

**Ультрчувствительная микроспектроскопия SECARS и
люминесцентные наноструктуры «ядро-оболочка».**

Условное обозначение проекта: **Нанобиофотоника**

**СПИСОК АВТОРОВ В АЛФАВИТНОМ ПОРЯДКЕ ПО ИНСТИТУТАМ,
РАСПОЛОЖЕННЫМ В АЛФАВИТНОМ ПОРЯДКЕ ПО ГОРОДАМ**

Дубна, ОИЯИ, ЛНФ:

Арзуманян Г.М., Дорошкевич Н.В., Кучерка Н., Маматкулов К.З.

Армения, Ереван, Институт биохимии НАН РА

Гюльханданян Г.В.

Беларусь, Минск, БГУИР

Бондаренко А.В.

Минск, Институт физиологии НАН РБ

Кульчицкий В.А.

Минск, СОЛ инструментс

Копачевский В.Дж.

Латвия, Рига, ИФТТ Латвийского университета

Шараковский А.

Россия, Москва, ИОФ РАН

Верещагин К.А., Фабелинский В.И.

Москва, МГУ

Курочкин И.Н.

Словакия, Братислава, Университет Коменского

Балгавы П.

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

Зам. руководителя проекта: Маматкулов К.З.

ДАТА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПРОЕКТА В НОО _____

ДАТА НТС ЛАБОРАТОРИИ 20.04.2017 НОМЕР ДОКУМЕНТА 37

ДАТА НАЧАЛА ПРОЕКТА: 01.01.2018

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА

**Ультрочувствительная микроспектроскопия SECARS и
люминесцентные наноструктуры ядро-оболочка.****Нанобиофотоника**

ШИФР ТЕМЫ

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

УТВЕРЖДЕН ДИРЕКТОРОМ ОИЯИ	ПОДПИСЬ	ДАТА
СОГЛАСОВАНО		
ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ОИЯИ	ПОДПИСЬ	ДАТА
ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ	ПОДПИСЬ	ДАТА
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР	ПОДПИСЬ	ДАТА
НАЧАЛЬНИК НОО	ПОДПИСЬ	ДАТА
ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ	ПОДПИСЬ	ДАТА
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛАБОРАТОРИИ	ПОДПИСЬ	ДАТА
РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА	ПОДПИСЬ	ДАТА
ЗАМ. РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА	ПОДПИСЬ	ДАТА
ОДОБРЕН		
ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ	ПОДПИСЬ	ДАТА

Ультрочувствительная микроспектроскопия SECARS и люминесцентные наноструктуры ядро-оболочка.

Оглавление

- Аннотация проекта..... 4
- Введение..... 5
- Современное состояние исследований.....6-11
- Описание предлагаемого исследования.....12-17
- Оценка кадровых ресурсов и бюджета.....18-21
- Приложения: список публикаций и конференций,
рекомендации НТС и рецензентов.....22-29

Аннотация проекта

Проект направлен на развитие современных способов ультрочувствительной (одиночных/единиц молекул), селективной регистрации методами нелинейной лазерной микро-спектроскопии комбинационного (рамановского) рассеяния (КР) света, и, в первую очередь, спектроскопии когерентного антистоксова рассеяния света (КАРС), органических молекул-аналитов локализованных на наноструктурированных поверхностях, обеспечивающих гигантское комбинационное рассеяние (ГКР) этими молекулами, с применением ультракоротких (пикосекундных) импульсов лазерного излучения. Когда молекула находится в непосредственной близости (в наномасштабе) от наноструктуры металла и облучается двумя частотами накачки, то на этой молекуле посредством локально усиленных полей может индуцироваться поляризация КАРС. Это явление называется **гигантское когерентное антистоксово рассеяния света – ГКАРС (SECARS – Surface Enhanced CARS в англоязычной терминологии)**.

Другой важной составляющей проекта является высококонтрастная и спектрально-селективная визуализация образцов (в основном биологической природы) как методами нелинейной рамановской микроскопии, так и апконверсионной люминесценции с использованием перспективных наноструктур типа «ядро-оболочка». Эти структуры известны своей многофункциональностью и разнообразностью своего химического состава, что, с недавнего времени, обусловило их успешное применение в различных прикладных задачах, в том числе и биомедицинского характера.

Для реализации предлагаемого проекта будет использована мультимодальная оптическая платформа на базе микроспектрометра «КАРС», которая после относительно недавней модернизации (2015 год) по праву претендует на роль уникальной и единственной по своим функциональным характеристикам установки такого типа в России, и вполне конкурентоспособной на мировом уровне.

В проекте будет задействован квалифицированный и опытный в данном направлении коллектив Сектора Рамановской спектроскопии ЛНФ ОИЯИ в тесном сотрудничестве с заинтересованными партнерами из различных стран и организаций. Финансирование проекта запрашивается на уровне 150k\$ ежегодно.

Введение

Проект нацелен на следующее:

- разработку и применение ультрачувствительной и селективной модификации комбинационного рассеяния, известного как ГКАРС (SECARS), с целью стабильной и воспроизводимой регистрации спектров КР одиночных (единиц) молекул аналита;
- создание единой оптической платформы для комплементарной микроскопии (имиджинга) методами ГКР, КАРС, ГКАРС и апконверсионной люминесценции (АКЛ) с использованием перспективных наноструктур типа «ядро-оболочка» (core-shell). С конца второго года выполнения данного проекта намечено использование таких люминесцентных биомаркеров в тестовых экспериментах по фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

Спектроскопия комбинационного рассеяния хорошо известна в мире как один из наиболее информативных методов светового анализа молекулярных структур конденсированных сред. Она применяется в широком ряде приложений: в физике, химии, материаловедении, фармацевтике, криминалистике, при изучении полимеров, тонких пленок, полупроводников, при анализе структур фуллеренов и углеродных нанотрубок, и т.д. А роль КР в биомедицинских исследованиях (Наука о жизни) трудно переоценить, поскольку прогресс клеточной биологии и медицины связан с методами и оборудованием, позволяющими проводить бесконтактный и неинвазивный структурный анализ биологических образцов и процессов в них с высоким разрешением и в реальном времени.

Однако, при всех своих преимуществах, спонтанный Рамановский сигнал достаточно слабый и в «сопровождении» интенсивного автофлуоресцентного фона его порой достаточно трудно детектировать. Именно поэтому современные методы развития рамановской спектроскопии и микроскопии нацелены не только на разработку, но и постоянное совершенствование усиленных модификаций этой высокоинформативной спектроскопии. Приоритетными методами усиления сигнала КР являются КАРС и ГКР, а наиболее перспективным – ГКАРС, хотя и достаточно сложным для реализации.

Актуальность сформулированной проблемы с точки зрения физики обусловлена следующим: возможность высокочувствительного, селективного и воспроизводимого обнаружения и идентификации сверхмалых количеств органических молекул и соединений необходима для решения как фундаментальных биохимических и медико-биологических проблем, так и современных практических задач экспресс-диагностики в медицине, биологии и фармакологии, обеспечения безопасности, охраны окружающей среды, контроля продуктов питания и т.п. При этом намечается, что образцами для исследований будут как модельные, так и основные биологически-значимые молекулы, в т.ч. пептиды и белки, липиды и жирные кислоты, азотистые основания, ДНК и РНК, и т.д.

Что касается люминесцентных биомаркеров на основе наноструктур «ядро-оболочка», то их главным достоинством является полифункциональность, реализуемая за счет разделения функций ядра и оболочки, а также возможность оптимизации целевых физико-химических свойств материала ядра. Создание частиц «ядро-оболочка» обусловлено, в том числе, необходимостью изоляции ядра от воздействий окружающей среды, закрепления на внешнем слое специфических групп и реагентов для конкретных биомедицинских задач (целевая доставка лекарств, ФДТ, и др.), и др.

Все вышеперечисленное находится в русле мировых тенденций развития рамановской спектроскопии, а также апконверсионной люминесценции, и, тем самым, обуславливает современный инновационный характер предлагаемого к рассмотрению проекта.

Современное состояние исследований по проекту

Задачей предлагаемого проекта является развитие современных способов высокочувствительной, селективной и воспроизводимой лазерной регистрации одиночных (единиц) молекул-аналитов методами нелинейной микро-спектроскопии комбинационного рассеяния света. При этом молекулы-аналиты будут адсорбированы и локализованы на наноструктурированных поверхностях, обеспечивающих гигантское комбинационное рассеяние с применением ультракоротких (пикосекундных) импульсов лазерного излучения. В первую очередь, речь идет о КАРС микро-спектроскопии усиленной поверхностью, или гигантского когерентного антистоксова рассеяния света ГКАРС (SECARS).

Пионерские работы, в которых было впервые продемонстрировано усиление серебряной металлической поверхностью интенсивности КАРС с использованием лазерных импульсов наносекундной длительности, были выполнены в 1979 и 1994 годах [1,2]. И лишь спустя много лет стали появляться работы, в которых были продемонстрированы возможности ГКАРС-спектроскопии с ультракороткими импульсами. Так, например, в работах [3,4] была достигнута чувствительность в одну молекулу, а в работе [5] продемонстрирована возможность увидеть в КАРС-изображении в оптическом микроскопе отдельные усиливающие золотые наночастицы, размер которых был существенно меньше длины волны. В работе [6] приводится первый (и, насколько нам известно, пока единственный) пример реального применения усиленного поверхностью КАРС к визуализации биологических объектов. Недавно, в 2014-2016 гг. авторам [7,8] с помощью ГКАРС-спектроскопии с ультракороткими импульсами, удалось увидеть колебания одной молекулы. Экспериментальные исследования сопровождались теоретическими работами [9-11]. Однако в целом, эти работы имели, скорее всего, демонстрационный характер.

В последние годы появились новые источники лазерного излучения и высокочувствительные фотоприемники, а также наноструктурированные материалы, обеспечивающие гигантское усиление электромагнитного поля вблизи своей поверхности и эффектов взаимодействия излучения с локализованными на ней молекулами, в частности – слабого при обычных условиях комбинационного рассеяния света. В результате открылись новые возможности не только линейно-оптической, но и нелинейно-оптической регистрации и идентификации сверхмалых количеств молекулярных соединений, которая обещает стать универсальной и более чувствительной по сравнению с уже широко распространенной ГКР-методикой.

- **Важно отметить, что, несмотря на открывающиеся перспективы, во всем мире в этой области опубликовано всего около 20 оригинальных работ, и это направление исследований по-прежнему актуально.**
- **Насколько известно авторам предлагаемого проекта по публикациям, в России работы в этом направлении не ведутся.**

Научная новизна проекта в части ГКАРС.

С точки зрения фундаментальной науки нет полной ясности в характере и деталях многофотонного нелинейно-оптического взаимодействия лазерных полей с одиночными молекулами (1-100 шт.) на наноструктурированных ГКР-активных поверхностях. Отсутствует также подробное теоретическое описание такого взаимодействия. Кроме того, несмотря на значительный прогресс в использовании ГКР света, позволяющий в отдельных случаях достигать чувствительности детектирования одиночных молекул, **вопрос воспроизводимого и надежного зондирования широкого класса биологически-значимых молекулярных соединений до сих пор остается открытым.**

С точки зрения практического применения реализация сочетания методов нелинейной лазерной микро-спектроскопии с ГКР-активных поверхностей позволит значительно расширить круг органических соединений, сверхмалые количества которых можно будет воспроизводимо и оперативно обнаруживать и идентифицировать оптическими методами, не требующими ни высоковакуумной техники, ни специальной подготовки проб, ни дорогостоящих реагентов.

Реализация проекта предполагает комплексный подход и заключается в:

- модификации и апробации, с использованием модельных ГКР-активных поверхностей и молекул-аналитов, пикосекундного лазерного КАРС/КР-микроспектрометра с возможностью локального нелинейно-оптического воздействия на поверхность образцов излучением в широком диапазоне длин волн с субмикронным разрешением;
- сравнительном экспериментальном изучении особенностей нелинейного взаимодействия лазерного излучения (в частности, КАРС) с несколькими выбранными наноструктурированными ГКР-активными золото- или серебросодержащими поверхностями и расположенными на них органическими молекулами-аналитами;
- выявление возможности КАРС/ГКАРС-спектроскопии воспроизводимо обеспечивать предельную чувствительность на уровне единичных молекул;
- построение теоретических моделей ГКАРС-процесса.

Основные мировые научные конкуренты

1. Professor Richard P. Van Duyne Research group, Northwestern University, Department of Chemistry, Evanston, Illinois 60208, USA.
2. Professor Eric Olaf Potma, Potma Labs, Department of Chemistry, Natural Sciences II, University of California, Irvine, CA 92697, USA.
3. Professor Marlan O. Scully Research Group, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA.

Люминесцентные наноструктуры «ядро-оболочка».

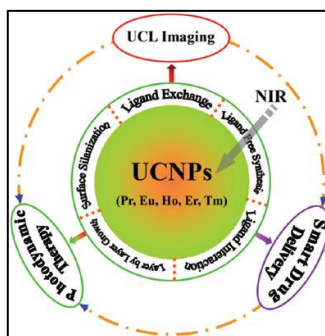
Известно, что наночастицы имеют ряд привлекательных приложений в разных областях, включая биомедицинские работы, в частности, по биовизуализации, целевой доставки лекарств, биосенсоров и т.д. Известно, что ранняя диагностика различных заболеваний, таких как рак, диабет, инсульт, болезнь Альцгеймера и т.д. – сегодня это основные фокусы биомедицинских исследований.

В последние годы было обнаружено, что среди различных классов наночастиц наиболее перспективны структуры типа ядро/оболочка для различных биомедицинских применений из-за ряда преимуществ по сравнению с простыми наночастицами: менее токсичны, био- и цитосовместимы, лучшее сопряжение с другими биоактивными молекулами, термо и химическая стабильность, и др. [12,13].

В привязке к предлагаемому нами проекту отметим, что недавние исследования показали, что наноструктуры ядро/оболочка успешно применяются в апконверсионной люминесценции для визуализации, а также и в биомедицинских целях [14-20]. В этой связи, а также с учетом накопленного авторами проекта в прошлые годы опыта в области апконверсионной люминесценции (АКЛ), в новом проекте предлагается перейти от работ с апконверсионными люминофорами на базе стеклокерамических матриц, активированных редкоземельными элементами (РЗЭ), к работам по АКЛ на основе более перспективных и современных наноструктур ядро/оболочка.

В проекте предусмотрено решение следующих задач в этой области:

- Реализовать усиленную модификацию АКЛ на основе наноструктур ядро/оболочка с использованием РЗЭ в качестве ядра и Ag@SiO_2 в качестве оболочки (аналог с ГКР-активными структурами).
- Создать единую оптическую платформу для контрастной и селективной биовизуализации на основе двух методик – нелинейной рамановской микроскопии КАРС и ГКАРС и апконверсионной люминесценции.
- На завершающей стадии проекта намечено, в тесном сотрудничестве с партнерами в области биомедицины, протестировать люминесцирующую наноструктуру «ядро-оболочка» со специальной модификацией порфирина в качестве оболочки (биомаркер), в фотодинамической терапии рака.



Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это один из нехирургических способов лечения онкозаболеваний в основе которого лежит использование специальных маркеров-фотосенсибилизаторов, избирательно накапливающихся в клетках опухоли и заметно повышающих ее чувствительность к свету. Под действием световых волн определенной длины эти вещества вызывают химическую реакцию и в результате приводят к образованию активных форм кислорода (в т.ч. синглетного кислорода),

который окисляет белки и другие биомолекулы и, тем самым, уничтожает (некроз и/или апоптоз) внутренние структуры опухолевой клетки. Затем погибшие клетки поглощаются «санитарами» организма – фагоцитами. Кроме того, в процессе ФДТ повреждаются кровеносные сосуды, идущие к опухоли, что нарушает доставку питательных веществ и кислорода, и также способствует ее гибели.

Чаще всего ФДТ применяется для лечения рака кожи и слизистых оболочек. Метод просто незаменим в тех случаях, когда опухоль расположена в "неудобных" местах: на губе, в полости рта, на веке, на ушных раковинах. Хирургическая операция в таких случаях ведет к серьезным косметическим дефектам и функциональным ограничениям.

В фотодинамической терапии применяют в основном фотосенсибилизаторы из группы порфиринов. Есть данные, что порфирины связываются с сывороточными белками, в том числе с липопротеинами низкой плотности. А опухолевые клетки содержат большое количество особых рецепторов, к которым прикрепляются липопротеины. Поэтому фотосенсибилизаторы в комплексе с липопротеинами скапливаются на цитоплазматических мембранах клетки и мембранах внутриклеточных органелл: митохондрий, лизосом, ядра.

Среди порфиринов, используемых в ФДТ, особое место занимают катионные порфирины (рис.1), благодаря своей высокой селективности накопления в малигнизированных клетках [21]. У наших партнеров из Института биохимии НАН Армении накоплен богатый опыт по синтезированию большого класса новых катионных водорастворимых порфиринов и металлопорфиринов с различными центральными атомами металла (Zn, Ag, Co, Fe, Mn, Cu, и др.) и различными периферическими функциональными группами – всего более 100 соединений [22,23].

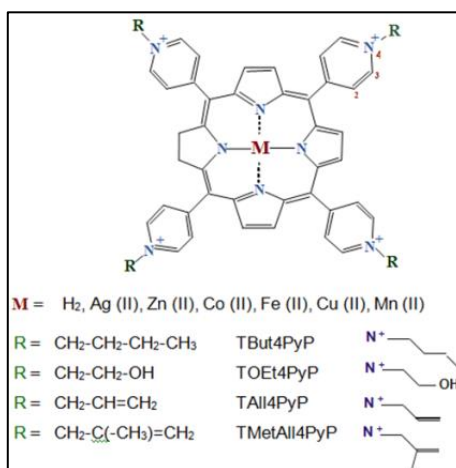


Рис.1 Структура катионных порфиринов: M - центральные атомы металлов (Zn, Ag, Co, Fe, Mn, Cu, и др.), R – периферические группы

Одним из наиболее важных критериев эффективности фотосенсибилизаторов является квантовый выход генерации синглетного кислорода (γ_{Δ}) [24]. Совместные исследования ученых Армении и Института физики НАН Беларуси показали, что γ_{Δ} новых катионных порфиринов достигают очень высокого уровня (0.77-0.79 и 0.85-0.97, у порфиринов и Zn-металлопорфиринов, соответственно) [13]. Именно с учетом этого фактора и предполагается синтез АКЛ наноструктуры «ядро-оболочка», где роль оболочки будет играть новый класс катионных/металло- порфиринов, а роль «ядра» нанокристаллы NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺, которые имеют две интенсивные полосы АКЛ (рис.2) в синей области спектра (450нм и 478нм), первая из которых практически совпадает с полосой поглощения рассматриваемом нами классом порфиринов.

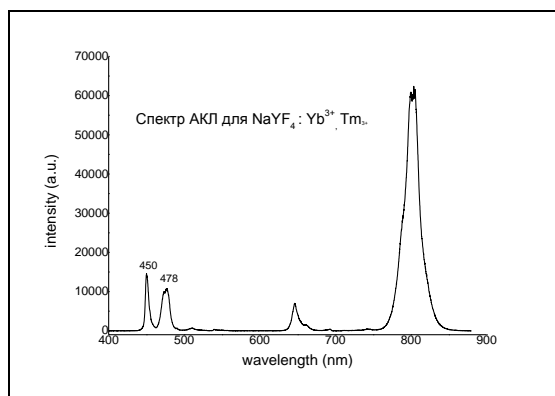


Рис.2 Спектр АКЛ нанокристаллов $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$, возбуждение на 976нм

Ожидается, что предлагаемая нами конкретная структура «ядро-оболочка», по нашим сведениям ранее никем не изученная (новизна проекта!), может эффективно быть использована в ФДТ для уничтожения опухолевых клетках.

References

1. E.C. L. Ru and P.G. Etchegoin. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, v. 63, pp. 65-87 (2012).
2. Y. Fang, N.-H. Seong and D.D. Klott. Measurement of the distribution of site enhancements in surface-enhanced Raman scattering. *Science*. 321, pp. 388-392 (2008).
3. E. Le Ru, M. Meyer and P. Etchegoin. Proof of Single-Molecule Sensitivity in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) by Means of a Two-Analyte Technique. *J. Phys. Chem. B*, v. 110, pp. 1944-1948 (2006).
4. J. A. Dieringer, R. B. Lettan, K. A. Scheidt and R. P. Van Duyne. A Frequency Domain Existence Proof of Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 129, pp. 16249-16256 (2007).
5. J. Steidtner and B. Pettinger. Tip-enhanced Raman spectroscopy and microscopy on single dye molecules with 15 nm resolution. *Phys. Rev. Lett.*, v. 100, p. 236101 (2008).
6. C.J. Addison, S.O. Konorov, A.G. Brolo, M.W. Blades and R.F. Turner. Tuning Gold Nanoparticle Self-Assembly for Optimum Coherent Anti-Stokes Raman Scattering and Second Harmonic Generation Response. *J. Phys. Chem. C*. 113, pp. 3586-3592 (2009).
7. C. Steuwe, C. F. Kaminski, J. J. Baumberg and S. Mahajan. Surface enhanced coherent anti-stokes Raman scattering on nanostructured gold surfaces. *Nano Lett.*, v. 11, pp. 5339-5343 (2011).
8. Tae-Woong Koo, Selena Chan, and Andrew A. Berlin. Single-molecule detection of iomolecules by surface-enhanced coherent anti-Stokes Raman scattering. *Optics Letters*, v. 30, No. 9, pp. 1024-1026 (2005).
9. Matthias Danckwerts and Lukas Novotny. Optical Frequency Mixing at Coupled Gold Nanoparticles. *Physical Review Letters*, v. 98, p. 026104 (2007).
10. Salem Marhaba, Guillaume Bachelier, Christophe Bonnet, Michel Broyer, Emmanuel Cottancin, Nadia Grillet, Jean Lermé, Jean-Louis Vialle, and Michel Pellarin. Surface Plasmon Resonance of Single Gold Nanodimers near the Conductive Contact Limit. *J. Phys. Chem. C*, v. 113, pp. 4349-4356 (2009).

11. Yu Zhang, Yu-Rong Zhen, Oara Neumann, Jared K. Day, Peter Nordlander, & Naomi J. Halas. Coherent anti-Stokes Raman scattering with single-molecule sensitivity using a plasmonic Fano resonance. *Nature Communications*, v. 5:4424, pp. 1-7 (2014).
12. Krishnendu Chatterjee, Sreerupa Sarkar, K. Jagajjanani Rao, Santanu Paria. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Advances in colloidal and Interface science* 209 (2014), 8-39
13. Liu, W. et al. Gold Nanorod@Chiral Mesoporous Silica Core-shell Nanoparticles with Unique Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 9659–9664 (2013).
14. Tian, Q. et al. Sub-10 nm Fe₃O₄@Cu₂-xS Core-Shell Nanoparticles for Dual-Modal Imaging and Photothermal Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 8571–8577, (2013).
15. Zhang, J., Tang, Y., Lee, K. & Ouyang, M. Nonepitaxial Growth of Hybrid Core-Shell Nanostructures with Large Lattice Mismatches. *Science* 327, 1634–1638, (2010).
16. Sounderya N., Zhang Y. Use of core/shell structured nanoparticles for biomedical applications. *Recent Pat Biomed Eng* 2008, 1, 34-42
17. Idris, N. M. et al. In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. *Nat. Med* 18, 1580–1585 (2012).
18. Qian, H. S., Guo, H. C., Ho, P. C. L., Mahendran, R. & Zhang, Y. Mesoporous-Silica-Coated Up-Conversion Fluorescent Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Small* 5, 2285–2290 (2009).
19. Cui, S. et al. In Vivo Targeted Deep-Tissue Photodynamic Therapy Based on Near-Infrared Light Triggered Upconversion Nanoconstruct. *ACS Nano* 7, 676–688 (2012).
20. Wang, C. et al. Imaging-Guided pH-Sensitive Photodynamic Therapy Using Charge Reversible Upconversion Nanoparticles under Near-Infrared Light. *Adv. Func. Mater.* 23, 3077–3086 (2013).
21. Hudson, R. and Boyle, R.W. (2004) Strategies for selective delivery of photodynamic sensitizers to biological targets. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 8, 954-975
22. Madakyan, V.N., Kazaryan, R.K., Khachatryan, M.A., Stepanyan, A.S., Kurtikyan, T.S., Ordyan, M.B. (1986) Synthesis of new water-soluble cationic porphyrins. *Khimiya heterociklicheskih soedinenii (Russia)* 2, 212-216
23. Tovmasyan, A.G., Ghazaryan, R.K., Sahakyan, L., Gasparyan, G., Babayan, N., Gyulkhandanyan, G. (2007) Synthesis and anticancer activity of new water-soluble cationic metalloporphyrins. *European Conferences on Biomedical Optics 2007*, 17-21 June, 2007, Munich, Germany, Technical Abstract Summaries, pp.71-72
24. Bonnett, R. (1995) Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* 24(1), 19-33
25. Stasheuski, A.S., Galievsky, V.A., Knyukshto, V.N., Ghazaryan, R.K., Gyulkhandanyan, A.G., Gyulkhandanyan, G.V., Dzhagarov, B.M. (2013) Water-soluble pyridyl cationic porphyrins: fluorescent characteristics and photosensitized formation of singlet oxygen. *J. Applied Spectroscopy* 80(6), 823-833

Описание предлагаемого исследования

Предмет исследования:

Разработка новых, современных высокочувствительных и селективных способов оптической регистрации и идентификации сверхмалых количеств органических соединений адсорбированных на наноструктурированных подложках, и создание единой оптической платформы биовизализации методами нелинейной рамановской спектроскопии и апконверсионной люминесценции.

Допущения и гипотезы:

Привлекательность SECARS-спектроскопии органических молекул на ГКР-активных поверхностях состоит в том, что, если коэффициент усиления поверхностью локального поля равен g , то интенсивность ГКР возрастает как g^4 , а интенсивность ГКАРС – как g^8 (рис.1), и теоретически достижимый коэффициент усиления поверхностью интенсивности рассеянного света составляет для КР порядка 10^{10} - 10^{11} [1], а для КАРС – порядка 10^{20} - 10^{22} [2]. Кроме того, сдвиг частоты антистоксова рассеянного излучения в синюю область по отношению к частотам излучений накачки позволяет, в отличие от ситуации с обычным ГКР, радикально отстроиться от паразитной люминесценции поверхности образцов, которая является важным ограничивающим фактором ГКР-спектроскопии в стоксовой области.

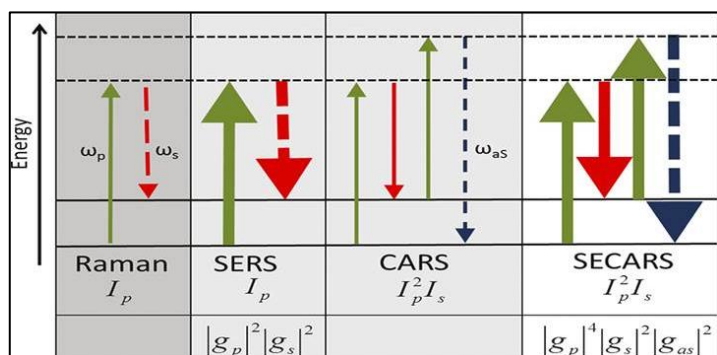


Рис.1 Энергетические схемы и коэффициенты усиления для КР, ГКР, КАРС и ГКАРС

Столь высокие коэффициенты усиления и возможность регистрации сигнала в свободном от фоновой люминесценции спектральном диапазоне при ГКАРС позволяют, казалось бы, достичь чувствительности в оптической спектроскопии в единицы-десятки молекул для гораздо более широкого круга веществ, чем тот, который объединяет молекулы, зарегистрированные в "классических" ГКР-экспериментах [3-5].

Однако, первые эксперименты [6,7] показали, что полученные в реальности коэффициенты усиления КАРС поверхностью заметно меньше расчетных; наиболее пригодные для достижения мономолекулярной чувствительности дипольные и квадрупольные наноструктуры из благородных металлов разрушаются лазерными полями; структура точек поверхности с интенсивным резонансным сигналом рассеяния ("горячих точек") неустойчива в лазерных полях и плохо воспроизводима. Эти эксперименты продемонстрировали, что для реализации возможностей ГКАРС-спектроскопии - как для проведения фундаментальных исследований, так и для высокочувствительной, воспроизводимой диагностики молекул - необходимо продолжать и расширять работу по развитию метода.

- [1]. E.C. L. Ru and P.G. Etchegoin. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, v. 63, pp. 65-87 (2012).
- [2] Y. Fang, N.-H. Seong and D.D. Dlott. Measurement of the distribution of site enhancements in SERS. *Science*. 321, pp. 388-392 (2008).
- [3]. E. Le Ru, M. Meyer and P. Etchegoin. Proof of Single-Molecule Sensitivity in SERS by Means of a Two-Analyte Technique. *J. Phys. Chem. B*, v. 110, pp. 1944-1948 (2006).
- [4]. J. A. Dieringer, R. B. Lettan, K. A. Scheidt and R. P. Van Duyne. A Frequency Domain Existence Proof of Single-Molecule SERS. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 129, pp. 16249-16256 (2007).
- [5]. J. Steidtner and B. Pettinger. Tip-enhanced Raman spectroscopy and microscopy on single dye molecules with 15 nm resolution. *Phys. Rev. Lett.*, v. 100, p. 236101 (2008).
- [6]. C.J. Addison, S.O. Konorov, A.G. Brolo, et al., Tuning Gold Nanoparticle Self-Assembly for Optimum CARS Scattering and SHG Response. *J. Phys. Chem. C*. 113, pp. 3586-3592 (2009).
- [7]. C. Steuwe, C. F. Kaminski, J. J. Baumberg and S. Mahajan. Surface enhanced CARS on nanostructured gold surfaces. *Nano Lett.*, v. 11, pp. 5339-5343 (2011).

Предлагаемые методы и подходы, описание экспериментальной установки.

Для решения предлагаемой задачи развития методов нелинейной лазерной микро-спектроскопии КР с применением пикосекундных импульсов излучения для высокочувствительной, селективной и воспроизводимой регистрации органических молекул-аналитов, локализованных на наноструктурированных ГКР-активных поверхностях, будут использоваться следующие методы и подходы:

1. Для каждой из выбранных систем (образец с ГКР-активной поверхностью + молекула-аналит) предполагается проводить комплекс нелинейно-спектроскопических исследований (в основном методом спектроскопии ГКАРС), направленных, в том числе, на выяснение природы "горячих точек", причин появления нерезонансных вкладов в сигналы ГКАРС и способов их подавления. Эти исследования планируется дополнить, для сравнения уровней фоновых сигналов и контраста, стандартной линейной ГКР-спектроскопией каждого из образцов и получением изображений его поверхности, как оптическими методами, так и с использованием сканирующего электронного микроскопа. В экспериментах планируется использовать КАРС/КР-микроспектрометр с пикосекундными импульсами лазерного излучения (см. далее описание). Для решения запланированных задач предполагается выработать научно-технические требования по модификации КАРС-микроскопа, которая будет производиться совместно с изготовителем системы.
2. Для обработки и анализа спектральной информации будут использоваться как имеющиеся алгоритмы и программы, так и модифицированные и специально разработанные программное обеспечение и алгоритмы (NanoSP, ImageSP и др.).
3. В качестве образцов с ГКР-активной поверхностью будет, прежде всего, использоваться разработка Белорусского государственного университета информатики и электроники (БГУИР). Это подложки с серебряными наночастицами, локализованными на подложке из мезопористого кремния. Кроме того, намечено апробирование наноструктурированных подложек с золотыми наночастицами различной конфигурации, разработанные в Институте физики полупроводников, Новосибирск (Академгородок). Некоторые коммерчески доступные ГКР-подложки (АТО-ID и др.) также будут использованы в экспериментах.
4. В качестве локализованных на поверхности органических молекул-аналитов планируется использовать как модельные образцы типа дитионитробензойная кислота (DTNB), так и ряд биологически-значимых молекул/соединений.

При подготовке образцов и иммобилизации молекул на наночастицах золота и серебра и ГКР-активных поверхностях будут использоваться разработанные нашими партнерами из МГУ и Института биохимической физики РАН методы и технологии.

5. Для обработки и анализа экспериментальных результатов с использованием современных аналитических и численных методов теоретической физики планируется разработать теоретические модели взаимодействия лазерного излучения с исследуемыми поверхностями и иммобилизованными на них молекулами-аналитами.

6. В исследованиях по апконверсионной люминесценции на основе наноструктур «ядро-оболочка» предполагается приобретать относительно недорогие наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ и $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ в качестве «ядра», как наиболее эффективные апконверсионные нанокристаллы. В качестве «оболочек» будут использоваться биосовместимая пленка SiO_2 и серебряные наночастицы для плазмонно-усиленной АКЛ и различные порфирины для ФДТ.

7. Учитывая, что АКЛ – это такой же антистоксовый процесс, как и КАРС, то в экспериментах с люминесцентными биомаркерами будет использована практически вся та же оптика и регистрационная система, которая установлена на оптической платформе для спектроскопии комбинационного рассеяния.

Многомодальная оптическая платформа – «КАРС» микроскоп.

Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп «КАРС» представляет собой лазерно-оптико-механический комплекс (рис.2), выполненный в компактной конфигурации и установленный на виброустойчивой платформе SDANDA (Литва).



Рис.2 Общий вид установки микроскопа «КАРС»

В 2015 году оптическая платформа была модернизирована, в результате чего на платформе были развернуты наряду со спонтанным комбинационным рассеянием и обычным КАРС-ом, также и эксперименты по ГКР, по поляризованной КАРС микроскопии (П-КАРС), нелинейному имиджингу генерацией второй гармоники, КР спектроскопии на длине волны 785 нм со слабым люминесцентным фоном для биологических образцов. На рис.3 представлена модернизированная оптическая схема прибора.

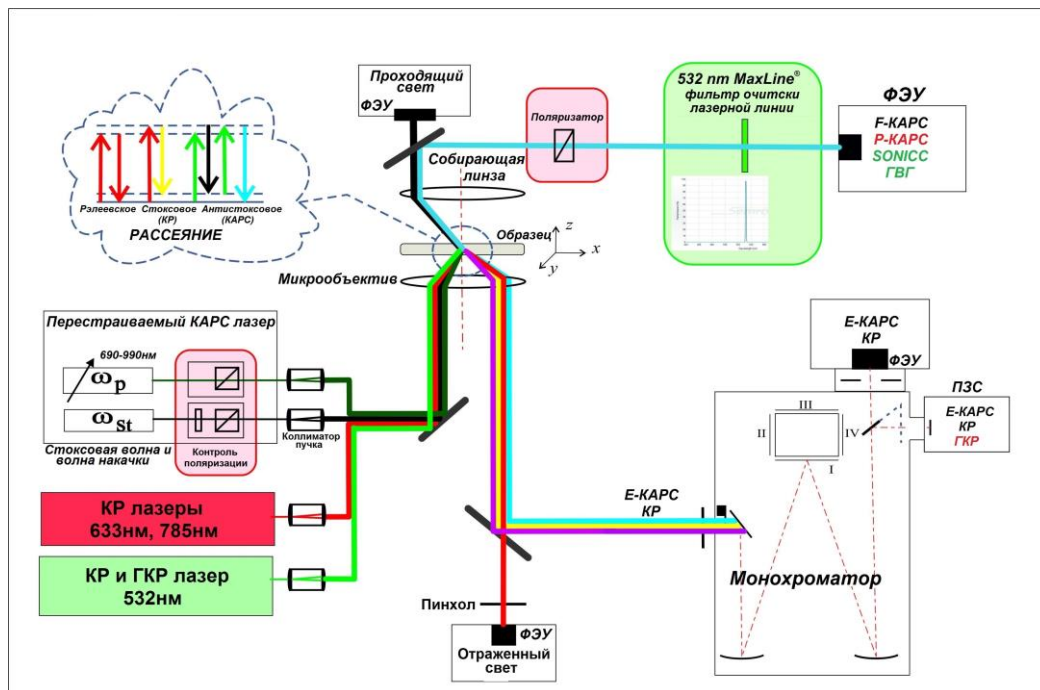


Рис.3 Оптическая схема платформы после модернизации в 2015 г.

Таким образом, в настоящее время для обычного (спонтанного) комбинационного рассеяния и ГКР используется, в зависимости от задачи и образца, три лазерных источника с длинами волн 532нм, 633нм, и 785 нм. Для генерации же КАРС процесса на платформе установлен пикосекундный перестраиваемый Nd:YVO₄ лазер модели PT257-SOPO, EKSPLA, Литва. Частота следования импульсов составляет 85 МГц, длительность импульса ~ 6пс.

Хорошо известно, что импульсы длительностью в несколько пикосекунд являются подходящим компромиссом между высокой интенсивностью и узкой шириной линии необходимой для КАРС-микроскопии. Кроме того, интенсивность таких пучков достаточна для генерации и регистрации других нелинейных процессов, в частности генерации второй гармоники, суммарной частоты, и т.д.

Для перестройки длины волны излучения с целью резонансной настройки волны накачки на молекулярные колебательные уровни анализируемого образца, в данной модели лазера реализована схема внутррезонаторной перестройки длины волны излучения с помощью оптического параметрического генератора (ОПГ), работающего в режиме синхронной накачки (SOPO – synchronously pumped optical parametric oscillator). Накачка нелинейного кристалла LBO в ОПГ осуществляется второй гармоникой (532 нм, 6 пс, 2 Вт) основного излучения, а перестройка длины волны происходит за счет изменения температуры кристалла LBO в пределах от 107°С до 148°С (некритичный по температуре фазовый синхронизм). Это обеспечивает перестройку длины волны накачки в широком спектральном диапазоне от 690 нм до 990 нм. Во всей перестраиваемой спектральной полосе ширина линии излучения составляет от 5 до 7 см⁻¹ с длительностью импульса 5-6 пс при типичных значениях выходной мощности от 50 до 200 мВт и при частоте повторения импульсов 85 МГц, задаваемой лазером накачки. В качестве Стокс-волны используется лишь небольшая часть (около 10%) от основного излучения (1064 нм). В резонаторе предусмотрена также контролируемая от компьютера оптическая линия задержки, позволяющая с большой точностью синхронизовать и совмещать во времени волну накачки со Стоксовой волной.

Для установки образцов в системе используется автоматизированный столик, встроенный в микроскоп NIKON TE-2000S. Для фокусировки лазерного пучка используются разные по светосиле и конфигурации микрообъективы. С целью достижения высокого пространственного разрешения для КАРС-микроскопии используется водно-иммерсионный объектив Olympus UPLSAPO 60x с высокой числовой апертурой NA=1.2.

Используя параметры применяемых лазеров и соответствующей оптики, образец можно спектрально-селективно визуализировать в диапазоне волновых чисел $(1000-3580)\text{см}^{-1}$, который охватывает все наиболее важные колебательные моды биомолекул. Пять каналов регистрации позволяют записывать рамановские и люминесцентные сигналы в прямом и в обратном направлениях.

Автоматизированный XY-гальванометр (GSI-Lumonics VM1000) обеспечивает быстрое сканирование образца в продольной фокальной плоскости объектива. Время интегрирования сигнала при КАРС-микроскопии составляло 3 мкс/пиксель, в результате общее время скана КАРС-имиджа (карты) составляло не более 3с (включая время передачи изображения и время визуализации изображения). Микрообъектив смонтирован на управляемой компьютером Z-пъезоподвижке для получения и записи 3D-изображений с минимальным шагом сканирования 0,1 мкм.

Основные этапы темы/проекта и ожидаемые результаты.

- Выработка научно-технических требований по модификации аппаратуры и управляющей программы пикосекундного лазерного КАРС/КР-микроспектрометра.
- Регистрация резонансных и нерезонансных сигналов ГКАРС в "горячих точках" и картирование интенсивности ГКАРС различными молекулами-аналитами, возбуждаемыми пикосекундными лазерными импульсами на исследуемых ГКР-активных поверхностях.
- Достижение уровня чувствительности воспроизводимой регистрации одиночных (единиц) молекул в поле зрения микрообъектива методом ГКАРС.
- Теоретическая поддержка и моделирование ГКАРС-процесса.
- Верификация опухолевых и стволовых клеток методом спектроскопии и микроскопии комбинационного рассеяния, в т.ч. и КАРС-микроскопии.
- Исследований структурных (СЭМ, ТЭМ, АСМ, МУР) и спектроскопических (в том числе люминесцентных), свойств наноструктур типа «ядро-оболочка» на основе $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}@\text{SiO}_2$.
- Создание единой комплементарной оптической платформы для контрастной и селективной биовизуализации образцов методами нелинейной микроскопии комбинационного рассеяния и апконверсионной люминесценции.
- Тестовое применение в фотодинамической терапии рака метода апконверсионной люминесценции наноструктур «ядро-оболочка» с порфиринами в качестве сенсibilizаторов.

Экспериментальный задел по проекту к настоящему времени

В 2017 году начаты пробные работы по разработке и получению первых тестовых результатов по ГКАРС. В качестве молекул-аналита был выбран тринитробензол (TNB), иммобилизованные с Au наночастицами на ГР-активной подложке.

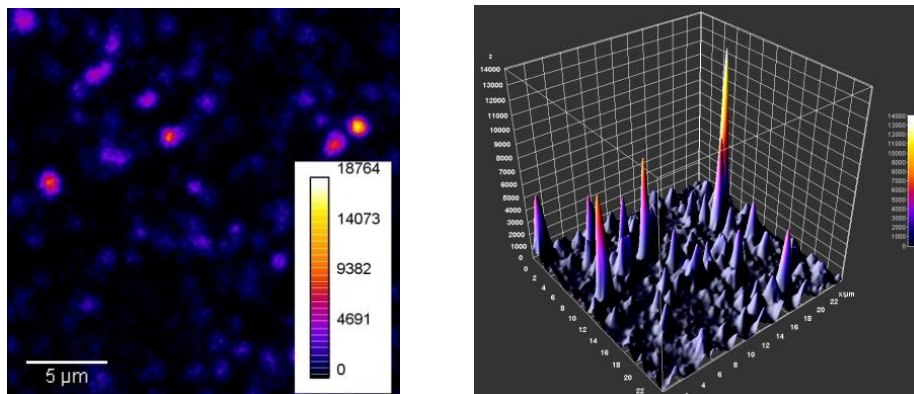


Рис.4 ГКАРС спектральная карта интенсивности молекул TNB на линии 1338cm^{-1}

Были получены первые микро-имиджи распределения интенсивности ГКАРС сигнала на характерной рамановской линии спектра TNB 1338cm^{-1} при пикосекундном возбуждении молекул в ближней ИК области спектра с контрастом на уровне 1.5×10^4 (рис.4). Это весьма обнадеживающий тестовый результат по ГКАРС-микроскопии на нашей оптической платформе, **к тому же это первый подобный результат в России**. В апреле 2017 года данная работа была представлена на международной конференции в Германии ECONOS-2017 [ссылка 18 в списке конференций].

В области люминесцентных исследований получены два важных результата в плане будущей реализации предлагаемого нового проекта:

- 1) плазмонно-усиленная на поверхности апконверсионная люминесценция (АКЛ) на нанокристаллах $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ с фактором усиления ~ 18 в «горячих» точках (рис.5).

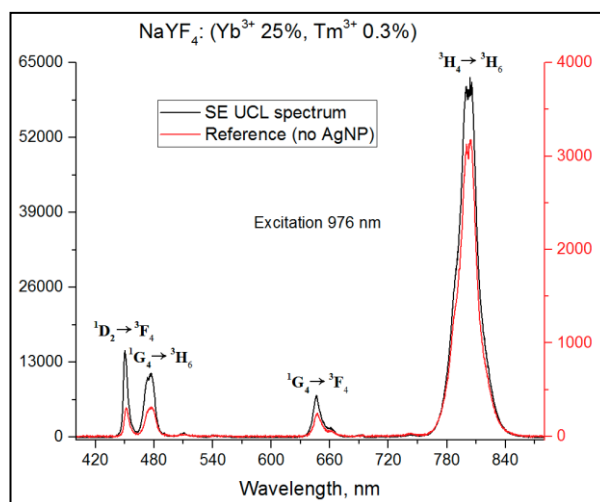


Рис.5. Сравнительные спектры обычной АКЛ наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ (красный) и усиленной поверхностью АКЛ (черный). Фактор усиления ~ 18 в «горячих» точках.

- 2) визуализация ватных волокон диаметром в диапазоне от нескольких до десятков мкм с помощью апконверсионной люминесценции (рис.6).

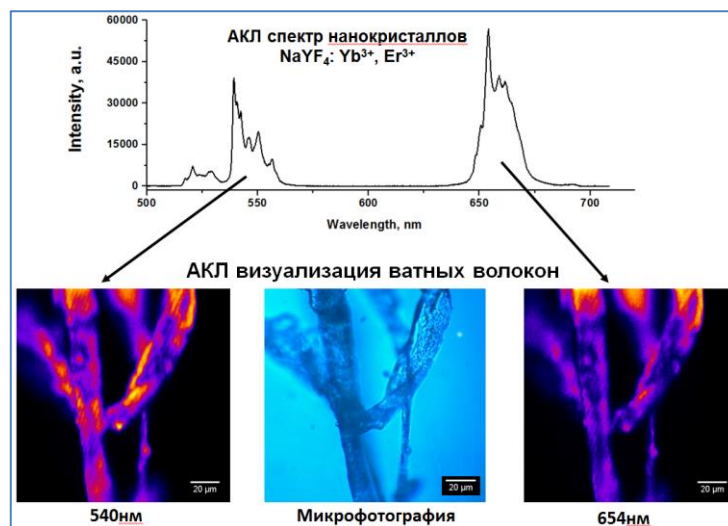


Рис.6 АКЛ спектр нанокристаллов $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ (верхняя кривая) и визуализация ватных волокон диаметром от нескольких до десятков мкм

Полученные предварительные результаты однозначно указывают на возможность применения и получения контрастного имиджинга образцов различной природы методом АКЛ, а также усиления интенсивности люминесценции АКЛ-наночастиц в сопряжении с серебряными или золотыми наночастицами.

Практически все спектроскопия и микроскопия по предлагаемому проекту будет выполняться на установке «КАРС» микроскоп в ЛНФ ОИЯИ. За прошедшие три-четыре года персонал сектора Рамановской спектроскопии приобрел достаточный опыт и навыки, чтоб успешно справиться с выполнением нового проекта. Это подтверждается также и рядом публикаций в высокорейтинговых журналах и участием в крупных международных конференциях за прошедший отчетный период (список прилагается). Роль партнеров проекта также нельзя недооценивать как в плане поставки различных образцов, так и в плане анализа и обсуждения результатов. Особое внимание будет уделено выбору партнера для теоретической поддержки проекта.

В секторе Рамановской спектроскопии в настоящее время работают 12 сотрудников (5 из них с неполным рабочим временем). Семеро из двенадцати – молодые ученые и инженера в возрасте до 35 лет. Сектор состоит из двух групп – группа нелинейной Рамановской спектроскопии, и группа прикладных исследований. Весь состав Сектора будет задействован в реализации предлагаемой новой темы и нового проекта.

Таким образом, вышеописанная оптическая платформа своими современными характеристиками для рамановской микроспектроскопии и люминесцентных исследований, потенциально готова к выполнению нового проекта в рамках новой темы как по модальности ГКАРС (SECARS), так и по апконверсионной люминесценции на основе наноструктур «ядро-оболочка».

**Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления
Проекта «Ультрочувствительная микроспектроскопия SECARS и
люминесцентные наноструктуры ядро-оболочка».**

Наименования затрат, ресурсов, источников финансирования		Стоимость (тыс. долл.). Потребности в ресурсах	Предложение лаборатории по распределению финансирования и ресурсов		
			1 год	2 год	3 год
Затраты	Основные узлы оборудования, работы по его обновлению, наладке и т.п. (микрообъективы, спектрофотометр, измерительная аппаратура и др.)	62	20	21	21
	Материалы	38	13	12	13
Источники финансирования	Бюджетные средства	100	33	33	34
	Внебюджетные средства	-	-	-	-

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

Г.М. Арзуманян

Н. Кучерка

План-график работ на 2018-2020 гг.

Наименование работ		План работ по годам		
		2018	2019	2020
1.	Разработка научно-технических требований по модификации КАРС/КР-микроспектрометра под ГКАРС.			
2.	Регистрация резонансных и нерезонансных сигналов ГКАРС в "горячих точках" и картирование интенсивности ГКАРС различными молекулами-аналитами.			
3.	Достижение уровня чувствительности воспроизводимой регистрации одиночных (единиц) молекул в поле зрения микрообъектива методом ГКАРС.			
4.	Теоретическая поддержка и моделирование ГКАРС-процесса			
5.	Верификация опухолевых и стволовых клеток методом спектроскопии и микроскопии комбинационного рассеяния, в т.ч. и КАРС-микроспектроскопии.			
6.	Исследований структурных и спектроскопических (в том числе люминесцентных), свойств наноструктур типа «ядро-оболочка» на основе $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}@\text{SiO}_2$			
7.	Создание единой комплементарной оптической платформы для биовизуализации образцов методами нелинейной микроскопии КР рассеяния и апконверсионной люминесценции			
8.	Применение апконверсионной люминесценции наноструктур «ядро-оболочка» в фотодинамической терапии (ФДТ) рака в качестве эффективных биомаркеров-сенситизаторов.			

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

Г.М. Арзуманян

Н. Кучерка

**Смета затрат по проекту «Ультрочувствительная микроспектроскопия SECARS
и люминесцентные наноструктуры ядро-оболочка».**

№№ пп	Наименование статей затрат	Полная стоимость, тыс.\$	Расходы по годам (тыс. \$)		
			1 год	2 год	3 год
5.	Материалы	38	13	12	13
6.	Оборудование	62	20	21	21
9.	Оплата НИР, выполняемых по договорам	26	8	9	9
10.	Командировочные расходы, в т.ч.	54	18	18	18
	а) в страны нерублевой зоны		14	14	14
	б) в города стран рублевой зоны		4	4	4
	в) по протоколам		-	-	-
	Итого по прямым расходам:	180	59	60	61

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

Г.М. Арзуманян

Н. Кучерка

ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ

В.Н. Швецов

ВЕДУЩИЙ ИНЖЕНЕР-ЭКОНОМИСТ ЛНФ

Л.С. Овсянникова

Основные публикации и патент

1. Arzumanyan G.M., Doroshkevich N.V., Mamatkulov K.Z., Gordeliy V.I., et al., "Highly Sensitive Coherent anti-Stokes Raman Scattering Imaging of Protein Crystals", JACS, 2016, Volume 138(41), pp. 13457-13460
2. Arzumanyan G.M., Kuznetsov E.A., Zhilin A.A., et al., "Photoluminescence of transparent glass-ceramics based on ZnO nanocrystals and co-doped with Eu³⁺, Yb³⁺ ions", J. Optical Materials, 62, 2016, 666-672
3. Girel K., Yantcevich E., Arzumanyan G, et al., "Detection of DNA molecules by SERS spectroscopy with silvered porous silicon as an active substrate", Phys. Status Solidi A, 1–5 (2016) / DOI 10.1002/pssa.201600432
4. Othman H.A., Arzumanyan G.M., Moncke D., "The influence of different alkaline earth oxides on the structural and optical properties of undoped, Ce-doped, Sm-doped, and Sm/Ce co-doped lithium alumino-phosphate glasses", J. Optical Materials, 62, 2016, 689-696
5. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., et al., "Surface Enhanced CARS from Gold Nanoparticle-Immobilized Molecules at Cerium Dioxide/Aluminium Film", Technical Digest (Nanophotonics and Plasmonics) of Int. Conf. ICONO/LAT 2016, p. 88-89, Minsk, Belarus, September 26–30, 2016.
6. Kaniukov E.Yu., Belonogov E.K., Arzumanyan G.M., et al., "Features of forming of copper deposit in pores of silicon oxides", Proceedings of the NAS of Belarus, Physico-Technical series 2016, # 3, pp 11-15
7. O.Yu. Poimanova, A.O. Medvid, I.S. Kolomets, G.M. Arzumanyan, "Synthesis of barium isopolytungstates from aqueous dimethylformamide solutions", Nauka Kubani, 2016, #4, 4-11
8. Arzumanyan G.M., Kulchitsky V.A., Dosina M.O., Mamatkulov K.Z., et al., JSCRT, Vol. 1(1), Dec. 2016
9. P.A. Loiko, G.E. Rachkovskaya, G.M. Arzumanyan, et al., "Mechanisms of upconversion luminescence in glass-ceramics containing Er:PbF₂ nanocrystals", J. Appl. Spectr., 2017, 84(1)
10. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., et al., "Surface Enhanced micro-CARS from Gold Nanoparticle-Immobilized Organic Molecules", Int. conf. ECONOS, 2-5 April, 2017, Jena, Germany, Technical Digest, pp.73-74
11. V. Polovinkin, D. Willbold, G. Arzumanyan, J.-L. Popot, V. Gordeliy, et al., "Nanoparticle Surface-Enhanced Raman Scattering of Bacteriorhodopsin Stabilized by Amphipol A8-35", J. Membrane Biol (2014), 247, 971–980
12. Patent of the Russian Federation, "Luminescent glass-ceramics", # 2579056, 02.03.2016

Конференции

1. 2nd International conference on NT and Biomedical Engineering, April 18-20, 2013, Chisinau, Rep. of Moldova
2. International conference on RARE EARTH MATERIALS, REMAT-2013, Wroclaw, Poland, 26-28 April
3. XVII scientific conference of young researchers and specialists, 08-12 April 2013 г., JINR, Dubna
4. Int. conference ICNRP-2013, 24-27 September 2013, Kazakhstan
5. 27th International Congress "Laser Florence 2013", Nov 9-10, 2013, Italy
6. 41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society-ERR-2014, September 14-19, 2014., Greece
7. Nano-2014 Belarus-Russia-Ukraine, 7-10 October, 2014, Minsk, Belarus
8. 2nd International Summer School and Workshop, 29 Sept.-3 Oct., 2014, Dubna,
9. Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research – RAD 2015, Montenegro
10. III International Conference on Small Angle Neutron Scattering dedicated to the 80th anniversary of Yu.M. Ostanevich, 6-9 June, 2016, JINR, Dubna
11. Int. conference on Coherent and Nonlinear Optics (ICONO) & Conference on Lasers, Applications, and Technologies (LAT) - ICONO / LAT 2016, Minsk, Belarus, September 26–30, 2016.
12. The 7th International Conference on Optical Spectroscopy, Laser and their Applications, 18-20 October 2016, NRC, Cairo, Egypt
13. BIT's 6th Annual World Congress of Nano Science and Technology-2016 (Nano S&T-2016), Singapore, October 26-28, 2016
14. Nano-2016 Belarus-Russia-Ukraine, 22-25 November, 2016, Minsk, Belarus
15. Int. conference FTT-2016, 22-25 November, 2016, Minsk, Belarus
16. Int. conference PIERS 2017, 22 - 25 May, 2017, St Petersburg.
17. Nanomeeting-2017, 30 May – 02 June, 2017, Minsk, Belarus
18. Int. conference ECONOS-2017, April, 2-5, 2017, Abbe Center of Photonics, Jena, Germany
19. BIT's 1st Int. Biotechnology Congress (IBC-2017), Xi'an, China, April 25-27, 2017.



ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВЫПИСКА

из Протокола №37 Научно-технического совета
Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка

20.04.2017 г.

Численный состав НТС: 35 чел.

Присутствовало на заседании: 24 чел.

5.1. Слушали: Г.М. Арзумяна с отчетом по теме ПТП ОИЯИ 04-4-1111-2013/2017 «Мультимодальная платформа Рамановской и нелинейной оптической микроскопии и микроспектроскопии для исследования конденсированных сред».

В обсуждении принимали участие: С.А. Куликов, А.И. Куклин, А.И. Франк.

Постановили: по результатам открытого голосования (24 – за, против – нет, воздержавшихся – нет): Отчет по завершению темы ПТП ОИЯИ 04-4-1111-2013/2017 «Мультимодальная платформа Рамановской и нелинейной оптической микроскопии и микроспектроскопии для исследования конденсированных сред» принять.

Председатель НТС ЛНФ

А.И. Франк

Секретарь НТС ЛНФ

Т. В. Тропин

«Выписка верна»
Ученый секретарь ЛНФ

Д. Худоба



ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВЫПИСКА из Протокола №37 Научно-технического совета Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка

20.04.2017 г.

Численный состав НТС: 35 чел.

Присутствовало на заседании: 24 чел.

5.2. Слушали: Г.М. Арзумяна с предложением по открытию новой темы «Современные подходы и разработки в области Рамановской микроспектрометрии и фотолуминесценции для исследований конденсированных сред».

В обсуждении принимали участие: С.А. Куликов, А.И. Куклин, А.И. Франк.

Постановили: по результатам открытого голосования (24 – за, против – нет, воздержавшихся – нет):

1. Утвердить текст обоснования на открытие новой темы «Современные подходы и разработки в области Рамановской микроспектрометрии и фотолуминесценции для исследований конденсированных сред», формулировки решаемых задач, итогов по завершению темы и основных этапов.
2. Открыть новую тему на три года.

Председатель НТС ЛНФ

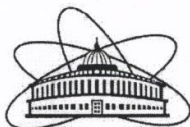
А.И. Франк

Секретарь НТС ЛНФ

Т. В. Тропин

«Выписка верна»
Ученый секретарь ЛНФ

Д. Худоба



ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВЫПИСКА

из Протокола №37 Научно-технического совета
Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка

20.04.2017 г.

Численный состав НТС: 35 чел.

Присутствовало на заседании: 24 чел.

5.3. Слушали: Г.М. Арзумяна с представлением проекта «Ультрочувствительная микроспектроскопия SECARS и люминесцентные биомаркеры на основе наноструктур ядро-оболочка» в рамках темы «Современные подходы и разработки в области Рамановской микроспектрометрии и фотолюминесценции для исследований конденсированных сред».

Постановили: по результатам открытого голосования (24 – за, против – нет, воздержавшихся – нет) одобрить проект «Ультрочувствительная микроспектроскопия SECARS и люминесцентные биомаркеры на основе наноструктур ядро-оболочка» на 2018-2020 гг., рекомендовать представить проект на 46-й сессии ПКК ОИЯИ по КС и открыть проект с первым приоритетом.

Руководитель проекта: Г.М. Арзумян.

Председатель НТС ЛНФ

А.И. Франк

Секретарь НТС ЛНФ

Т. В. Тропин

«Выписка верна»
Ученый секретарь ЛНФ

Д. Худоба

**Рецензия на предложение об открытии новой темы
«Современные тенденции и разработки в области Рамановской микроспектрометрии и
фотолюминесценции для исследований конденсированных сред»
и проекта «Ультрочувствительная микроспектроскопия SECARS и люминесцентные
биомаркеры на основе наноструктур ядро-оболочка».**

Предлагаемая новая научная тема является гармоничным и естественным продолжением успешно завершающейся темы № 04-4-1111-2013/2017 «Мультимодальная платформа Рамановской и нелинейной оптической микроскопии и микроспектроскопии для исследования конденсированных сред».

Свою оценку я бы хотел начать с одного очень важного обстоятельства – сегодня в ЛНФ ОИЯИ функционирует единственная в России и уникальная в мире установка – пикосекундный микроспектрометр когерентного антистоксова рассеяния света – «КАРС микроскоп». И, несмотря на то, что направление Рамановской спектроскопии развивается в ОИЯИ относительно недавно, с 2013 года, несомненной заслугой квалифицированного коллектива, выполняющего работы по данной тематике, является постоянное стремление проводить исследования в русле мировых тенденций развития Рамановской спектроскопии и микроскопии. Ввиду того, что спектр Рамановского рассеяния очень информативен, но его интенсивность чрезвычайно мала, в настоящее время ученые во всем мире разрабатывают и реализовывают различные схемы и методики, позволяющие значительно увеличить эффективность рассеяния света, несущего информацию о структуре среды и происходящих в ней физических и химических процессах. Среди этих методик особый интерес представляют гигантское или усиленное-поверхностью комбинационное рассеяние (ГКР, SERS в английской терминологии), КАРС (CARS) и ЗУРС (зондово-усиленное рассеяние света, TERS – tip enhanced RS). Эти тенденции и отражены в названиях новой темы и проекта по разработке и исследованию ультрочувствительной Рамановской микроспектроскопии.

Достигнутые результаты предыдущих трех лет работы как по освоению достаточно непростой КАРС методики, определившей конструкцию самого прибора, так и по освоению и развитию на этой установке методики гигантского комбинационного рассеяния, инициированных уже руководителем темы, позволило коллективу Сектора Рамановской спектроскопии вплотную подойти к работам по сочетанию этих двух усиливающих методик. Привлекательность микроспектроскопии усиленного поверхностью когерентного антистоксова рассеяния света (ГКАРС или SECARS) молекулами, локализованными на ГКР-активных поверхностях, состоит в том, что теоретически достижимый коэффициент усиления интенсивности рассеянного излучения для ГКАРС на порядки больше, чем для ГКР. Кроме того, более высокая, чем частоты излучений накачки, частота рассеянного антистоксова излучения, позволяет, в отличие от ситуации с обычным ГКР, радикально отстроиться от паразитной стоксовой люминесценции, характерной для большинства образцов, представляющих интерес для биологических, химических и материаловедческих задач. Это позволяет надеяться получить, за счет использования нелинейной оптики, возможность значительно расширить круг объектов, регистрируемых оптическими методами и достичь чувствительности в десятки- единицы молекул в исследуемой области. **Отметим также, что количество публикаций в мировой литературе в указанной выше области исчисляется единицами.**

Несомненным достоинством проекта является также и предложение о создании единой комплементарной оптической платформы для биовизуализации объектов методами Рамановской микроскопии и люминесценции на основе наноструктур «ядро-оболочка».

Резюмируя отмечу, что проект «Ультрочувствительная микроспектроскопия SECARS и люминесцентные биомаркеры на основе наноструктур ядро-оболочка», предложенный в рамках новой темы представляется весьма актуальным, научно высокозначимым и заслуживающим всяческой поддержки для ее реализации в ЛНФ ОИЯИ в предстоящие три года.

**Заведующий отделом Оптической спектроскопии
Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН
д.ф.-м.н., профессор**

г. Москва, «03» мая 2017 г.



В.В. Смирнов

**Рецензия на открытие новой темы и проекта: «Ультрочувствительная
микроспектроскопия SECARS и люминесцентные биомаркеры
на основе наноструктур ядро-оболочка»**

Рецензируемый проект направлен на решение современных фундаментальных и практических задач в области фото - и апконверсионной люминесценции в рамках предложенной к рассмотрению новой темы ОИЯИ.

Как нам известно, из опубликованных научных работ мультимодальная оптическая платформа на базе «КАРС» микроскопа успешно использовалась в прошлые годы не только для исследований в области рамановской и нелинейной комбинационной спектроскопии и микроскопии, но и с учетом уникальной специфики данного прибора, для люминесцентных исследований различных оптических матриц, активированных редкоземельными элементами (РЗЭ). Уникальность подхода заключалась в том, что наряду с измерением фотолюминесценции при высокоэнергетическом возбуждении на оптической платформе реализована возможность возбуждения образцов ближним ИК излучением (многофотонное поглощение) и регистрация люминесцентных сигналов в антистоксовой области спектра, как и в случае КАРС спектроскопии. Это явление, известное как апконверсионная люминесценция (АКЛ), имеет ряд интересных приложений. В частности, наночастицы, обладающие АКЛ, все чаще рассматриваются как эффективная альтернатива традиционным флуоресцентным маркерам для визуализации биологических объектов, поскольку они лишены ряда ограничений присущих, например, красителям (оптическая нестабильность, фотовыцветание и др.).

В последние годы, во многих ведущих мировых центрах, работающих в данном научном направлении, используются перспективные наноструктуры, известные как “core-shell” (ядро-оболочка) наночастицы. Такие наночастицы привлекательны разнообразием своего химического состава и структуры, обеспечивающих их многофункциональность и чрезвычайно высокую интенсивность люминесценции. Особо ярко люминесцентные характеристики проявляются при синтезе сложных по составу оболочек, состоящих, в том числе, из наночастиц серебра или золота. На исследование именно такого типа наноструктур и нацелен рецензируемый проект. Безусловно, с научной и практической точки зрения, рецензируемый проект относится к перспективному направлению в физике, аналогично обнаруженному явлению гигантского комбинационного рассеяния света.

В качестве прикладной задачи, после определенного этапа научной работы и достижения высокой интенсивности люминесценции от “core-shell” (ядро-оболочка) наночастиц, авторами проекта намечено их тестирование в исследованиях по фотодинамической терапии рака (ФДТ) с использованием

наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ в качестве ядра и порфиринов в качестве оболочек. Здесь прослеживается не только важность такой работы, но и определенная новизна в данной тематике.

В заключение необходимо отметить несколько важных аспектов:

1. Проведение исследований с использованием двух взаимодополняющих методик – комбинационного рассеяния света и люминесценции является продуктивным научным подходом. Выполнение рецензируемого проекта в рамках международного сотрудничества, в том числе и с учеными Республики Беларусь, может стать комплементарным с проектом по комбинационному рассеянию света в ряде приложений, в частности по контрастной оптической визуализации биологических объектов, диагностике заболеваний онкологической и бактериальной природы и др.

2. Выбор наноструктур –“core-shell” (ядро-оболочка) на основе наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ в качестве ядра и оболочек с наночастицами серебра или золота для усиления люминесцентных сигналов за счет эффекта плазмонного взаимодействия, представляется важным шагом для создания конкурентоспособных люминофоров и по научной идеологии соответствует современным исследованиям, разработкам и приложениям в этой области знаний.

Основываясь на вышеизложенном, **уверенно рекомендуем** данный проект к реализации на мультимодальной оптической платформе Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ в рамках предложенной новой темы сроком на 2018 – 2020 гг.

**Генеральный директор
Государственного научно-производственного объединения
«Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси
по материаловедению»,
член- корреспондент НАН Беларуси,
доктор физ.-мат. наук**

**Главный научный сотрудник,
кандидат физ.-мат. наук**



В. М. Федосюк

А. В. Мудрый