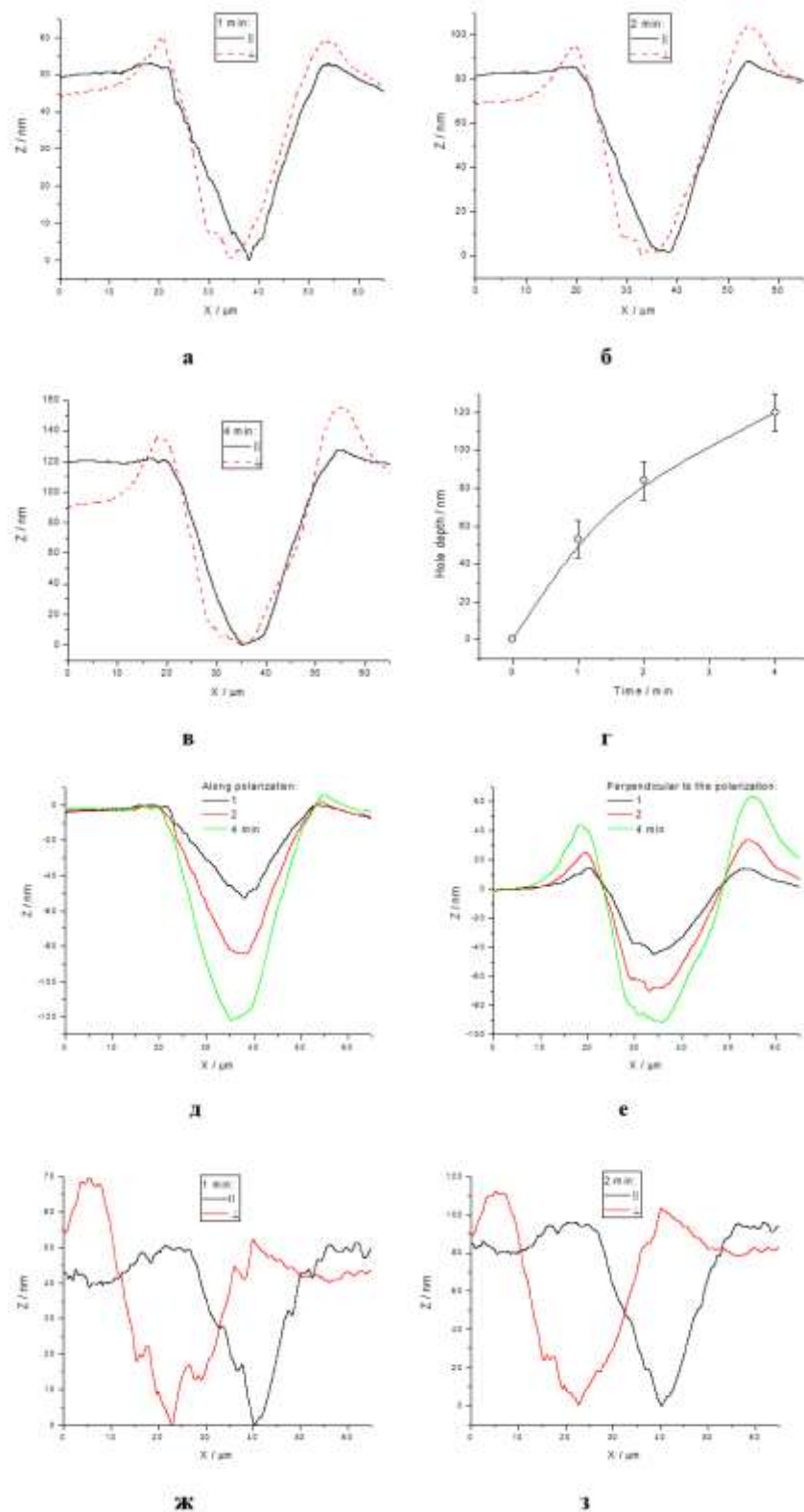
**Рисунок 29.** АСМ изображения рельефа поверхности плёнки холестерической смеси PAzo4M+Sorб до (а) и после 2 минутного облучения лазером (б). Изображение (с) представляет собой вычитание изображения (б) из (а).

Точно так же, как и плёнки, полученные методом спин - коутинга, плёнки, подвергшиеся отжигу, при облучении их поляризованным зелёным светом демонстрировали эффект фотоориентации азобензольных хромофоров. На изображениях, полученных с помощью поляризационного оптического микроскопа, отчётливо виден эффект выравнивания хромофоров в облучённой зоне (рис. 30).



**Рисунок 30.** Изображения поверхности плёнок нематического полимера (слева) и холестерической смеси (справа) после 4 минутного облучения их лазером. Изображения получены при помощи поляризационного микроскопа.

Из АСМ изображений облучённой области плёнки нематического полимера (область облучения видна на рис. 30) видно, что сфокусированное облучение её поверхности лазером приводит к образованию кратеров. Данный процесс обусловлен явлением массопереноса (рис. 28, 31). Для плёнок холестерической смеси были получены качественно и количественно схожие результаты (рис. 29, 30). Также интересным является тот факт, что глубина образовавшихся кратеров колеблется в диапазоне нескольких десятков нанометров и увеличивается с увеличением времени облучения.



**Рисунок 31.** (а-в) Поперечное сечение вычитаемых АСМ - изображений плёнки  $\text{PZO}_4\text{M}$  после облучения лазером на длине волны 532 нм (0.063 мВт) в течение разного времени (показано на рисунках); (г) Кинетика увеличения глубины отверстия при облучении.

(д,е) Временная эволюция поперечных сечений вычитанных АСМ - изображений плёнки  $\text{PZO}_4\text{M}$  при облучении лазером на длине волны 532 нм (0.063 мВт) в течение разного времени (показано



на рисунках). Поперечные сечения показаны для направлений вдоль (д) и перпендикулярно (е) поляризации лазера.

(ж, з) Поперечное сечение вычтенных АСМ - изображений плёнки смеси PAzo4M + Sorb после облучения лазером на длине волны 532 нм (0.063 мВт) в течение разного времени (показано на рисунке).

#### **2.1.4. Общие выводы по результатам исследования**

Исследования фотоиндуцированных изменений поверхности в нематическом азобензолсодержащем полиметакрилате и соответствующей холестерической смеси продемонстрировали специфические особенности подобных систем, связанные с образованием кратеров на их поверхности под воздействием сфокусированного лазерного излучения. Всего можно выделить 2 главные особенности:

1) Сфокусированное облучение лазером приводит к образованию кратеров исключительно в достаточно толстых плёнках (5-10 мкм); в тонких плёнках (100-200 нм) они не образуются вовсе.

2) Хиральная структура плёнки не оказывает никакого воздействия на кинетику образования кратеров и их глубину.

## **2.2. Исследование трёхмерной структурной организации и оптических характеристик гибридного материала, содержащего холестерические ЖК матрицы с инкорпорированными в них КТ**

Наиболее активно развивающиеся области прикладной нанотехнологии напрямую связаны с исследованием уникальных оптических свойств наноматериалов, которые потенциально могут быть задействованы в разработке устройств для нанооптоэлектроники [96], нанофотоники [97], а также в разработке инструментов для диагностики [98] и направленной доставки лекарств [99]. Например, известно, что фото- и электроактивные материалы с контролируемой степенью поляризации флуоресценции могут быть задействованы в качестве однофотонных источников в оптоэлектронике и квантовой криптографии [100, 101]. Кроме того, такого рода наноматериалы также могут быть использованы в качестве основы для разработки нанофотонных систем, способных осуществлять низкопороговую генерацию [102].

Примером такого рода наноматериала является гибридный нанофотонный материал, включающий в себя холестерические ЖК с инкорпорированными в них КТ. Этот материал благодаря изменениям в коэффициенте диссиметрии круговой поляризации излучения КТ отлично подходит для фотохимического паттернинга, а также для записи изображений [103-106].

Однако для любого целенаправленного применения каких – либо наноматериалов необходимо осуществлять строгий контроль их оптических свойств наряду с анализом их 3D морфологии [3]. Более того, в случае с применением наноматериалов в области биомедицины также необходимо осуществлять параллельный анализ наномасштабной трёхмерной морфологии тканей и клеток вместе с флуоресцентным анализом нанозондов, находящихся в них [107].

Задачей данного эксперимента было полномасштабное исследование наногибридного материала, состоящего из стеклообразующих циклосилоксановых матриц, представляющих собой холестерические ЖК, а также CdSe/ZnS КТ и хиральной фотохромной легирующей примеси Sorb, отвечающей за свойства фотонапряжения спиралей.

### **2.2.1. Методики синтеза использованных материалов**

Гибридный материал, исследованный в данной работе, был получен путём растворения SilBlue (96.3 % по массе), Sorb (3.2 % по массе) и двух типов КТ (одни с  $\lambda_{ФЛ}=530$  нм (0.05 % по массе); другие с  $\lambda_{ФЛ}=604$  нм (0.5 % по массе)) в хлороформе с последующим медленным выпариванием растворителя и сушкой в вакууме при температуре 120 ° С. Полученная смесь получилась однородной, а добавление КТ не привело к её замутнению.

Для оптических и морфологических исследований были подготовлены плёнки толщиной примерно 20 мкм. Плёнки подготавливались методом аналогичным методу в предыдущем эксперименте. Смесь была нанесена на стеклянные пластины, которые в дальнейшем были зажаты и на протяжении 30 минут подвергнуты нагреву до 140°C. После этого пластины были разделены обратно, а тонкие плёнки нанесённой на них смеси были подвергнуты температурной обработке в течение ещё 30 минут, а затем медленно остужены до комнатной температуры (с шагом 1°C/мин). В качестве поляризатора была использована призма Глена – Тейлора. Толщина полученных плёнок контролировалась с помощью тефлоновых прокладок.

Для максимально ровного нанесения плёнок была использована та же технология предварительной подготовки стеклянных пластин, что и в предыдущем эксперименте.

КТ, используемые в смеси в качестве флуоресцентных добавок, представляют собой CdSe/ZnS КТ со структурой ядро/оболочка. Они были синтезированы в соответствии с методикой, описанной в статьях [108, 109]. Для эксперимента были использованы гомогенные КТ (отклонение по размеру, 10%) с CdSe ядром диаметром приблизительно 5 нм (для КТ с  $\lambda_{ФЛ}=604$  нм). Оболочка КТ состояла из примерно двух монослоёв ZnS [110]. Квантовый выход КТ превышал 60%. В качестве стабилизатора КТ выступили поверхностно – активные вещества триоктилфосфиноксид и триоктилфосфин [111]. Флуоресценция использованных КТ оставалась стабильной как после её длительного возбуждения, так и во время процесса фотополимеризации.

### **2.2.2. Инструментальная база**

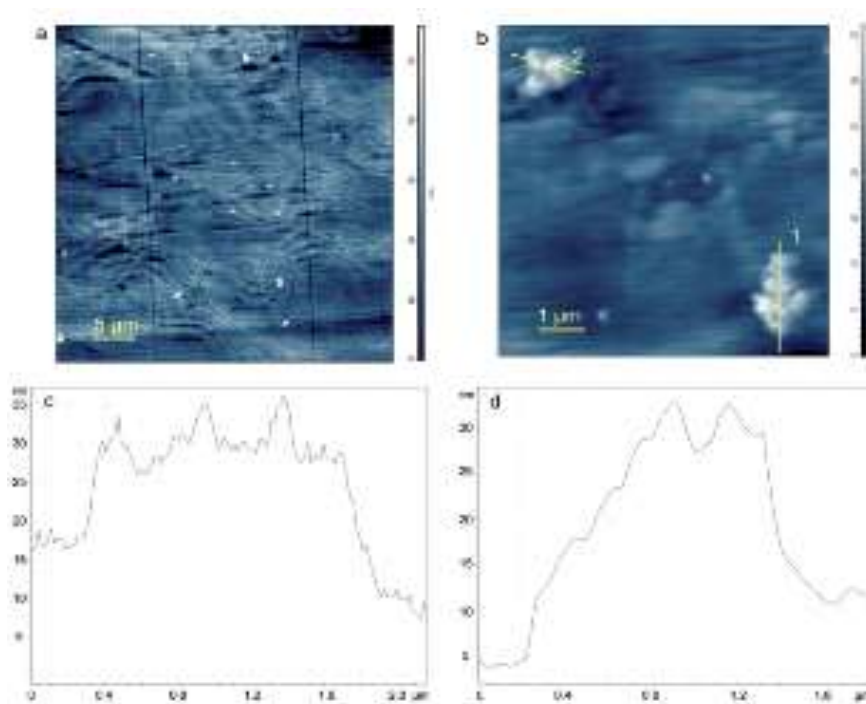
Как уже упоминалось выше, для качественного и полноценного исследования любого наноматериала необходимо провести анализ его поверхностной структуры методами СЗМ, микроспектроскопии и флуоресцентной микроскопии, а также сделать 3D реконструкцию каждой исследованной области. Для этих целей экспериментальная установка из прошлого исследования была разобрана и доработана.

Полученная экспериментальная установка сочетала в себе СЗНТ и ОМ. Собранный установка позволяла получать корреляционные данные методами СЗМ, ОМ и флуоресцентной спектроскопии с одной и той же исследуемой области образца, а затем проводить её 3D нанореконструкцию посредством СЗНТ [112].

Общую конструкцию разработанной в данном эксперименте установки можно разделить на два основных структурных элемента: первый – СЗНТ; второй – объединение СЗМ с ОМ.

С помощью СЗНТ осуществлялись ультрамикротомирование образца и его 3D реконструкция. Для конструирования СЗНТ были использованы система NTEGRA – Tomo (NT – MDT Co., Россия), включающая в себя СЗМ и УМ Leica EM UC6NT (Leica Microsystems GmbH, Австрия) на MOD – 1 активном вибро – защитном столе (Halcyonics GmbH, Германия) [113]. В качестве ножа УМ был использован алмазный нож (Ultra AFM 35 diamond knife, Diatome AG, Швейцария). Голова СЗМ была установлена непосредственно на держателе ножа УМ. Такая конструкция была необходима для возможности исследования поверхности образца методом СЗМ в полуконтактном режиме сразу после секционирования образца в тот момент, когда плечо УМ находится в самом верхнем положении. Для исследований были использованы кантилеверы NSC15 (Micromash, характерная резонансная частота около 325 кГц, радиус <10 нм, Эстония). АСМ – изображения были получены с области размером 512x512 пикселей при скорости сканирования 1 Гц (~ 8.5 минут на изображение), амплитуде свободных колебаний кантилевера равной 40 нм и интегральным коэффициентом обратной связи равным 0.4.

Для сборки элемента, соединяющего СЗМ с ОМ была использована голова СЗМ SMENA компании NT – MDT (Россия). Она была смонтирована на оптический стол таким образом, чтобы наконечник зонда СЗМ был расположен в пределах нескольких микрометров от оптической оси. В качестве лазера был использован Ar<sup>+</sup> лазер компании ОАО Plasma (Рязань, Россия). Положение и размеры пятна лазерного луча были отрегулированы с помощью зеркала дефлектометра на голове СЗМ (рис. 33) таким образом, чтобы он попадал в область оптической оси.



**Рисунок 32.** АСМ - анализ дефектной области исследуемой гибридной полимерной плёнки с холестерическими ЖК и КТ: (а) - 2D АСМ - изображение (40x40 мкм) дефектной области плёнки, на котором можно увидеть кластеры из КТ; (b) - 2D АСМ - изображение (6.0x6.0 мкм) кластеров КТ, расположенных в дефектной области плёнки; (c) - профиль поперечного сечения изображения (b) вдоль линии 1; (d) профиль поперечного сечения изображения (b) вдоль линии 2.

В качестве ОМ был использован вертикальный микроскоп Optem Zoom 125С. Он был настроен на общую оптическую ось, проходящую через ту же точку, что и наконечник СЗМ – зонда. Система кросс – поляризованного освещения была построена из источника света ACE®, самодельной системы конденсаторных линз, линейно поляризующей полимерной плёнки, используемой в качестве поляризатора, и ещё одной аналогичной плёнки, но используемой уже в качестве анализатора. Плёнка – поляризатор была размещена непосредственно на конденсаторе под фиксированным углом; плёнка – анализатор была помещена во вращающийся переходник CCD – микроскопа. Спектры флуоресценции были записаны при помощи автоматизированного монохроматора/спектрографа M266 компании SOLAR Laser Systems (Минск, Беларусь) с использованием CCD U2C – 16H7317 компании Ormins (Минск, Беларусь) и самодельной светособирающей системы, состоящей из двух длинноволновых фильтров Semrock 488-nm RazorEdge® ultrasteep (Рочестер, Нью – Йорк, США). Для возбуждения флуоресценции был использован вышеупомянутый Ar<sup>+</sup> лазер, излучающий на длине волны 488 нм. Интенсивность

лазерного излучения была равна 0.063 мВт, чтобы было подтверждено с помощью инструмента для измерения интенсивности излучения LaserMate – Q (Coherent). Для возбуждения флуоресценции луч был сфокусирован на пятно диаметром примерно 30 мкм. Запись спектра флуоресценции осуществлялась в инвертированном режиме с использованием объектива LCPlanFI 20X/0.40 компании Olympus (Япония) и самодельного конфокального блока с двумя 100 мм объективами и диаметром выходного зрачка равным 100 мм.

### **2.2.3. Методика исследования**

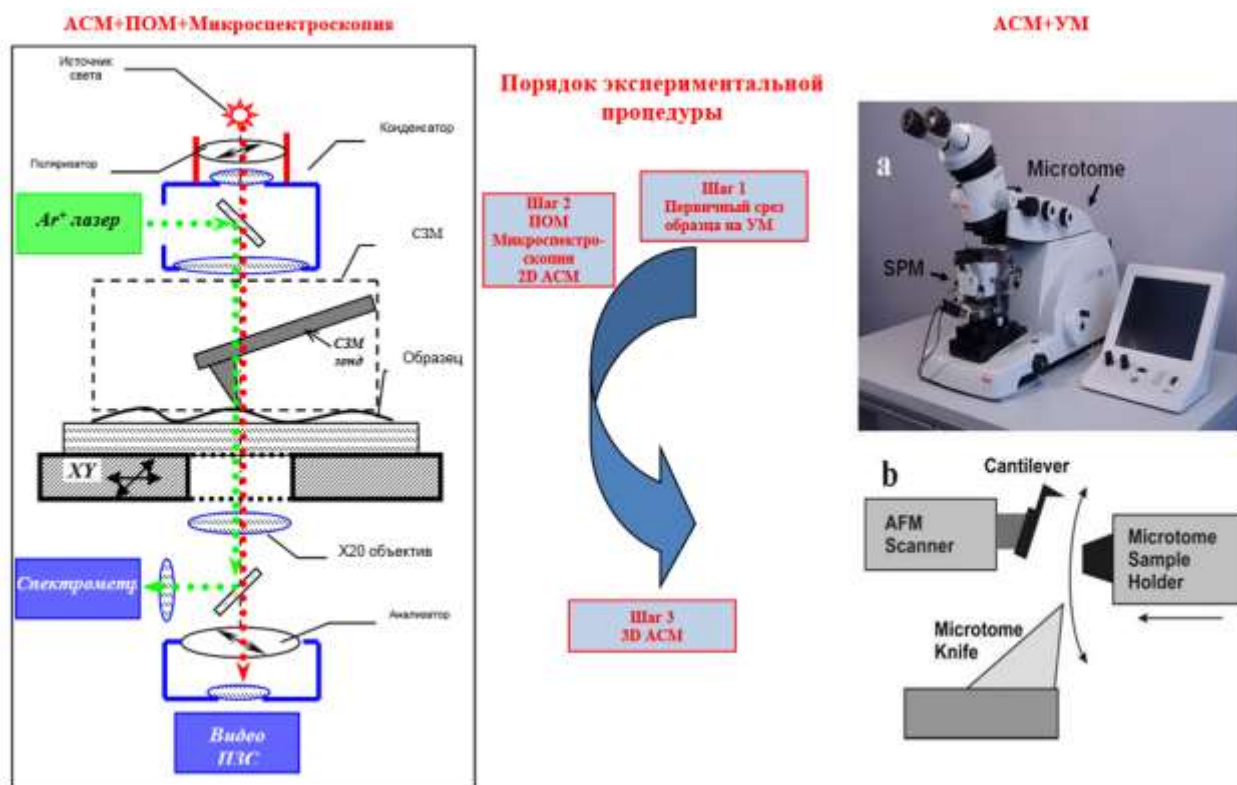
Для начала с помощью УМ, расположенного в СЗНТ части экспериментальной установки, было произведено первичное секционирование ЖК – плёнок (рис. 33 Шаг 1). Для этого образец был помещён на специальную стеклянную подложку, обеспечивающую необходимую плоскость поверхности для корреляции данных СЗМ и ОМ. Площадь секционированного блока составила не более 1мм<sup>2</sup>.

Следующим шагом стало изучение полученной секции с помощью СЗМ – ОМ элемента экспериментальной установки (рис. 33 Шаг 2). Были получены изображения подготовленной секции с ПОМ, сняты спектры её флуоресценции, а также с помощью АСМ получены изображения её поверхностной топографии. Исследуемая секция была помещена прямо на верх столика для инвертированной ОМ с открытой оптической осью. 2D – АСМ изображения были сняты для того, чтобы было возможно найти тот же участок поверхности во время реконструкции 3D объекта на СЗНТ в дальнейшем.

Далее уже исследованная область секционированного образца была расположена соответствующим образом с помощью ОМ и АСМ для определения её 3D структуры посредством СЗНТ (рис. 33 Шаг 3). 3D реконструкция была получена по принципу чередования визуализации поверхности с ультрамикротомированием. Минимальная толщина секции, которая была использована в данном подходе, составила 50 нм. В качестве программного обеспечения для 3D реконструкции была использована программа для постобработки ImagePro Plus 6.0 компании Media Cybernetics Inc. с подключенной опцией 3DConstructor для автоматического выравнивания изображений и их трёхмерной визуализации.

Для 3D реконструкции периодической структуры матрицы из холестерических ЖК с КТ смесь из КТ и холестерических ЖК была нанесена на подложку из РТФТ, а затем залита эпоксидной смолой. Секционирование производилось в плоскости, параллельной оси спирали. Далее была проведено последующее множественное ультрамикротомирование при

контролируемой толщине получаемых срезов, которые затем были так же исследованы при помощи АСМ.



**Рисунок 33.** Схема экспериментальной установки СЗНТ - ОМ (включает в себя СЗМ, ОМ, флуоресцентную микроспектроскопию и возможность 3D реконструкции структуры образца с помощью СЗНТ). Слева: схема комбинации СЗМ, ОМ и конфокальной микроскопии. Справа: (а) Общий вид установки для СЗНТ; (б) принципиальная схема работы СЗНТ.

#### 2.2.4. Результаты исследования

В первую очередь был проведён анализ наногибридного материала методом ПОМ [114]. В результате анализа на большей части площади исследуемых плёнок не было выявлено каких – либо признаков агрегации или разделения фаз, т.е. композитные наногибридные плёнки характеризовались довольно однородной структурой. ПОМ является типовым методом контроля качества структур, состоящих из холестерических ЖК [115]. Принцип контроля основан на том, что идеальные ЖК – структуры превращают линейно поляризованный свет в эллиптически поляризованный и, следовательно, на ПОМ – изображениях выглядят как яркое поле, тогда как области дефектов не влияют на поляризацию света и выглядят как темные пятна. На ПОМ – изображении подготовленной секции (рис. 34 Шаги 1,2) наногибридной плёнки (рис. 35(а)) видны как гладкие ЖК – структуры (рис. 35(а) обведены зелёным кругом), так и дефектные

области (рис. 35(a) обведены синим кругом). При этом важно отличать типовые дефекты в виде «масляных» полос (рис. 35) от дефектов, вызванных агрегацией КТ внутри ЖК – матрицы (рис. 35(a) обведены синим кругом).

Следующим этапом исследования были запись и анализ микрофлуоресцентных спектров лево- и правосторонних циркулярно поляризованных компонентнов излучения, исходящего из гладких областей (зелёный круг) исследуемого среза наногибридного материала и из его дефектных областей (синий круг) (рис. 35 (b)). Видно, что агрегаты КТ, спровоцировавшие образование дефектных областей, характеризуются спектрами флуоресценции, представляющими собой суперпозицию спектров флуоресценции, инкорпорированных в матрицу КТ. При этом для КТ, не агрегировавших внутри гибридной ЖК – матрицы, левосторонняя циркулярно поляризованная составляющая спектра их флуоресценции модифицируется пиком селективного отражения света при 590 нм, что характерно для материалов из холестерических ЖК с «идеальной» структурой. Эта модуляция характеризуется коэффициентом диссиметрии флуоресценции, который может быть выражен как:

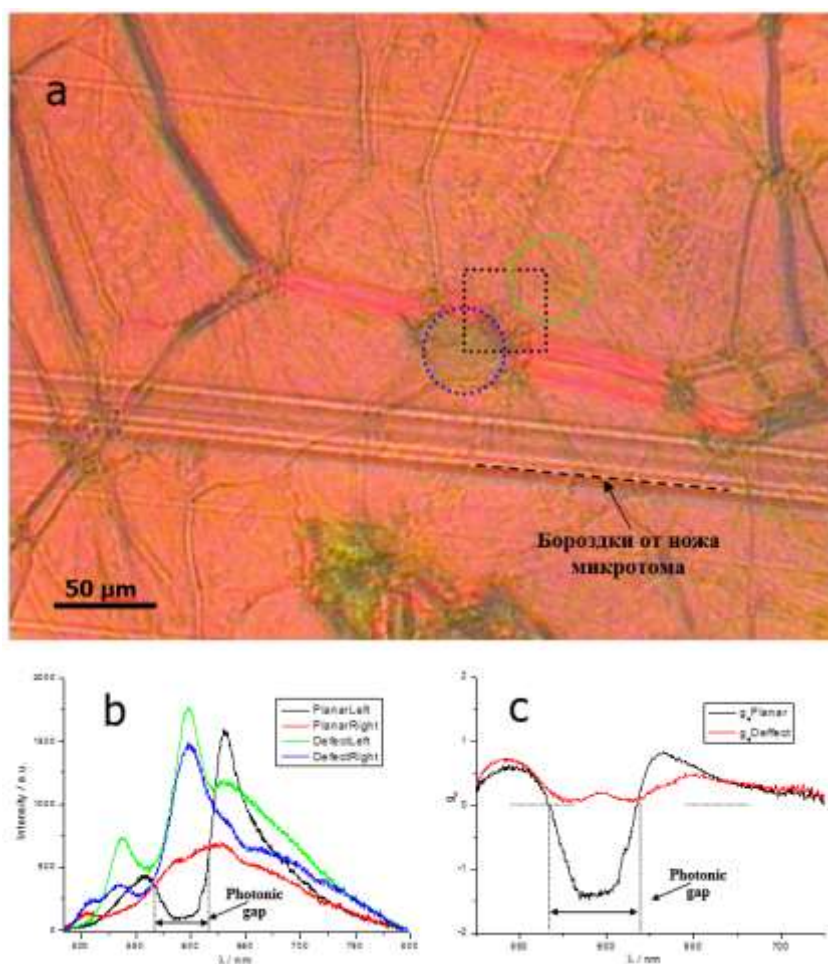
$$g_e = 2(I_L - I_R) / (I_L + I_R), \quad (1) \quad \text{где}$$

$g_e$  – коэффициент диссиметрии флуоресценции;

$I_L$  и  $I_R$  являются, соответственно, лево- и правосторонней циркулярной поляризацией компонентнов спектра флуоресценции КТ.

Значительный отрицательный  $g_e$  (рис. 35(c)) однозначно указывает на правильную плоскую структуру наногибридной матрицы из холестерических ЖК и КТ в данной области.

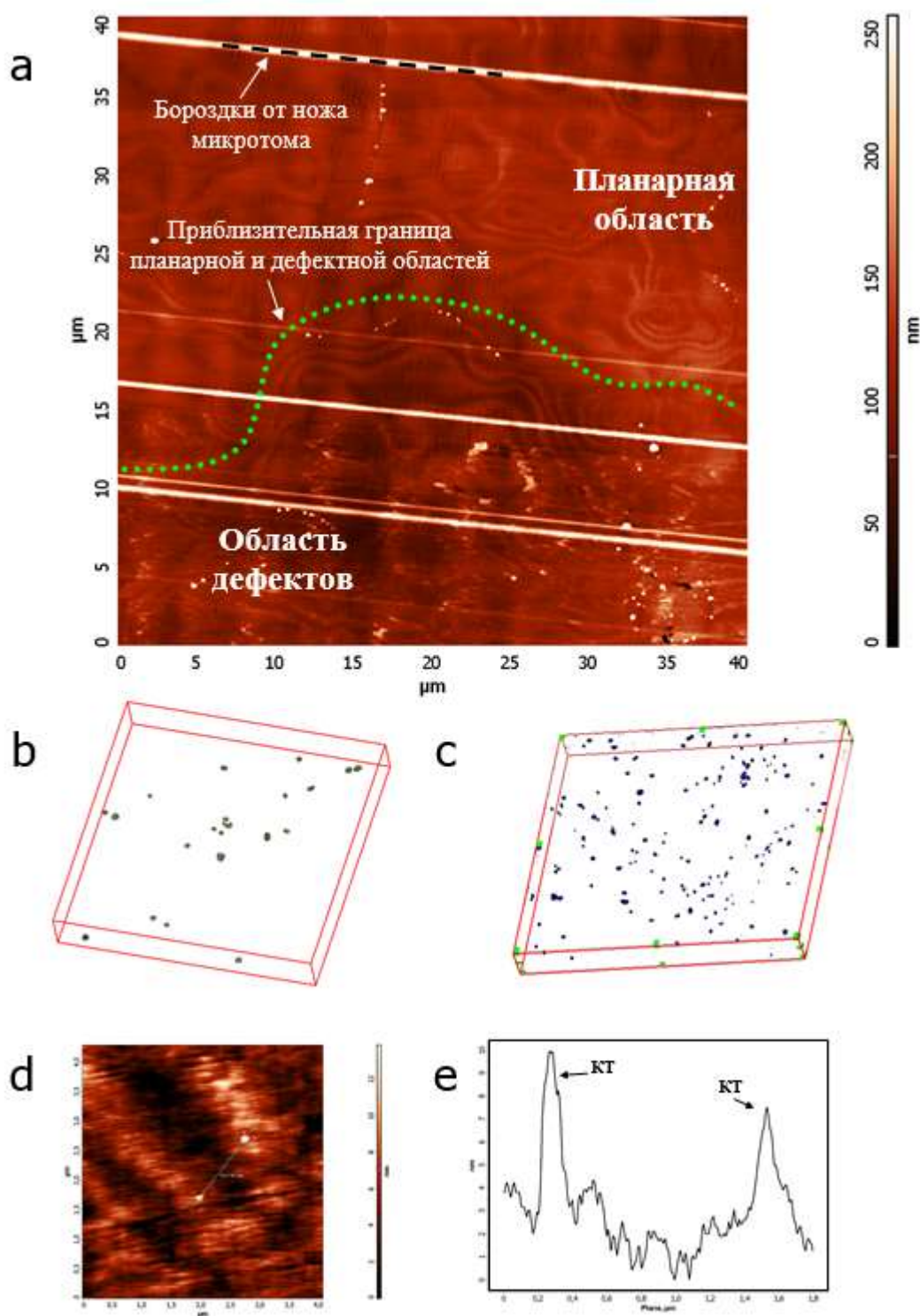




**Рисунок 35.** Анализ влияния агрегации КТ, инкорпорированных в матрицу холестерических ЖК, на их флуоресценцию. (а) – ПОМ - изображение ультрамикротомированной области поверхности гибридного материала КТ – холестерические ЖК. Зелёным кругом обведены свободные от каких – либо дефектов области исследуемого образца, а голубым кругом обведена его дефектная область. Чёрным квадратом обозначен участок, отсканированный с помощью АСМ (см. Рис.35(а)), на котором находятся как плоские области, так и дефектные. Диаметр возбуждающего лазерного пучка был равен 5 мкм. (б) – Право- и левосторонне циркулярно поляризованные компоненты спектра флуоресценции КТ, инкорпорированных в матрицу из холестерических ЖК. Спектры записаны с областей, выделенных зелёным (свободных от дефектов, плоских областей) и голубым кругом (дефектных областей) на рисунке (а). Видно, что для плоской области характерна значительная модуляция левосторонней циркулярной поляризации компонента спектра флуоресценции КТ в области пика селективного отражения света в ЖК – матрице ( $\lambda = 590$  нм). При этом для дефектных областей такая модуляция не выражена. (с) – Факторы диссимметрии флуоресценции ( $g_e$ , уравнение 1) для КТ, инкорпорированных в плоскую и дефектную области матрицы холестерических ЖК. Видно, что плоские области гибридного материала КТ – холестерические ЖК характеризуются высокой отрицательной геометрией, являющейся свидетельством высокого качества материала.

По итогам исследования плёнок методом ПОМ можно было чётко охарактеризовать наличие и соотношение областей с гладкой поверхностью с дефектными областями. На следующем этапе исследования уже было необходимо получить данные касательно того каким конкретно образом располагаются КТ в плоских и ровных областях наногибридных плёнок: рассредоточены ли они по поверхности или же формируют микрокластеры. Также необходимо было выяснить степень растворимости инкорпорированных в гибридную ЖК – матрицу КТ. Для этих задач были проведены исследования посредством совмещённого СЗНТ – ОМ модуля (Рис. 34 Шаг 3). Был проведён структурный 2D и 3D – анализ распределения КТ в гладких и дефектных областях участка того же среза наногибридной плёнки, что и при исследованиях на ПОМ (рис. 36). АСМ – изображение (рис. 36(a)) соответствует площади, ограниченной чёрным квадратом на рисунке 35 (a). На изображении видно, что агрегаты КТ в большей степени располагаются в дефектных областях матрицы, нежели в гладких и ровных. Также важно отметить, что и в ровных областях наблюдаются агрегаты КТ, однако там они расположены внутри зоны «масляных» полос, представляющих собой естественные дефекты плоской структуры из холестерических ЖК.

Для 3D – реконструкции распределения КТ внутри наногибридной матрицы был использован метод СЗНТ (рис. 36(b), (c)). Плоскость секционирования была расположена перпендикулярно оси спирали холестерических ЖК, что позволило уменьшить объём наблюдаемого фона и получить чёткую 3D – реконструкцию отдельных КТ внутри ЖК – матрицы.



**Рисунок 36.** Структурный анализ 2D и 3D распределения КТ, инкорпорированных в плоские и дефектные области матрицы холестерических ЖК. **(а)** – АСМ – изображение участка (40x40 мкм) гибридного образца КТ - холестерические ЖК, включающего как плоские, так и дефектные области. **(б)** – СЗНТ 3D – реконструкция распределения КТ на плоской области исследуемого участка гибридного образца. Видно, что КТ распределены равномерно по всей области. Ось Z соответствует оси холестерической спирали ЖК – матрицы. Размер реконструированной области 5.0×5.0×0.7 мкм. **(с)** – СЗНТ 3D – реконструкция распределения

КТ на дефектной области исследуемого участка гибридного образца. Ось Z соответствует оси холестерической спирали ЖК – матрицы. Размер реконструированной области  $50 \times 50 \times 5.0$  мкм.

(d) – АСМ - изображение плоской области исследуемого участка гибридного образца, на которой не наблюдается формирование кластеров КТ. Это изображение является одним из множества изображений, используемых для получения 3D – реконструкции, показанной на рисунке 36(b). (e) – Профиль поперечного сечения участка АСМ – изображения, представленного на рисунке 36(d) вдоль пунктирной линии.

На рисунке 36(d) представлено АСМ – изображение, которое было использовано для 3D – реконструкции распределения КТ, расположенных в гладкой и ровной области наногибридной плёнки, отмеченной на рисунке 36(b). На нём отчётливо видны две расположенные отдельно друг от друга КТ. Рассмотрев поперечное сечение рельефа, полученного на АСМ (рис. 36(e)), не остаётся сомнений в том, что на изображении действительно видны отдельные КТ, поскольку их высота не превышает 10 нм, что соответствует диаметру частично встроенной в ЖК – матрицу КТ с оболочкой из триоктилфосфинооксида. В дефектных зонах КТ агрегированы в мини кластеры со средним диаметром около 1,5 мкм (рис. 36(c)). Примечательным является тот факт, что несмотря на то, что размеры кластеров значительно меньше общей толщины гибридной матрицы холестерических ЖК, они всё же оказались достаточно большими для того, чтобы разрушить плоскую структуру образца в той области, в которой они находятся (рис. 35).

Для оценки количества и концентрации однородно распределённых в гибридной ЖК – матрице КТ, а также для оценки соответствующего значения их растворимости в этой матрице была использована следующая процедура, основанная на данных, проиллюстрированных на рисунке 36:

$$w_{\text{homo}} = (\rho/\rho_0) \cdot N \cdot v_{\text{QD}}, \quad (2) \quad \text{где}$$

$\rho = 5,8 \text{ г/см}^3$  – плотность ядра CdSe/ZnS КТ со структурой ядро/оболочка;

$\rho_0 \approx 1 \text{ г/см}^3$  – плотность матрицы холестерических ЖК;

$v_{\text{QD}} = 1,715 \cdot 10^{-25} \text{ м}^3$  – средний объем КТ без оболочки из триоктилфосфинооксида;

$N$  – объёмная концентрация однородно растворённых КТ в исследуемом образце, причём она была рассчитана из

$$N = (N_{\text{obs}}/V) \cdot (h/d_{\text{QD}}), \quad (3) \quad \text{где}$$

$N_{\text{obs}}$  – подсчитанное количество КТ в анализируемом 3D – реконструированном объеме (в соответствии с Рис. 36(b),  $N_{\text{obs}} = 22$ );

$h = 50 \text{ нм}$  – толщина ультрамикротомированной секции;

$V = 17,5 \text{ мкм}^3$  – объем образца (Рис. 36(b));

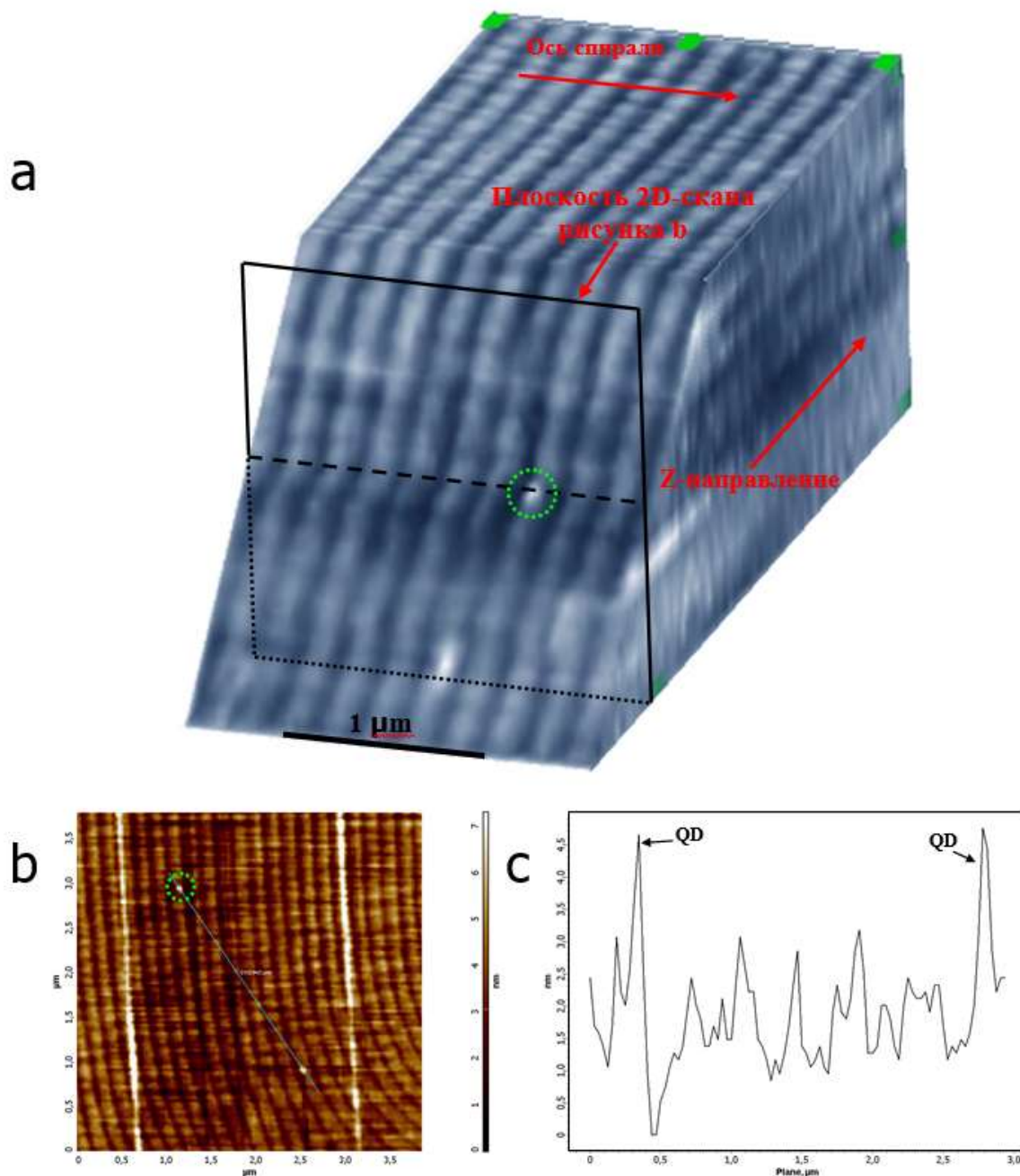
$d_{\text{QD}} \approx 10 \text{ нм}$  – средний диаметр КТ с оболочкой из триоктилфосфиноксида.

Таким образом, получается, что объёмная концентрация однородно растворённых в исследуемом образце КТ выглядела как  $N = (6,28 \pm 1,33) \cdot 10^{18} \text{ м}^{-3}$ . А согласно уравнению (2) процент по массе однородно растворённых КТ в матрице холестерических ЖК  $w_{\text{homo}}$  был равен  $(6,25 \pm 1,32) \cdot 10^{-4} \%$  по массе. Сравнив этот показатель с массовой долей изначально внедрённых в матрицу КТ, было получено, что только один из 40 добавленных в матрицу кристаллов КТ был действительно однородно в ней растворён.

При всём вышесказанном необходимо отметить, что анализ ПОМ – изображений и записанных спектров флуоресценции с большей площади исследуемого гибридного образца показал, что его большая часть характеризуется гладкой и плоской структурой без каких – либо дефектов (диаметр возбуждающего лазерного пучка 2 мм). Такое состояние объясняется тем, что дефектные области, содержащие кластеры, занимали меньшую часть общего объёма образца, а, следовательно, они не могли существенно повлиять на макроскопические оптические свойства исследуемого наногибридного материала.

Последним вопросом, касающимся характеристики наногибридного материала на основе холестерических ЖК и КТ, является вопрос о максимальной допустимой концентрации КТ в этом материале. Несмотря на то, что, как было показано выше, общая плоская и гладкая структура гибридной ЖК – матрицы не была нарушена в зонах однородного распределения КТ, все же возможно, что гибридная матрица подвержена локальному воздействию КТ, проявляющемуся максимально сильно в непосредственной близости от каждой КТ и теряющему свою силу по мере увеличения расстояния от каждой конкретной КТ. Для того, чтобы разобраться с этим моментом, была проделана 3D – реконструкция гладкой области гибридного образца методом СЗНТ (рис. 37). Плоскость сечения при этом была подобрана параллельно оси спирали исследуемого материала. На рисунке 37 (а) показано восстановленное 3D – изображение структуры гибридной матрицы на основе холестерических ЖК и КТ в области однородного распределения КТ. Видно, что на изображении отсутствуют какие – либо агрегаты КТ или неровности поверхностной структуры. Также стоит отметить, что никаких дефектов поверхности не наблюдается и на АСМ – изображениях этого же участка поверхности образца, причём даже в окрестностях отдельных КТ (рис. 37 (b), (c)). Таким образом, исходя из всего вышесказанного, был сделан вывод о том, что при использовании подходящих поверхностно – активных веществ объёмная концентрация

однородно распределенных КТ может быть существенно увеличена без значительного искажения плоской структуры матрицы холестерических ЖК. Причём для исследуемого образца объёмная концентрация КТ, инкорпорированных в гибридную ЖК – матрицу, может быть увеличена без потери качества гибридного материала на целый порядок.



**Рисунок 37.** Влияние отдельных КТ на плоскую структуру матрицы холестерических ЖК. **(а)** – СЗНТ 3D – реконструкция периодической структуры матрицы холестерических ЖК с инкорпорированными в неё КТ на плоской области образца. Зелёным кругом обведена отдельная инкорпорированная в матрицу КТ. **(b)** – одно из АСМ – изображений, использованных для 3D – реконструкции, показанной на рисунке (а). Зелёным кругом обведена та же отдельная КТ, что и

на рисунке (а). (с) – профиль поперечного сечения АСМ – изображения, показанного на рисунке (b) вдоль пунктирной линии.

### 2.2.5. Общие выводы по результатам исследования

Результатами данного исследования стала разработка установки с объединенными СЗМ и ОМ, создание уникальной экспериментальной процедуры структурной характеристики, позволяющей на одном и том же участке образца проводить измерения методами АСМ, ПОМ и флуоресцентной микроспектроскопии, а также восстанавливать 3D-структуру образца посредством СЗНТ. Был разработан метод оценки гомогенной растворимости единичных КТ в холестерической ЖК-матрице, основанный на анализе их 3D распределения и вычислении объемного процента единичных КТ в анализируемом объеме. Используемый в данном исследовании подход обеспечил разрешение по глубине 3D – реконструкции вплоть до 250 мкм при возможности параллельно проводить оптические и морфологические исследования материала практически всеми методами оптической микроскопии и спектроскопии.

Подводя черту под всеми результатами, полученными с помощью разработанной для данного исследования методики, можно отметить следующие характерные черты и свойства исследованных наногибридных полимерных плёнок на основе холестерических ЖК и КТ:

- 1) Максимальная массовая доля однородно растворённых в гибридной ЖК-матрице КТ составила  $5\text{-}7,5\cdot 10^{-4}\%$ , т. е. только одна из 40 инкорпорированных в матрицу КТ действительно была в ней однородно растворена.
- 2) В связи с низкой аффинностью поверхности КТ к поверхности ЖК - матрицы более 97% инкорпорированных в гибридную ЖК - матрицу КТ агрегировали в кластеры со средним диаметром около 1,5 мкм.
- 3) Кластеры КТ расположены только в дефектных областях гибридной ЖК - матрицы и занимают меньшую часть общей поверхности образца.
- 4) Большая часть гибридной матрицы из холестерических ЖК и КТ характеризуется гладкой и ровной структурой, а также высоко отрицательным коэффициентом диссиметрии флуоресценции ( $g_e \approx 1.5$ ), свидетельствующем о высоком качестве материала.
- 5) Особого влияния отдельных КТ на структуры гибридной ЖК - матрицы обнаружено не было. Среднее расстояние между отдельными КТ на плоских и гладких участках составило около 150 нм, что в теории позволяет увеличить объёмную концентрацию КТ в гибридной матрице как минимум на порядок, не разрушая при этом структуру самой матрицы.

### **3. СИСТЕМА ЗОНДОВО-ОПТИЧЕСКОЙ 3D КОРРЕЛЯЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

По результатам исследования наногибридных плёнок холестерических ЖК с инкорпорированными в них КТ стало ясно, что инструментальный подход, объединяющий СЗНТ и ОМ, при исследовании и контроле качества нанотехнологичных процессов и материалов, в том числе таких значимых материалов как полимерные и ЖК - матрицы, биомедицинские материалы (фармацевтические препараты и системы доставки лекарств) и биологические объекты (ткани, клетки, микроорганизмы) является наиболее грамотным и информативным. Однако, разработанная для вышеупомянутого исследования установка всё ещё обладала одним существенным недостатком – она не позволяла осуществлять изначальное позиционирование, которое могло бы существенно упростить процедуру исследования, а также сократить время исследования за счёт исключения временных издержек, связанных с поиском площадки, на которой были получены АСМ – ОМ данные для выполнения серии срезов той же области и последующей 3D – реконструкции. Для того, чтобы подобный инструментальный подход можно было бы использовать повсеместно, было необходимо пересмотреть конструкцию всей системы таким образом, чтобы уместить её в одном едином приборе.

Данная часть работы проводилась под руководством Мочалова Константина Евгеньевича (с.н.с. Лаборатории молекулярной биофизики ИБХ РАН).

Итоговым вариантом уникальной установки, разработанной в данной исследовательской работе, стала единая установка, объединяющая в одном приборе конфокальную микроспектроскопию с 3D СЗНТ [116]. Причём используемый здесь принцип объединения конфокального микроскопа с СЗНТ также легко переложим и на большинство методов высокоразрешающей оптической зондовой наноскопии (СБОМ, АСМ – ИК, TERS и др.). Кроме того, за счёт объединения двух этих типов исследования в одной установке данные с оптической составляющей и с СЗМ стало возможно получать одновременно, осуществляя при этом последовательное микротомирование образца и прецизионное приведение его в исходное положение, не вынимая из прибора. Объединение в один прибор СЗНТ с ОМ позволило при помощи одного устройства определять и наномасштабную объёмную морфологию исследуемых объектов, и их химический состав, причём полученные данные при этом являются взаимно скоррелированными.

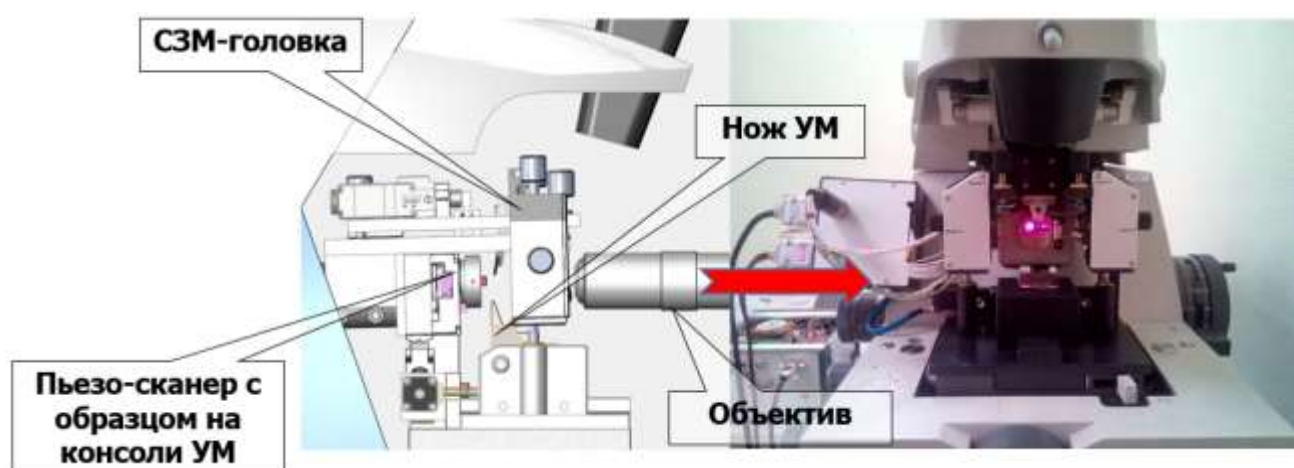
#### **3.1 Корреляционная схема СЗНТ – ОМ**

Основой СЗНТ в разработанной корреляционной схеме является адаптированный под специально разработанную СЗМ – голову УМ Reichert – Jung Ultracut E компании Leica



Microsystems (Австрия). Стоит отметить, что подобной адаптации может быть подвергнут почти что любой коммерчески доступный УМ.

Основными препятствиями на пути создания единой установки, совмещающей в себе СЗНТ и ОМ, стали отсутствие оптического доступа для высокоапертурных объективов, а также высокий уровень шума. Они были преодолены посредством разработки специальной сканирующей СЗМ – системы (рис.38 слева). СЗМ – система включает в себя сканирующее устройство и СЗМ – голову, представляющую собой устройство подвода с дефлектометром.



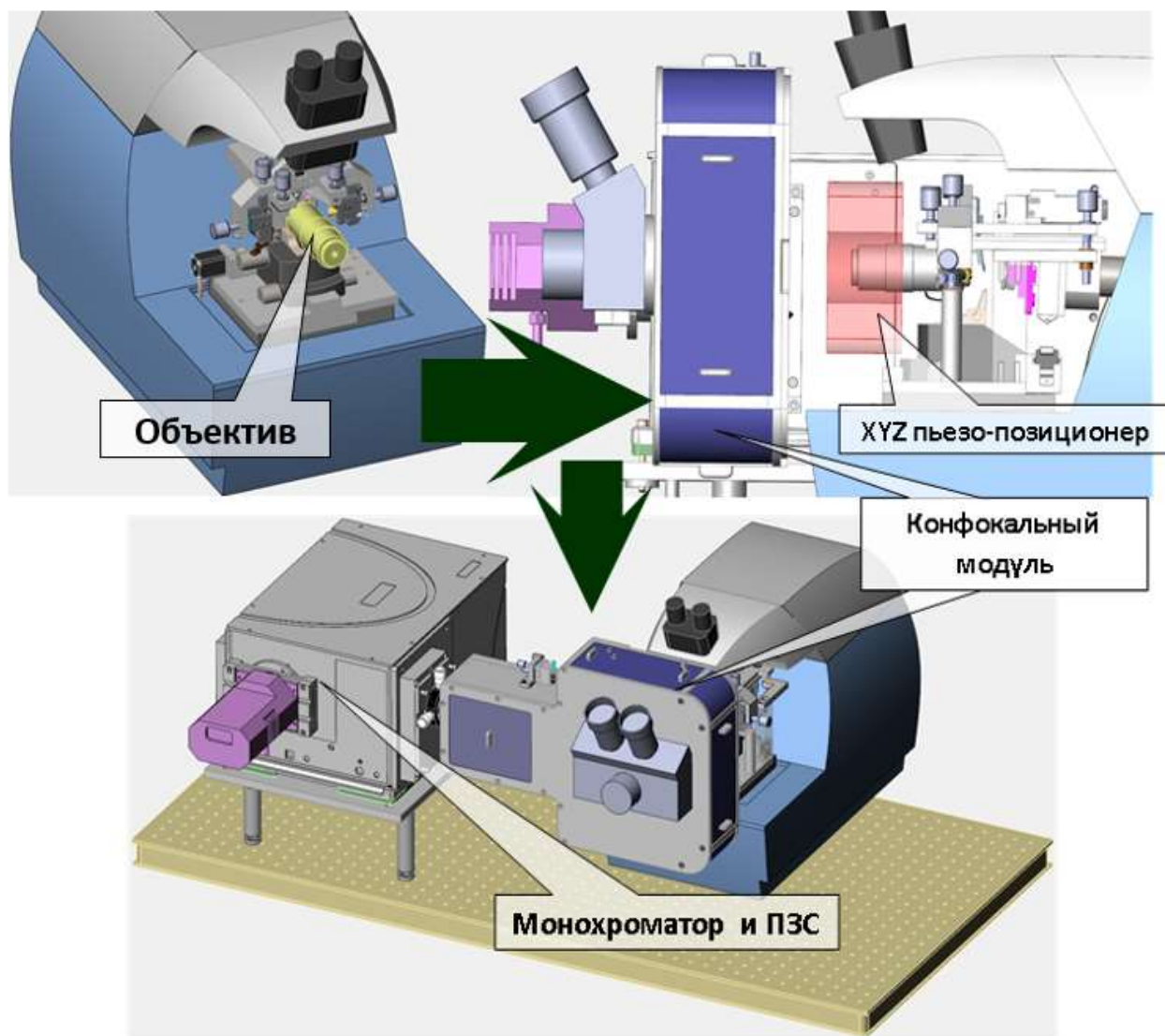
**Рисунок 38.** Схема системы СЗНТ, используемой в работе. Слева – комбинированное устройство сканирования с подвижной консолью УМ и ножом (вид сбоку); справа – фронтальная фотография устройства УМ/СЗМ.

Сканирующее устройство представляет собой быстродействующий плоскопараллельный XYZ – пьезосканер, жёстко закреплённый на подвижной консоли УМ, осуществляющей его перемещение. Диапазон сканирования пьезосканером составляет 50x50x5 мкм, а скорость сканирования может достигать 5 Гц. Пьезосканер также оснащён специальным оптическим сенсором, призванным осуществлять контроль и удержание его перемещения в режиме линейаризации. Для исключения смещения образца в процессе его микромирования в центре пьезосканера расположена система для жёсткого закрепления исследуемого образца. При выполнении среза образец, закреплённый на пьезосканере, посредством работы подвижной консоли перемещается из верхней точки, в которой происходит фиксация подвижной консоли для проведения СЗМ/ОМ – измерений, в нижнюю точку. Таким образом осуществляется срез образца. В данной установке в качестве ножа УМ был использован алмазный нож Ultra AFM 35 компании Diatome (Швейцария), т.к. он обеспечивает максимально аккуратное секционирование и подходит для любого типа секционируемого материала. После среза Z – координата XY – плоскости образца определяется исключительно положением ножа УМ. А так как она же

является и фокальной плоскостью объектива ОМ, и плоскостью сканирования СЗМ, был разработан специальный держатель, осуществляющий регулировку XY – плоскости образца.

СЗМ – голова (рис. 38 справа) состоит из дефлектометра и съёмного держателя СЗМ – зонда. Дефлектометр включает в себя полупроводниковый лазер и четырёхсекционный фотодиод, отведённые друг от друга таким образом, чтобы было возможно сфокусировать и приблизить на образце объектив. В данной установке был использован объектив 50X Mitutoyo Plan Apo Infinity Corrected Long WD Objective компании Mitutoyo (Япония). Рабочее расстояние объектива 13 мм. Таким образом в представленной в данной работе уникальной установке был решён вопрос отсутствия оптического доступа для высокоапертурных объективов. Проблема же, связанная с высоким уровнем шума, была решена посредством закрепления на период всех измерений головы СЗМ в верхней «рабочей» точке непосредственно на подвижной консоли УМ. Для произведения любого последующего среза исследуемого образца в представленной установке производится отвод и отсоединение головы СЗМ от консоли УМ. При этом консоль УМ, продолжая своё движение вниз, реализует очередное секционирование соответствующего образца. Главными достоинствами такого механизма повторного микромирования являются наличие достаточной пространственной развязки между ножом УМ и держателем кантилевера, а также существенное облегчение общего веса механизма УМ во время реализации срезов. Кроме того, примечательным является так же и то, что описанная выше система позволяет осуществлять позиционирование головы СЗМ по осям X и Y с крайне высокой точностью (1 мкм и менее между парой циклов срезов УМ).

Следующим этапом сборки уникальной установки, представленной в данной работе, является инструментальное объединение описанной выше усовершенствованной СЗМ – системы с оптической частью будущего корреляционного микроскопа. Общая схема объединения представлена на рисунке ниже (рис. 39).



**Рисунок 39.** Схема корреляционной установки СЗНТ–ОМ. Слева идейный эскиз установки СЗНТ–ОМ; справа – комбинация конфокального устройства, объектива и СЗНТ; внизу – общая вид СЗНТ–ОМ.

Суть выполненного объединения заключается в добавлении к модифицированной СЗМ – системе высокоапертурного объектива (рис. 39 слева). Объектив был установлен на плоскопараллельный XYZ – пьезосканер, в центре которого было проделано специальное отверстие под переходник, позволяющий осуществлять горизонтальное крепление пьезосканера. Такой метод крепления сделал возможным расположение центра масс объектива в верхней плоскости сканера. Сканер, в свою очередь, был оснащён датчиками, призванными удерживать и осуществлять контроль его перемещения. Диапазон сканирования используемого в данной схеме сканера составляет 100x100x50 мкм. Сам же XYZ – пьезосканер установлен на моторизованный 1D линейный ретранслятор 8MT177 – 100 компании Standa (Литва). Таким

образом, была получена возможность позиционирования центра поля зрения объектива и острия СЗМ - зонда вплоть до 0,1 нм внутри квадратной области, соответствующей масштабу 100x100 мкм. Регуляция объектива по оси Z происходит в диапазоне 50 мкм так же с шагом в 0,1 нм. Диапазон движения использованного линейного ретранслятора составляет 100 мм при разрешении 1 мкм/шаг. Такие параметры ретранслятора позволяют осуществлять его автоматическое отведение/подведение таким образом, чтобы он не выходил за пределы области фокусировки объектива. Необходимо также отметить, что в конфокальный модуль, с которым совмещён объектив, входят также флуоресцентная и рамановская системы (рис. 39 справа). Кроме того, к конфокальной части также были присоединены монохроматор (Andor Shamrock 750, Andor Technology), CCD – камера (Andor DU971P – BV, Andor Technology), Ar лазер, излучающий на длине волны 488 нм (GN – 519M Ar\*, Plazma, Россия) и краевой фильтр на 488 нм (Semrock 488 – nm RazorEdge, Rochester, США).

Собранная вышеописанным путём уникальная установка позволяет производить исследования топографии СЗМ при скорости сканирования 1 Гц и площади 512x512 точек. Флуоресцентные конфокальные измерения могут быть произведены при времени накопления 0,3 с на точку на площади, соответствующей размеру 50x50 точек.

Представленная в данной работе уникальная установка, совмещающая в одном устройстве СЗНТ и конфокальный микроскоп, позволяет производить исследования как посредством контактной, так и полуконтактной АСМ, латеральной силовой микроскопии, СМС, фазовой визуализацией, МСМ, а также многими другими методами СЗМ. Кроме того, данная система позволяет производить объёмную 3D реконструкцию морфологии исследуемых образцов, и в состоянии реализовать 3D версии TERS и s-SNOM. Отдельно необходимо выделить тот факт, что уже при внесении весьма незначительных изменений в систему лазерного возбуждения, на представленной в данной работе установке возможно получить 3D версию PiFM (фотоиндуцированной силовой микроскопии).

### **3.2. Разработка методики исследования материалов с помощью уникальной установки СЗНТ – ОМ на примере флуоресцентных коммерчески доступных магнитных микрометровых микросфер, используемых в иммунодиагностике**

Наилучшим образом действие разработанной и собранной по результатам всех вышеперечисленных исследований уникальной установки можно продемонстрировать на примере анализа с её помощью мягкого композитного материала, имеющего в своём составе твёрдые нано- и микрочастицы. Таким материалом стали флуоресцентные магнитные

микросферы COOH QuantumPlex™ размером 5,5 мкм компании Bangs Laboratories, Inc. (США). Такого рода микросферы являются замечательным тестовым материалом поскольку они одновременно сочетают в себе мягкую полимерную структуру с твёрдыми п/п наночастицами и твёрдыми микрометровыми магнитными, кроме того, микросферы за счёт своей формы обладают свойством центрической симметричности, поэтому для их исследования достаточно сделать только один разрез в их центральной части. Одновременно с этим исследование и разработка общей методики исследования такого рода материалов несёт высокую практическую и коммерческую значимость, т.к. такие микросферы на сегодняшний день активно используются в качестве инструментов для иммунодиагностики.

### **3.2.1. Подготовка материалов**

Суспензию, содержащую  $5 \times 10^5$  микросфер в 50 мкл, центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин, после чего удаляли 90% объема супернатанта. Далее полученную суспензию микрочастиц сушили на воздухе в 1,5-миллилитровой пробирке Эппендорфа (Эппендорф, Гамбург, Германия) в течение 24 ч. После всех вышеупомянутых процедур высушенные микрочастицы были внедрены в среду эпоксидной смолы (кат. № 45359, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) и полимеризованы при 60°C в течение 72 часов. Встроенные микросферы были нарезаны описанной в пункте 2.3.1. системой. Толщина разреза составила 70 нм.

### **3.2.2. Методика исследования**

Исследование подготовленных микросфер происходило в два этапа: СЗМ – ОМ и СЗНТ – ОМ.

На СЗМ – ОМ этапе был исследован срез подготовленных микросфер в области размером 14,0 x 14,0 мкм. Были использованы методы АСМ – топографии, МСМ и конфокальной флуоресцентной микроскопии. Размер сканирования при СЗМ – измерениях составлял 512 x 512 пикселей при скорости сканирования равной 0,8 Гц. Все СЗМ – измерения были проведены в режиме двухпроходной МСМ, включающем в себя измерение точности полуконтактного режима во время первого прохода и измерение фазы колебаний в режиме подъема для каждой линии сканирования во время второго. При этом фазовый контраст при втором проходе определялся магнитно – силовой визуализацией, а высота подъёма для магнитного изображения составляла 25 нм. Для МСМ – измерений были использованы магнитные кантилеверы ASYMFМ компании Oxford Instruments Asylum Research с покрытием из CoCr и характерной резонансной частотой 70 кГц. Для конфокальных флуоресцентных измерений область сканирования составляла 100 x 100

пикселей при времени интегрирования 0,2 с/пиксель. Флуоресцентный сигнал был интегрирован в диапазоне 670 – 690 нм при длине волны излучения возбуждающего лазера 632,8 нм и мощности 200 мкВт.

СЗНТ – ОМ этап исследований был необходим для грамотной оценки корреляции между морфологическими характеристиками микросфер, а также между пространственным распределением магнитных свойств и флуоресцентного красителя в них. Для произведения СЗНТ – ОМ исследований образец встроенных микросфер был зафиксирован на пьезосканере таким образом, что головка СЗМ была отведена на 70 мм от рабочей плоскости (плоскости разреза УМ) и отсоединена (рис. 40). При этом весь СЗНТ – ОМ этап исследования можно разделить на несколько отдельных шагов.

На первом шаге вместе с отсоединением головки СЗМ и объектива был произведён первый разрез УМ, цель которого состояла в формировании чёткой плоской поверхности образца микросфер.

После этого головка СЗМ была установлена обратно на своё место, а объектив продвинут и сфокусирован на поверхности исследуемого образца.

На следующем шаге было осуществлено приземление головки СЗМ, а за счёт получения конфокального изображения кончика кантилевера с использованием лазерного конфокального режима было выполнено точное выравнивание СЗМ и конфокального сканирования. Фокус объектива был отрегулирован до максимума отражённого сигнала лазерного излучения возбуждения, а сканирование было выполнено в области 10 x 10 мкм (512 x 512 пикселей) при частоте 2 Гц. После вышеперечисленных процедур полученное изображение консольного наконечника уже представляло собой круглое пятно со средним диаметром около 200 нм. Далее кантилевер был помещён в центр пятна и удержан в этом положении на время последующих измерений в замкнутом контуре. Это обеспечило согласование между СЗМ и конфокальными областями сканирования с точностью до нескольких десятков нанометров.

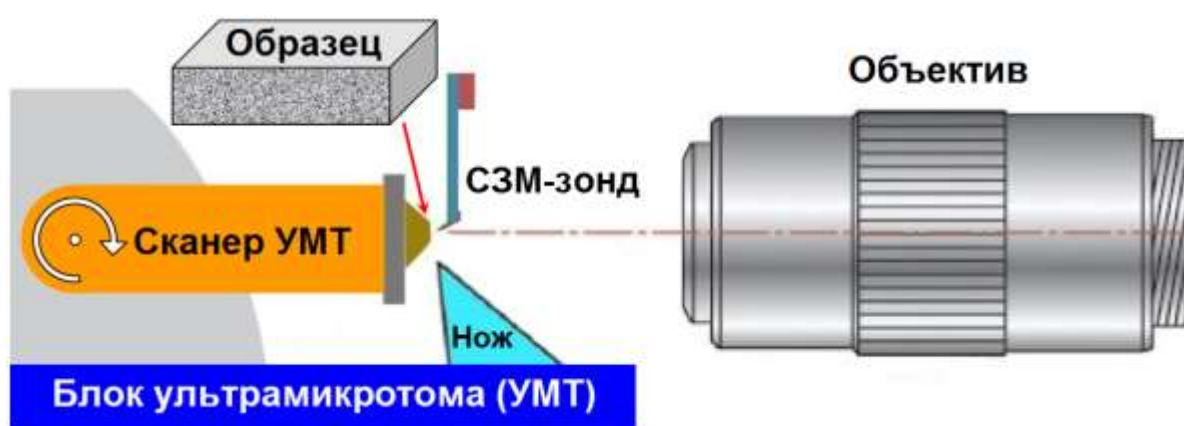
Следующий шаг заключил в себе одновременные измерения с использованием СЗМ – методов (АСМ и МСМ) и метода ОМ (конфокальной флуоресцентной микроскопии).

Далее головка СЗМ была убрана, а рычаг УМ перемещён из рабочего положения вниз, благодаря чему головка СЗМ была отсоединена от рычага УМ, а сам рычаг был зафиксирован на специальных опорах.

Следующий шаг состоял в дальнейшем перемещении рычага УМ вниз, что привело к следующему разрезу исследуемого образца. При этом толщина образца регулировалась вытягивающим устройством плеча УМ с минимальным шагом около 20 нм.

Далее, благодаря восходящему движению рычага УМ головка СЗМ была зафиксирована в том же положении, в котором она находилась раньше, а система сканирования с фиксированным на ней образцом была приведена в верхнюю рабочую точку.

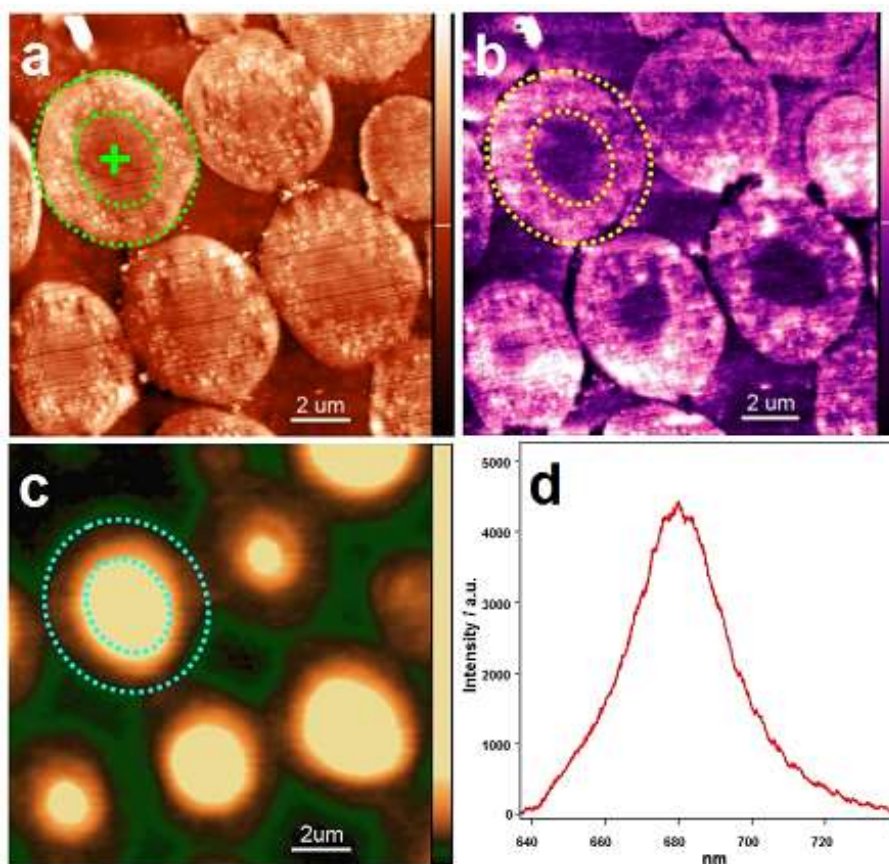
Таким образом вышеописанная процедура получения срезов исследуемого образца была продолжена до тех пор, пока накопленный массив данных 2D – СЗМ и ОМ не стал достаточным для получения информативного трёхмерного рисунка.



*Рисунок 40.* Схема СЗНТ – ОМ этапа исследования подготовленных флуоресцентных микросфер.

### 3.2.3. Результаты исследования

На рисунке 41 показаны корреляционные изображения поперечных сечений исследуемых микросфер, полученные методами АСМ, МСМ и конфокальной флуоресцентной микроскопии, а также соответствующий спектр флуоресценции.



**Рисунок 41.** Корреляционные АСМ, МСМ и конфокальные флуоресцентные изображения поперечных сечений микросфер и соответствующий им спектр флуоресценции. **(а)** – АСМ – изображение рельефа поверхности секционированных полимерных СООН микросфер компании QuantumPlex™ размером 5,5 мкм. Диапазон изменения высоты составил 40 нм. **(b)** – Фазовое МСМ - изображение той же области, что показана на рисунке (а). Диапазон изменения фазы 0,8 °. **(с)** – Флуоресцентное конфокальное изображение той же области, что и на рисунке (а). Время интегрирования - 0,2 сек. Интенсивность измерена в относительных единицах, диапазон изменения 300 отн. ед. **(d)** – Флуоресцентный спектр, полученный из точки, обозначенной зеленым крестом на рисунке (а). Время интегрирования - 3 сек. Концентрические круги на рисунках (а – с) указывают границы микросфер (внешние круги) и границы между областями микросфер, заполненных флуоресцентными метками и магнитными наночастицами. Область сканирования для рисунков (а – с) 14 × 14 мкм.

Исходя из полученных данных, можно сказать, что наночастицы размером от 10 до 100 нм в основном распределены во внешнем слое микросфер по ширине, соответствующей примерно половине радиуса микросфер (~1,2 мкм). Такой вывод согласуется с данными, полученными посредством МСМ – исследования, и говорит о том, что эти наночастицы являются магнитными и учитывают магнитные свойства микросфер. На рисунке 41 также видно, что центральная



область микросфер характеризуется высокой интенсивностью флуоресценции, что говорит об отсутствии в ней магнитных частиц и присутствии высоких концентраций флуоресцентного красителя.

Эта установка может применяться для корреляционных измерений как морфологических, так и магнитных, и оптических характеристик нано- и микроматериалов. Представленные в данной исследовательской работе результаты показали, что корреляционная установка СЗНТ – ОМ способна обеспечить высококачественные АСМ – изображения с поверхности образцов, нарезанных УМ. Шум сигнала по Z – оси не превышал 0,05 нм, а боковые направления (плоскость XY) полностью определялись диаметром консольного наконечника (в приведённом в работе исследовании не более 10 нм). Средняя ошибка фиксации головки СЗМ на плече УМ во время процедуры СЗНТ – ОМ исследования составила 0,6 мкм. Оценка конфокальных параметров показала, что при возбуждении лазером на длине волны 632,8 нм глубина фокусировки составляет около 710 нм, а объем лазерного фокуса составляет около 0,16 мкм<sup>3</sup>. На длине волны, где регистрировалась флуоресценция микросфер (680 нм), поперечное разрешение составило около 340 нм, а осевое разрешение (толщина оптического сечения) было близко к 1,8 мкм. Современное состояние полученной в данной работе системы СЗНТ – ОМ позволяет выполнять 3D – варианты таких оптико – зондовых методов, как комбинационное рассеяние, усиленное острием зонда (TERS) и сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия (SNOM).

К недостаткам полученной корреляционной системы можно отнести тот факт, что толщина оптического участка несравнимо больше, чем шаг разделения УМ (20 нм), что приводит к значительным ограничениям в использовании всего потенциала 3D – изображений системы СЗНТ – ОМ и не позволяет определить точную корреляцию между морфологией и данными ОМ. В частности, стоит отметить, что максимальная реализации потенциала уникальной установки возможна только для сильно непрозрачных объектов.

Исходя из всего вышесказанного, можно предположить возможный вектор развития представленной в данной работе уникальной установки и метода исследования с её помощью. Таким вектором, скорее всего, является оптическая наноскопия. Данная линия разработок является приоритетной, а полученная в данной работе система подходит для проведения передовых измерений с высоким разрешением (STORM, PALM, STED) без существенной модификации её ключевых параметров.

Отдельно стоит выделить, что комбинации СЗМ и ОМ в трёхмерную корреляционную микроскопию предлагает также перспективу разработки 3D – версий почти всех ближнепольных СЗМ, известных на сегодняшний день, за счёт использования эффектов перераспределения и

экстремальной локализации э/м поля в окрестностях наконечников сканирующих зондов разных типов. Например, 3D-версия новой технологии фотоиндуцированной силовой микроскопии (PiFM) потребует лишь незначительных изменений в системе возбуждения лазера. Более значительные, но осуществимые изменения позволят получить 3D – объёмные изображения для ИК – АСМ. В последнем случае необходимые изменения будут включать использование специальных зеркал для введения ИК-излучения в ту же геометрию, что и для бокового освещения в случае TERS.

Подводя черту, необходимо ещё раз отметить, что в результате данной исследовательской работы был разработан и протестирован аппарат для проведения исследований методом СЗНТ-ОМ, объединенный в единый комплекс [116]. Также была разработана общая методика исследования таким аппаратом флуоресцентных композитных микросфер, активно используемых сегодня в области иммунодиагностики. Предложенный в данной работе метод исследования сочетает в себе технологии СЗМ, ОМ и УМ, предлагает широкие перспективы для разработки многопараметрического корреляционного анализа объёмных наноструктурных композиционных материалов (в том числе биоматериалов), а также позволяет выполнять ультратонкие срезы (до 20 нм) и получать серию последовательных наборов 2D – данных практически во всех режимах конфокальной микроспектроскопии. При этом объединение всех этих данных в единый массив позволяет получать 3D – характеристику не только морфологии, но ещё и химического состава, межкомпонентного взаимодействия, механических, электрических, магнитных, а также других свойств объёмных композитных материалов. Проведённые в данном исследовании испытания продемонстрировали, что при комбинации методов СЗМ, ОМ и УМ в аппарате с одним корпусом не возникает каких бы то ни было компромиссных ситуаций, ограничивающих работоспособность техники.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В ходе данной работы была создана экспериментальная установка, представляющая собой комбинацию СЗМ и ПОМ, состоящая из системы сканирования АСМ, вертикального ОМ, столика для инвертированной оптической микроскопии и системы кросс-поляризованного излучения, а также методика, позволяющая оценивать влияние сфокусированного лазерного пучка на тонкие плёнки жидких кристаллов.

2. Посредством данной методики было установлено, что сфокусированное облучение лазером приводит к образованию кратеров только в плёнках толщиной 5-10 мкм, в тонких плёнках (100-200 нм) кратеры не образуются. Хиральная структура плёнки не оказывает никакого воздействия на кинетику образования кратеров и их глубину.

3. Была разработана уникальная трёхэтапная экспериментальная процедура структурной характеристики, позволяющей на одном и том же участке образца проводить измерения методами АСМ, ПОМ и флуоресцентной микроспектроскопии, а также восстанавливать 3D-структуру образца посредством СЗНТ. Был разработан метод оценки гомогенной растворимости единичных КТ в холестерической ЖК-матрице, основанный на анализе их 3D распределения и вычислении объемного процента единичных КТ в анализируемом объеме.

4. Было посчитано, что максимальная массовая доля однородно растворённых CdSe/ZnS КТ в гибридной матрице холестерических ЖК составляет  $5 \cdot 10^{-4}$  –  $7,5 \cdot 10^{-4}$  %, среднее расстояние между отдельными КТ составляет около 150 нм, и они не оказывают особого влияния на структуру матрицы. Только одна из 40 инкорпорированных в матрицу КТ действительно была в ней однородно растворена, а более 97% КТ агрегировали в кластеры со средним диаметром около 1,5 мкм, расположенные только в дефектных областях гибридной ЖК-матрицы и занимающие меньшую часть общей поверхности образца. Это объясняется низкой аффинностью поверхности КТ к поверхности ЖК-матрицы. Отдельные КТ особого влияния на матрицу не оказывают, что позволяет увеличить объёмную концентрацию КТ как минимум на порядок.

5. Был разработан и протестирован аппарат для проведения исследований методом СЗНТ-ОМ, объединенный единый комплекс. Также была разработана общая методика исследования таким аппаратом флуоресцентных магнитных композитных микросфер, сочетающая в себе технологии СЗМ, ОМ и УМ. Данные были объединены в единый массив, позволяющий получать 3D-характеристику морфологии, химического состава, межкомпонентного взаимодействия, механических, электрических, магнитных, а также других свойств объёмных композитных материалов. Проведённые в данном исследовании испытания продемонстрировали, что при комбинации методов СЗМ, ОМ и УМ в едином аппаратном комплексе не возникает каких бы то ни было компромиссных ситуаций, ограничивающих работоспособность техники.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Dukes, M. J. Correlative fluorescence microscopy and scanning transmission electron microscopy of quantum-dot-labeled proteins in whole cells in liquid / M. J. Dukes, D. B. Peckys, N. Jonge // ACS Nano 2010, 4, pp. 4110-4116.
2. Sharma, S. Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM, and force spectroscopy / S. Sharma, H. I. Rasool, V. Palanisamy, C. Mathisen, M. Schmidt, D. T. Wong // ACS Nano 2010, 4, pp. 1921-1926.
3. Parent, L. R. Direct in situ observation of nanoparticle synthesis in a liquid crystal surfactant template / L. R. Parent, D. B. Robinson, T. J. Woehl, W. D. Ristenpart, J. E. Evans, N. D. Browning, I. Arslan // ACS Nano 2012, 6, pp. 3589-3596.
4. Caplan, J. The power of correlative microscopy: multi-modal, multi-scale, multi-dimensional / J. Caplan, M. Niethammer, R. M. Taylor, K. J. Czymmek // Curr. Opin. Struct. Biol. 2011, 21, pp. 686-693.
5. Timmermans, F. J. Contributed Review: Review of integrated correlative light and Electron microscopy / F. J. Timmermans, C. Otto // Rev. Sci. Instrum. 2015, 86, 011501.
6. Lucas, M. Invited review article: combining scanning probe microscopy with optical spectroscopy for applications in biology and materials science / M. Lucas, E. Riedo // Rev. Sci. Instrum. 2012, 83, 061101.
7. Mironov, A. A. Correlative light-electron microscopy: a potent tool for the imaging of rare or unique cellular and tissue events and structures / A. A. Mironov, G. V. Beznoussenko // Meth. Enzymol. 2012, 504, pp. 201-219.
8. Spiegelhalter, C. From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure: novel integrated methods for high-pressure freezing and correlative light-electron microscopy / C. Spiegelhalter, V. Tosch, D. Hentsch, M. Koch, P. Kessler, Y. Schwab, J. Laporte // PLoS One 2010, 5, e9014.
9. Pilhofer, M. Bacterial TEM. New insights from cryomicroscopy / M. Pilhofer, M. S. Ladinsky, A.W. McDowell, G. J. Jensen // Methods Cell Biol. 2010, 96, pp. 21-45.
10. Bouchet-Marquis, C. Cryo-electron tomography on vitrified sections: a critical analysis of benefits and limitations for structural cell biology / C. Bouchet-Marquis, A. Hoenger // Micron 2011, 42, pp. 152-162.
11. Al-Abboodi, A. Three-dimensional nanocharacterization of porous hydrogel with ion and electron beams / A. Al-Abboodi, J. Fu, P. M. Doran, P. P. Y. Chan // Biotechnol. Bioeng. 2013, 110, pp. 318-326.

12. Mironov, V. L. *The Fundamentals of Scanning Probe Microscopy // The Russian Academy of Sciences Institute for Physics of Microstructures, Nizhniy Novgorod, 2004.*
13. Wang, C. *Single molecule chemistry and physics: an introduction / C. Wang, C. Bai // NanoScience and Technology, Springer, Berlin, Heidelberg, 2006.*
14. Efimov, A. E. *Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer samples / A. E. Efimov, A. G. Tonevitsky, M. Dittrich, N. B. Matsko // J. Microsc. 2007, 226, pp. 207-217.*
15. Alekseev, A. *Three-dimensional electrical property mapping with nanometer resolution / A. Alekseev, A. Efimov, K. Lu, J. Loos // Adv. Mater. 2009, 21, pp. 4915-4919.*
16. Efimov, A. E. *Analysis of native structures of soft materials by cryo scanning probe tomography / A. E. Efimov, H. Gnaegi, R. Schaller, W. Grogger, F. Hofer, N. B. Matsko // Soft Matter. 2012, 8, pp. 9756-9760.*
17. Efimov, A. E. *3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography / A. E. Efimov, M. M. Moisenovich, V. G. Bogush, I. I. Agapov // RSC Adv. 2014, 4, 60943.*
18. Alekseev, A. *Three-dimensional imaging of polymer materials by scanning probe tomography / A. Alekseev, A. Efimov, J. Loos, N. Matsko, J. Syurik // Eur. Polym. J. 2014, 52, 154.*
19. Rust, M. J. *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) / M. J. Rust, M. Bates, X. W. Zhuang // Nat. Meth. 2006, 3, pp. 793-795.*
20. Betzig, E. *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution / E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess // Science 2006, 313, pp. 1642-1645.*
21. Westphal, V. *Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement / V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, S. W. Hell // Science 2008, 320, pp. 246-249.*
22. Stadler, J. *Chemical imaging on the nanoscale – top-illumination tip-enhanced Raman spectroscopy / J. Stadler, T. Schmid, R. Zenobi // Chimia 2011, 65, pp. 235-239.*
23. Specht, M. *Scanning plasmon near-field microscope / M. Specht, J. D. Pedarnig, W. M. Heckl, T. W. Hansch // Phys. Rev. Lett. 1992, 68, pp. 476-479.*

24. Jahng, J. Linear and nonlinear optical spectroscopy at the nanoscale with photoinduced force microscopy / J. Jahng, D. A. Fishman, S. Park, D. B. Nowak, W. A. Morrison, H. K. Wickramasinghe, E. O. Potma // *Acc. Chem. Res.* 2015, 48, pp. 2671-2679.
25. Mochalov, K. Silver nanoparticles strongly affect the properties of bacteriorhodopsin, a photosensitive protein of *Halobacterium Salinarium* purple membranes / K. Mochalov, D. Solovyeva, A. Chistyakov, B. Zimka, E. Lukashev, I. Nabiev, V. Oleinikov // *Materials Today: Proceedings* 3, 2016, pp. 502-506.
26. Efimov, A. E. A novel design of a scanning probe microscope integrated with an ultramicrotome for serial block-face nanotomography / A. E. Efimov, I. I. Agapov, O. I. Agapova, V. A. Oleinikov, A. V. Mezin, M. Molinari, I. Nabiev, K. E. Mochalov // *Rev. Sci. Instrum.* 2017, 88, 023701.
27. Атомно – силовая микроскопия // Лабораторные работы для студентов кафедр ФТН и ФТТ факультета ФОПФ МФТИ.
28. Миронов, В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии / Учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений // Российская Академия Наук, Институт Физики Микроструктур, Нижний Новгород, 2004.
29. Суслов, А. А. Сканирующие зондовые микроскопы (обзор) / А. А. Суслов, С. А. Чижик // *Материалы, Технологии, Инструменты – том 2, 1997, №3, сс. 78–89.*
30. Wright, C. J. MICROSCOPY | Atomic Force Microscopy / C.J. Wright, L.C. Powell, D.J. Johnson, N. Hilal // *Reference Module in Food Science, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 2014, pp. 666–675.
31. Тишин, А. М. Магнитно – силовая микроскопия поверхности / А. М. Тишин, И. В. Яминский // *Усп. хим.*, 1999, том 68, выпуск 3, сс. 187–193.
32. Золотарёв, В. М. Современные методы исследования оптических материалов Часть II Методы исследования поверхности оптических материалов и тонких плёнок / В. М. Золотарёв, Н. В. Никоноров, А. И. Игнатъев // 2013, Санкт-Петербург.
33. Штейн, Г. И. Руководство по конфокальной микроскопии / Г. И. Штейн // Российская Академия Наук Институт Цитологии, 2007, Санкт – Петербург.
34. Феофанов, А. В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях / А. В. Феофанов // Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2007, Москва.

35. Quintana, C. Ultramicrotomy for cross-sections of nanostructure / C. Quintana // *Micron* Volume 28, Issue 3, 1997, June, pp. 217 – 219.
36. Michler, H. G. Electron microscopy of polymers / G. H. Michler // Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
37. Fonta, C. L. Correlative microscopy / C. L. Fonta, B. M. Humbel // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, Volume 581, September 1<sup>st</sup>, pp. 98 – 110.
38. Howes, C. S. Correlative microscopy for structural microbiology / S. C. Howes, R. I. Koning, A. J. Koster // *Current Opinion in Microbiology*, 2018, Volume 43, June, pp. 132 – 138.
39. Osborn, M. Individual microtubules viewed by immunofluorescence and electron microscopy in the same PtK2 cell / M. Osborn, R.E. Webster, K. Weber // *J Cell Biol.*, 1978, Jun., 77(3):R27-34.
40. Webster, R.E. / R.E. Webster, M. Osborn, K. Weber // *Exp Cell Res.*, 1978, Nov., 117(1):47-61.
41. Jones, S. / S. Jones, S.K. Chapman, P.R. Crocker, G. Carson, D.A. Levison // *J Clin Pathol.*, 1982, Apr., 35(4):425-9.
42. van Driel, L. F. Tools for correlative cryo-fluorescence microscopy and cryo-electron tomography applied to whole mitochondria in human endothelial cells / L. F. Driel, J. A. Valentijn, K. M. Valentijn, R.I. Koning, A. J. Koster // *Eur J Cell Biol.*, 2009, Nov., 88(11):669-84.
43. Janel, S. Chapter 9 - CLAFEM: Correlative light atomic force electron microscopy / S. Janel, E. Werkmeister, A. Bongiovanni, F. Lafont, N. Barois // *Methods in Cell Biology*, 2017, Vol. 140, pp. 165 – 185.
44. Ефимов, А. Е. Трёхмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов, клеток и тканей методом сканирующей зондовой нанотомографии [Текст]: автореф. дис... доктор биол. Наук / А. Е. Ефимов // Москва, ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова", 2018.- 47 с.
45. Мочалов, К. Инструментальное объединение конфокальной микроспектроскопии и 3D сканирующей зондовой нанотомографии / К.Мочалов, А.Чистяков, Д.Соловьева, А.Мезин, В.Олейников, И.Набиев, И. Агапов, А.Ефимов // *НаноИндустрия*, 2016, #7, сс. 60 – 71.
46. Lehmann, O. // *Ztschr. Krist.*, 1890, 18. S. 457.
47. Рейнитцер, Ф. Письмо Рейнитцера Леману от 14 марта 1888 г. // Архив Высшей Немецкой технической школы в Граце
48. Коншина, Е.А. Основы физики жидкокристаллических систем // Санкт Петербург, 2013.

49. Каманина, Н. В. Электрооптические системы на основе жидких кристаллов и фуллеренов – перспективные материалы нанoeлектроники, свойства и области применения // Санкт Петербург, 2008.
50. Беляков, В.А. Жидкие кристаллы // Знание, 1986, 160 с.
51. Блинов, Л.М. Электро- и магнитооптика жидких кристаллов // Наука, 1978, 384 с.
52. Сонин, А.С. Введение в физику жидких кристаллов // Наука, 1983, 271 с.
53. Blinov, L. M. Electro - Optic Effects in Liquid Crystals Materials / L. M. Blinov, V.G. Chigrinov // Springer - Verlag., N.-Y., 1994.
54. Гольдт, И. В. Жидкие кристаллы прекрасны и загадочны, и поэтому я их люблю // Нанометр, 2007.
55. Померанцева, Е. А. Наноазбука: кристаллы, которые можно налить // Нанометр, 2007.
56. Гусев, А.И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии // Физматлит, 2007, 416 с.
57. Олейников, В. А. Квантовые точки в биологии и медицине // Природа, 2010, №3, с.22-28.
58. Васильев, Р. Б. Квантовые точки: синтез, свойства, применение / Р. Б. Васильев, Д. Н. Дирин // Москва, 2007.
59. Воробьёв, И. А. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в микроскопии и цитометрии / И. А. Воробьёв, Е. П. Рафаловская – Орловская, А. А. Гладких, Д. М. Поташникова, Н. С. Бартенева // Цитология, 2011, Том 53, №5, сс. 392 – 403.
60. Murray, C. B. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E-sulphur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites / C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi // J. Amer. Chem. Soc. 115, 1993, pp. 8706—8715.
61. Hines, M. A. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals / M. A. Hines, P. Guyot - Sionnest // J. Phys. Chem., 1996, pp. 468—471.
62. Dabbousi, B. O. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and optical and structural characterization of a size series of highly luminescent materials / B. O. Dabbousi, V. J. Rodriguez, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi // J. Phys. Chem. B., 1997, pp. 9463—9475.



63. Danek, M. Synthesis of luminescent thin-film CdSe/ZnSe quantum dot composites using CdSe quantum dots passivated with an overlayer of ZnSe / M. Danek, K. Jensen, C. Murray, M. Bawendi // *Chem. Matter.*, 1996, pp. 173—180.
64. Грибачёв, В. Методы получения и применения квантовых точек // *Компоненты и технологии*, 2009, № 9.
65. Lee, J. Full color emission from II-VI semiconductor quantum dot-polymer composites / J. Lee, V. C. Sundar, J. R. Heine // *Adv. Mater.*, 2010, 12, pp. 1102-1105.
66. Tan, L. Assembly of quantum dots in polymer solar cells driven by orientational switching of mesogens under electric field / L. Tan, Y. Shi, Y. Chen // *Solar Energy*, 2016, Volume 129, pp. 184–191
67. Nabiev, I. Fluorescent colloidal particles as detection tools in biotechnology systems / I. Nabiev, A. Sukhanova, M. Artemyev, V. Oleinikov // In the book: *Colloidal nanoparticles in biotechnology*. Ed. A. Elaissari, WILEY-VCH, London-Singapore-NY, 2008, pp. 133-168.
68. Олейников, В. А. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине / В. А. Олейников, А. В. Суханова, И. Р. Набиев // *НАНО*, 2007, Том 2, сс. 160 – 173.
69. Pedersen, Ch. The Discovery of crown ethers // *Angewandte Chemie International edition in English*, Vol. 27, Issue 8, 1988, pp. 1021 – 1027.
70. Гильманшина, С. И. Основы аналитической химии. Курс лекций // 2-е издание, Санкт – Петербург, 2006, 224 с.
71. Курочкин, И. Н. Нанобиоаналитические системы: от молекулярного узнавания до биодетекции // Химический факультет МГУ, Сборник лекций, 2009.
72. Qlark, L.C. Jr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions // *ASAIO J.* 2, 1956, pp. 41–48;
73. Osipova, T. Biochip-based test-system for cancer diagnostics. Simultaneous quantitation of total and free forms of prostate-specific antigene / T. Osipova, Z. Sokolova, T. Ryabykh, V. Karaseva, M. Modorsky, V. Matveev, A. Baryshnikov // *Nanotechnology*, Vol. 2, 2008, pp. 30–33.
74. Doussineau, T. On the design of fluorescent ratiometric nanosensors / T. Doussineau, A. Schulz, A. Lapresta-Fernandez, A. Moro, S. Körsten, S. Trupp, G. Mohr // *Chemistry*, 16, 2010, pp. 10290–10299.
75. Бражник, К. И. Многопараметрический анализ сывороточных онкомаркеров с помощью суспензионных систем на основе микросфер, кодированных флуоресцентными

нанокристаллами: дис... канд. биол. наук: 14.01.12 / Бражник Кристина Ивановна; [Место защиты: Рос. онкол. науч. центр им. Н.Н. Блохина РАМН] // Москва, 2015.- 160 с.

76. Kellar, K. L. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays / K. L. Kellar, M. A. Iannone // *Exp Hematol.*, Nov., 30(11), 2002, pp. 1227-1237.

77. Sukhanova, A. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases / A. Sukhanova, A. Susa, A. Bek, S. Mayilo, A. Rogach, J. Feldmann, V. Oleinikov, B. Reveil, B. Donvito, J. Cohen J, I. Nabiev // *Nano Lett.*, Aug., 7(8), 2007, pp. 2322-2327.

78. Sizova, S. Submicron QDs-containing particles as nano-thermosensors. *Materials Today: Proceedings* / S. Sizova, A. Generalova, M. Tretyak, K. Mochalov, P. Samokhvalov, I. Nabiev, V. Oleinikov // *Materials Today: Proceedings*, 3, 2016, pp. 617–621.

79. Mokra, D. V. Design of the model of ratiometric polymer nanobiothermometer based on quantum dots / D. V. Mokra, S. V. Sizova, K. E. Mochalov, V. A. Oleinikov // *The 2<sup>nd</sup> international symposium “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine”*, pp. 263 – 271.

80. Kuang, M. Fabrication of multicolor-encoded microspheres by tagging semiconductor nanocrystals to hydrogel spheres / M. Kuang, D. Wang, H. Bao, M. Gao, H. Mohvald, M. Jiang // *Adv. Mater.*, 17, 2005, pp. 267 – 270.

81. Lee, S. Directional Photofluidization Lithography: Micro/Nanostructural Evolution by Photofluidic Motions of Azobenzene Materials / S. Lee, H.S. Kang, J. K. Park // *Advanced Materials*, 2012, 24 pp. 2069–2103.

82. Zhao, Y. *Smart Light-responsive Materials: Azobenzene-contain Polymers and Liquid Crystals* / Y. Zhao, T. Ikeda // Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2009.

83. Lefin, Ph. Anisotropy of the photo-induced translation diffusion of azobenzene dyes in polymer matrices / Ph. Lefin, C. Fiorini, J. M. Nunzi // *Pure Applied Optics*, 1998, 7, pp. 71–82.

84. Nakano, H. Photoinduced mass flow of photochromic molecular materials / H. Nakano, M. Suzuki // *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22, pp. 3702–3704.

85. Shibaev, V. Photoactive liquid crystalline polymer systems with light-controllable structure and optical properties / V. Shibaev, A. Bobrovsky, N. Boiko // *Progress in Polymer Science*, 2003, 28, p. 729.

86. Zhao, Y. New photoactive polymer and liquid-crystal materials // *Pure and Applied Chemistry*, 2004, 76, pp. 1499-1508.

87. Shibaev, V. Liquid-crystalline polymers: Past, present, and future // *Polymer Science*, 2009, Series A, 51, pp. 1131-1193.
88. Goldenberg, L. M. Single Step Optical Fabrication of a DFB Laser Device in Fluorescent Azobenzene Containing Materials / L. M. Goldenberg, V. Lisinetskii, Y. Gritsai, J. Stumpe, S. Schrader // *Advanced Materials*, 2012, 24, pp. 3339–3343.
89. Bian, S. Photoinduced Surface Relief Grating on Amorphous Poly(4-phenylazophenol) Films / S. Bian, W. Liu, J. Williams, L. Samuelson, J. Kumar, S. Tripathy // *Chemistry of Materials*, 2000, 12, pp. 1585-1590.
90. Bian, S. Single laser beam-induced surface deformation on azobenzene polymer films / S. Bian, L. Li, J. Kumar, D. Y. Kim, J. Williams, S. K. Tripathy // *Applied Physics Letters*, 1998, 73, pp. 1817-1819.
91. Goldenberg, L. M. Thin Layers of Low Molecular Azobenzene Materials with Effective Light-Induced Mass Transport / L. M. Goldenberg, L. Kulikovskiy, O. Kulikovskaya, J. Tomczyk, J. Stumpe // *Langmuir*, 2010, 26, pp. 2214–2217.
92. Fabbri, F. Evidence of Two Distinct Mechanisms Driving Photoinduced Matter Motion in Thin Films Containing Azobenzene Derivatives / F. Fabbri, D. Garrot, K. Lahlil, J. P. Boilot, Y. Lassailly, J. Peretti // *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115, pp. 1363–1367.
93. Barrile, R. One step inscription of surface relief microgratings / R. Barille, J. M. Nunzi, S. A. Kandjani, E. Ortyl, S. Kucharski // *Optics Communications*, 2007, 280, pp. 217–220.
94. Bobrovsky, A. New Chiral-Photochromic Dopant with Variable Helical Twisting Power and Its Use in Photosensitive Cholesteric Materials / A. Bobrovsky, N. Boiko, V. Shibaev // *Molecular Crystals Liquid Crystals*, 2001, 363, p. 35.
95. Bobrovsky, A. AFM study of laser-induced crater formation in films of azobenzene-containing photochromic nematic polymer and cholesteric mixture / A. Bobrovsky, K. Mochalov, A. Chistyakov, V. Oleinikov, V. Shibaev, // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, 275, pp. 30-36.
96. Cong, C. Second – Order Overtone and Combination Raman Modes of Graphene Layers in the Range of 1690–2150  $\text{cm}^{-1}$  / C. Cong, T. Yu, R. Saito, G. Dresselhaus, M. Dresselhaus // *ACS Nano*, 2011, 5, pp. 1600-1605.

97. Garreau, A. Color Control in Coaxial Two Luminophore Nanowires / A. Garreau, F. Massuyeau, S. Cordier, Y. Molard, E. Gautron, P. Bertoncini, E. Faulques, J. Wery, B. Humbert, A. Bulou // *ACS Nano*, 2013, 7, pp. 2977-2987.
98. Fan, Z. Ray Multifunctional Plasmonic Shell – Magnetic Core Nanoparticles for Targeted Diagnostics, Isolation and Photothermal Destruction of Tumor Cells / Z. Fan, M. Shelton, A. Singh, D. Senapati, S. Khan // *ACS Nano*, 2012, 6, pp. 1065-1073.
99. Farokhzad, O. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery / O. Farokhzad, R. Langer // *ACS Nano*, 2009, 3, pp. 16-20.
100. Lukishova, S. Room – Temperature Single Photon Sources With Definite Circular and Linear Polarizations / S. Lukishova, L. Bissell, C. Stroud, R. Boyd // *Opt. Spectrosc.*, 2010, 108, pp. 417-424.
101. Philippe, G. Jelena Focus on Single Photons on Demand / G. Philippe, S. Barry // *New J. Phys.*, 2004, 6.
102. Kopp, V. Low – Threshold Lasing at the Edge of a Photonic Stop Band in Cholesteric Liquid Crystals / V. Kopp, B. Fan, H. Vithana, A. Genack // *Opt. Lett.*, 1998, 23, pp. 1707-1709.
103. Bobrovsky, A. Glass – Forming Photoactive Cholesteric Oligomers Doped with Quantum Dots: Novel Materials with Phototunable Circularly Polarised Emission / A. Bobrovsky, K. Mochalov, V. Oleinikov, V. Shibaev // *Liq. Cryst.*, 2011, 38, pp. 737-742.
104. Bobrovsky, A. Optically and Electrically Controlled Circularly Polarized Emission from Cholesteric Liquid Crystal Materials Doped with Semiconductor Quantum Dots / A. Bobrovsky, K. Mochalov, V. Oleinikov, A. Sukhanova, A. Prudnikau, M. Artemyev, V. Shibaev, I. Nabiev // *Adv. Mater.*, 2012, 24, pp. 6216-6222.
105. Lukishova, S. Resonance in Quantum Dot Fluorescence in a Photonic Bandgap Liquid Crystal Host / S. Lukishova, L. Bissell, J. Winkler, C. Stroud // *Opt. Lett.*, 2012, 37, pp. 1259-1261.
106. Tong, X. Liquid – Crystal Gel – Dispersed Quantum Dots: Reversible Modulation of Photoluminescence Intensity Using an Electric Field / X. Tong, Y. Zhao // *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, pp. 6372-6373.
107. Caplan, J. The Power of Correlative Microscopy: Multi – Modal, Multi – Scale, Multi – Dimensional / J. Caplan, M. Niethammer, Ii. Taylor, K. Czymmek // *Cur. Opin. Struct. Biol.*, 2011, 21, pp. 686-693.

108. Sukhanova, A. Biocompatible Fluorescent Nanocrystals for Immunolabeling of Membrane Proteins and Cells / A. Sukhanova, J. Devy, L. Venteo, H. Kaplan, M. Artemyev, V. Oleinikov, D. Klinov, M. Pluot, J. Cohen, I. Nabiev // *Anal. Biochem.*, 2004, 324, pp. 60-67.
109. Sukhanova, A. Highly Stable Fluorescent Nanocrystals as a Novel Class of Labels for Immunohistochemical Analysis of Paraffin – Embedded Tissue Sections / A. Sukhanova, L. Venteo, J. Devy, M. Artemyev, V. Oleinikov, M. Pluot, I. Nabiev // *Lab. Invest.*, 2002, 82, pp. 1259-1261.
110. Baranov, A. Effect of ZnS Shell Thickness on the Phonon Spectra in CdSe Quantum Dots / A. Baranov, Y. Rakovich, J. Donegan, T. Perova, R. Moore, D. Talapin, A. Rogach, Y. Masumoto, I. Nabiev // *Phys. Rev. B*, 2003, 68, p. 165306.
111. Wargnier, R. Energy Transfer in Aqueous Solutions of Oppositely Charged CdSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots and in Quantum Dot – Nanogold Assemblies / R. Wargnier, A. Baranov, V. Maslov, V. Stsiapura, M. Artemyev, M. Pluot, A. Sukhanova, I. Nabiev // *Nano Letter*, 2004, 4, pp. 451-457.
112. Mochalov, K.E. High-resolution 3D structural and optical analyses of hybrid or composite materials by means of scanning probe microscopy combined with the ultramicrotome technique: An example of application to engineering of liquid crystals doped with fluorescent quantum dots / K.E. Mochalov, A.E. Efimov, A.Yu. Bobrovsky, I.I. Agapov, A.A. Chistyakov, V.A. Oleinikov, I. Nabiev // In: J.-M. Fedeli, L. Vivien, and M. K. Smit, eds. *Integrated Photonics: Materials, Devices, and Applications II*. Proceedings of SPIE, 2013, 8767, 876708.
113. Milette, J. Reversible Long Range Network Formation in Gold Nanoparticle – Nematic Liquid Crystal Composites / J. Millette, S. Cowling, V. Toader, C. Lavigne, I. Saez, R. Bruce Lennox, J. Goodby, L. Reven // *Soft Matter*, 2012, 8, pp. 173-179.
114. Mochalov, K., Combined scanning probe nanotomography and optical microspectroscopy: a correlative technique for 3D characterization of nanomaterials / K. Mochalov, A. Efimov, A. Bobrovsky, I. Agapov, A. Chistyakov, V. Oleinikov, A. Sukhanova, I. Nabiev // *ACS NANO*, 2013, 7(10), 8953-8962.
115. Blinov, L. *Electrooptic Effects in Liquid Crystal Materials* / L. Blinov, V. Chigrinov // Springer Verlag: New York, 1993.
116. Mochalov, K.E. An instrumental approach to combining confocal microspectroscopy and 3D scanning probe nanotomography / K.E. Mochalov, A.A. Chistyakov, D.O. Solvyeva, A.V. Mezin, V.A. Oleinikov, M. Molinari, I.I. Agapov, I. Nabiev, A.E. Efimov // *Ultramicroscopy*, 2017, 182, 118-123.