

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИКИ имени Б. И. СТЕПАНОВА
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

Объект авторского права
УДК 535.37, 577.352, 539.25

ФИЛИМОНЕНКО
Дмитрий Сергеевич

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ И
СКАНИРУЮЩЕЙ БЛИЖНЕПОЛЕВОЙ
ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ
ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ЛОКАЛЬНЫХ
ТОПОГРАФИЧЕСКИХ, ОПТИЧЕСКИХ И
МАГНИТНЫХ СВОЙСТВ НАНОРАЗМЕРНЫХ
ОБЪЕКТОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук
по специальности 01.04.05 – оптика

Минск 2023

Работа выполнена в Государственном научном учреждении «ИНСТИТУТ ФИЗИКИ имени Б. И. СТЕПАНОВА НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Научный руководитель:

Могилевцев Дмитрий Сергеевич,
доктор физико-математических наук,
член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, заместитель заведующего центром «Квантовая оптика и квантовая информатика» ИНСТИТУТА ФИЗИКИ НАН Беларуси

Официальные оппоненты:

Самцов Михаил Петрович,
доктор физико-математических наук,
профессор, заведующий лабораторией спектроскопии Научно-исследовательского учреждения «Институт прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко» Белорусского государственного университета

Ходасевич Инна Андреевна,
кандидат физико-математических наук,
заместитель заведующего центром «Нелинейная оптика и активированные материалы» ИНСТИТУТА ФИЗИКИ НАН Беларуси

Оппонирующая организация: Научно-исследовательское учреждение «Институт ядерных проблем» Белорусского государственного университета

Защита состоится «16» января 2024 г. в 14-30 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.05.01 при ИНСТИТУТЕ ФИЗИКИ НАН Беларуси по адресу: 220072, г. Минск, пр. Независимости, 68-2; тел. ученого секретаря: 270-87-98; e-mail: m.parkhots@infabel.bas-net.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНСТИТУТА ФИЗИКИ НАН Беларуси.

Автореферат разослан «1» декабря 2023 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат физико-математических наук

Пархоц М.В.

ВВЕДЕНИЕ

Появление и развитие методов сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) ознаменовало кардинально новый этап в изучении поверхностной структуры и локальных физико-химических характеристик наноразмерных объектов различной природы, в том числе биологических. Среди методик СЗМ наиболее широкое распространение в биологии и биомедицине получила атомно-силовая микроскопия (АСМ). Одним из наиболее перспективных направлений использования метода АСМ является изучение влияния различных патологических и болезненных состояний на наноструктуру клеточной мембраны. Актуальное диагностическое значение таких исследований связано с исключительно важной ролью мембраны в ответе клетки на неблагоприятные внешние воздействия, что в ряде случаев позволяет характеризовать клиническую ситуацию на ранней стадии, при отсутствии значимых отклонений в морфологических показателях. Хотя изучению сдвигов в величине шероховатости поверхности клеток в норме и при различных патологиях посвящено значительное количество работ, исследования в этом направлении не теряют своей актуальности. В настоящей работе с помощью АСМ исследовались особенности модификации тонкой структуры поверхности клеток крови при воздействии на них ионов тяжелых металлов (цинка и свинца). Известно, что токсическое воздействие ионов цинка и свинца может являться одним из факторов, инициирующих программированную гибель клетки (апоптоз). В этой связи дополнительно изучалась реакция эритроцитов на неблагоприятные воздействия, способствующие активации механизма апоптоза.

Одним из методов получения не только топографических, но и оптических изображений объектов различной природы с субдифракционным разрешением является метод сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии (СБОМ). В силу жесткости и хрупкости оптоволоконного зонда (ОЗ) актуальной проблемой для СБОМ является минимизация силового контактного взаимодействия в системе зонд-поверхность, в особенности при сканировании мягких образцов, таких как биологические объекты. В этом отношении перспективным является использование режима прерывистого контакта (tapping mode), предполагающего применение изогнутых (кантилеверных) ОЗ, приклеенных к камертонному кварцевому сенсору. На основе проведенного в диссертации численного анализа формы изгибных колебаний зондов показано, что эффективная реализация режима прерывистого контакта возможна лишь при использовании изогнутых ОЗ определенной геометрии. Были установлены оптимальные параметры изгиба зондов, позволяющие минимизировать латеральное силовое воздействие по отношению к исследуемым образцам, и определена оптимальная конфигурация их соединения с камертоном.

Заметной тенденцией в развитии методики СБОМ является расширение универсальности и диапазона решаемых задач, в том числе за счет использования многофункциональных зондов, предлагающих значительный арсенал аналитических возможностей. Одним из наиболее перспективных направлений функционализации оптоволоконных зондов является помещение на острие нанокристалла алмаза, содержащего центры окраски “азот-вакансия” (NV-центры). Такие зонды могут быть использованы для детектирования слабых магнитных полей, в том числе биологических, с пространственным разрешением порядка единиц-десятков нанометров. Основным методом магнитометрии на основе NV-центров в настоящее время является регистрация спектров оптически детектируемого магнитного резонанса (ОДМР), недостатком которого является необходимость подвода СВЧ-излучения к алмазной частице. Один из новых подходов к магнитометрии на основе NV-центров, не требующий СВЧ-накачки, предполагает использование явлений антипересечения уровней и кросс-релаксации в ансамблях NV-центров, которые выражаются в резком (резонансном) изменении интенсивности фотолюминесценции ансамбля при наложении магнитного поля определенной величины и ориентации. В настоящей работе детально изучены особенности кросс-релаксационного резонанса в области нулевого магнитного поля (РНП), механизм возникновения которого к началу исследований по теме диссертации оставался до конца не выясненным.

Изучение рассмотренных выше вопросов позволяет расширить возможности диагностического применения методов АСМ и СБОМ и представляется актуальным как в прикладном, так и в фундаментальном аспектах.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Настоящая работа выполнялась в рамках задания 2.04 “Исследования распределения липидных доменов и белков на поверхности плазматических мембран клеток крови при воздействии на них физико-химических факторов методами ближнеполевой оптической и атомно-силовой микроскопии” ГКПНИ “Биологическая инженерия и биобезопасность” (2006-2010 гг., № госрег. 20063868); задания 1.42 “Исследование оптических свойств планарных наноструктур типа металл-окисел с целью создания на их основе сенсоров и других систем оптоэлектроники” ГКПНИ “Физические и технологические основы создания новых материалов, элементной базы и разработка устройств опто-, микро- и наноэлектроники, информационно-измерительных систем и приборов” (2006-2010 гг., № госрег. 20063525); подзадания “Однофотонные излучатели на основе наноалмазов” задания 3.1.01 “Разработка и исследование

источников и интегральных компонентов управления одиночными и коррелированными (перепутанными) фотонами для квантово-информационных и высокоточных диагностических приложений” ГПНИ “Конвергенция” (2011-2015 гг., № госрег. 20110687); подзадания “Исследование, разработка и применение методов зондовой микроскопии для решения задач квантовой оптики, нанофотоники и нанобиофизики” задания 3.1 “Исследовать квантово-информационные и квантово-оптические процессы и разработать на их основе методы, алгоритмы и устройства для квантово-информационных технологий” ГПНИ “Конвергенция–2020” (2016-2020 гг., № госрег. 20160086); задания 3.01.1 “Исследование физических реализаций твердотельных и фотонных кубитов, разработка и анализ методов их использования в квантовой информатике, квантовой метрологии и квантовой сенсорике” ГПНИ “Конвергенция–2025” (2021-2025 гг., № госрег. 20210592); НИР “Сканирующий ближнеполевой микроскоп инфракрасного диапазона для исследования биологических объектов и тонкопленочных структур” (Договор с БРФФИ № Ф08Р-151 от 01.04.2008 г., 2008-2010 гг., № госрег. 20081829); НИР “Определение нанодиагностических параметров структурно-функционального состояния мембран клеток крови на основе методов зондовой микроскопии и оптической спектроскопии” (договор с БРФФИ № Ф13М-147 от 16.04.2013 г., 2013-2015 гг., № госрег. 20131442); НИР “Квантовая световодная магнитная градиометрия” (Договор с БРФФИ № Ф16Р-156 от 20.05.2016 г., 2016-2018 гг., № госрег. 20162943); НИР “Оптоволоконный интерфейс для регистрации электронного спинового резонанса в алмазе” (договор с БРФФИ № Ф18Р-118 от 30.05.2018 г., 2018-2020 гг., № госрег. 20181396).

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь, в частности пункту 4 “Машиностроение, машиностроительные технологии, приборостроение и инновационные материалы: наноматериалы и нанотехнологии, нанодиагностика” перечня приоритетных направлений научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы согласно Указа Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 №156.

Цель, задачи, объект и предмет исследования

Цель настоящей работы — развитие возможностей и инструментария методов атомно-силовой и сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии для детектирования локальных топографических, оптических и магнитных свойств наноразмерных объектов.

В соответствии с целью были поставлены и решены следующие задачи:

1. Методами сканирующей зондовой микроскопии исследовать изменения в шероховатости поверхности эритроцитов и лимфоцитов человека в от-

вет на ряд неблагоприятных воздействий (повышение уровня цинка, свинца, внутриклеточного кальция и др.), выявить наиболее информативные параметры для количественной характеристики изменений в поверхностной структуре клеток крови и изучить взаимосвязь между топографией клеточной мембраны и ее структурно-функциональным состоянием.

2. Исследовать и оптимизировать характеристики сенсора поверхности на основе системы “оптоволоконный зонд-кварцевый резонатор” для реализации прерывисто-контактного режима работы СБОМ. Разработать и изготовить высокочувствительный камертонный сенсор поверхности для прерывисто-контактного режима работы СБОМ на основе оптоволоконных зондов загнутого типа с оптимизированными характеристиками.

3. Экспериментально исследовать люминесцентные свойства NV-центров в различных образцах алмаза, в том числе в присутствии внешнего магнитного поля, исследовать возможность функционализации оптоволоконных зондов для СБОМ путем иммобилизации на острие нанокристаллов алмаза с NV-центрами.

Объектом исследования являются эритроциты и лимфоциты человека, оптоволоконные зонды для сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии, NV-центры в кристалле алмаза.

Предмет исследования — наноструктура шероховатости и оптические свойства мембран клеток крови человека, оптимизация геометрических характеристик оптоволоконных зондов для сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии, люминесцентные и оптико-магнитные свойства NV-центров в кристаллах алмаза.

Выбор объекта и предмета исследования обусловлен перспективностью использования методов АСМ и СБОМ для нанодиагностики и локального анализа физико-химических свойств объектов биологического и небиологического происхождения.

Научная новизна

В диссертационной работе впервые:

1. Обнаружены изменения наноструктуры шероховатости поверхности эритроцитов человека, подвергшихся воздействию различных концентраций ионов цинка и свинца, а также лимфоцитов человека, подвергшихся воздействию различных концентраций ионов цинка. Выявлена зависимость параметров шероховатости поверхности эритроцитов от содержания внутриклеточного кальция.

2. Установлено, что корреляционная длина нормированной автокорреляционной функции профилей шероховатости эритроцитов и лимфоцитов является информативным статистическим параметром, позволяющим охарак-

теризовать степень металлиндуцированных изменений тонкой структуры поверхности клеток.

3. Показано, что эффективная реализация работы СБОМ в режиме прерывистого контакта (“tapping mode”) с использованием изогнутых оптоволоконных зондов возможна лишь при условии оптимизации их геометрических характеристик, в частности радиуса и угла изгиба, а также длины изогнутой части. Реализован двухрезонансный сенсор поверхности для режима “tapping mode” на основе изогнутого зонда с оптимизированными геометрическими параметрами, отличающийся повышенной добротностью, в том числе при работе в жидком окружении.

4. Экспериментально обнаружено, что зависимость интенсивности ИК фотолюминесценции ансамбля NV-центров в алмазе от магнитного поля в области слабых магнитных полей имеет выраженный неравномерный характер, который в значительной степени определяется мощностью и поляризацией возбуждающего фотолюминесценцию лазерного излучения.

Положения, выносимые на защиту

1. Методом атомно-силовой микроскопии с оптической регистрацией силы (изгиба кантилевера) установлено, что при воздействии миллимолярных концентраций ионов цинка на эритроциты и лимфоциты человека, а также микромолярных концентраций ионов свинца на эритроциты происходит изменение тонкой структуры шероховатости поверхности клеток: число шероховатостей на поверхности эритроцитов уменьшается при увеличении числа шероховатостей на поверхности лимфоцитов; увеличение концентрации внутриклеточного кальция в эритроцитах изменяет структуру цитоскелета и уменьшает латеральные и вертикальные размеры мембранных белковых кластеров.

2. Оптимизация геометрических параметров изогнутых оптоволоконных зондов для сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии (угла изгиба, радиуса изгиба, длины загнутой части) и способа их приклейки к камертону минимизирует латеральное силовое воздействие по отношению к исследуемым образцам в условиях прерывистого контакта и приводит к шестикратному увеличению добротности системы “кварцевый камертон-изогнутый зонд”.

3. Интенсивность фотолюминесценции ансамбля NV-центров в алмазе зависит от слабого магнитного поля резонансным образом: локальному увеличению интенсивности инфракрасного испускания соответствует локальное уменьшение интенсивности испускания в видимой области, причем амплитуда и форма экстремумов определяются мощностью и поляризацией лазерного излучения накачки.

Личный вклад соискателя ученой степени в результаты диссертации

Основные результаты диссертационной работы получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Научным руководителем д.ф.-м.н., чл.-корр. Д. С. Могилевцевым осуществлялось общее руководство, оказывалась методологическая помощь, проводилось обсуждение полученных результатов. К.ф.-м.н В. М. Ясинский участвовал в определении направления, цели и задач исследований, оказывал методическую помощь в постановке экспериментов и интерпретации их результатов. В совместных работах, результаты которых вошли в диссертацию, диагностика поверхностной структуры объектов исследования методом зондовой микроскопии и анализ полученных результатов выполнялись лично автором. Д.ф.-м.н., профессор, акад. С. Я. Килин, д.ф.-м.н. А. П. Низовцев, д.ф.-м.н. А. Я. Хайруллина, д.б.н., профессор, чл.-корр. Е. И. Слобожанина и к.ф.-м.н. С. К. Секацкий участвовали в обсуждении ключевых идей исследований и полученных результатов. Н. М. Козлова, Ю. М. Гармаза, В. А. Петрович, Е. И. Белевич осуществляли подготовку биологических образцов для исследования и проведение спектрофлуориметрических измерений. А. Смирнов и Е. Ростова участвовали в реализации и анализе результатов численных экспериментов, а также в исследовании характеристик изогнутых оптоволоконных зондов. Теоретические расчеты зависимости интенсивности флуоресценции, испускаемой ансамблем NV-центров, от действующего на него магнитного поля выполнены д.ф.-м.н. А. П. Низовцевым. Остальные соавторы принимали участие в решении отдельных вопросов и задач, не вошедших в диссертационную работу.

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты, полученные в ходе исследований по теме диссертации, докладывались на международных научных конференциях и семинарах: “Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии” (Минск, Беларусь, 2006, 2012, 2014, 2016); “Physics, Chemistry and Application of Nanostructures” (Минск, Беларусь, 2007, 2015); “ICONO/LAT” (Минск, Беларусь, 2007, 2016, Казань, Россия, 2010); “Laser Applications in Life Sciences (LALS)” (Москва, Россия, 2007); “International Symposium of the European Association for Red Cell Research” (Милан, Италия, 2007); “Лазерная физика и оптические технологии” (Минск, Беларусь, 2008, 2010); “Laser Optics” (Санкт-Петербург, Россия, 2008, 2010); “Сахаровские чтения 2008 года: экологические проблемы XXI века” (Минск, Беларусь, 2008); “Свиридовские чтения” (Минск, Беларусь, 2008); “Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем” (Минск, Беларусь, 2008, 2010,

2014); “Актуальные проблемы биофизической медицины” (Киев, Украина, 2009); “Полупроводниковые лазеры и системы на их основе” (Минск, Беларусь, 2009, 2011); “Nanostructures: Physics and Technology” (Минск, Беларусь, 2009, 2018, онлайн, 2020); “Россия – Беларусь – Сколково: единое инновационное пространство” (Минск, Беларусь, 2012); “Fundamental and Applied NanoElectroMagnetics” (Минск, Беларусь, 2012); “Наука, инновации, инвестиции” (Минск, Беларусь, 2013); “Молодежь в науке” (Минск, Беларусь, 2013, 2016); “Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии” (Владимир, Россия, 2014); “Современные проблемы физики” (Минск, Беларусь, 2014); “V Съезд биофизиков России” (Ростов-на-Дону, Россия, 2015); “Квантовая электроника” (Минск, Беларусь, 2015, 2019); “International Conference of Near-Field Optics, Nanophotonics and Related Techniques” (Хамамаци, Япония, 2016, Труа, Франция, 2018); “Annual meeting of Swiss Physical Society” (Лугано, Швейцария, 2016); “Joint annual meeting of Swiss and Austrian Physical Societies” (Женева, Швейцария, 2017); “Multinational Congress on Microscopy” (Ровинь, Хорватия, 2017); “International conference on quantum optics and quantum information” (Минск, Беларусь, 2017, 2019); “23rd international conference on non-contact atomic force microscopy” (Неймеген, Нидерланды, 2022).

Результаты, представленные в диссертации, использованы в учебном процессе и при выполнении научно-исследовательской работы в Гомельском государственном медицинском университете (акт внедрения представлен в приложении А к диссертации), получен патент на изобретение Республики Беларусь [61].

Опубликованность результатов диссертации

Результаты исследований по теме диссертации опубликованы в 61 научной работе, включая 14 статей в рецензируемых научных журналах (общим объемом 12,8 авторских листа), 23 публикации в сборниках научных трудов конференций, 23 публикации в сборниках тезисов докладов конференций, 1 патент на изобретение Республики Беларусь.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает в себя введение, общую характеристику работы, три главы, заключение, библиографический список и приложение.

Полный объем диссертации составляет 138 страниц, в том числе 57 рисунков, занимающих в совокупности 33 страницы, 2 таблицы, занимающие в совокупности 2 страницы, 1 приложение, занимающее в совокупности 2 страницы. Библиографический список включает 236 наименований и занимает 24 страницы.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Во **введении** приводится обоснование актуальности и значимости темы диссертации, излагается круг вопросов, которые требуют проведения исследования.

В **первой главе** представлены результаты использования методов АСМ и СБОМ в комплексе со спектральными методами для исследования изменений в наномасштабной (в пределах единиц–десятков нанометров) пространственной организации и структурно-функциональном состоянии клеток крови при воздействии на них ионов цинка и свинца, а также различных химических факторов, инициирующих запуск апоптоза. Основными объектами исследования являлись эритроциты и лимфоциты человека, а также изолированные мембраны (тени) эритроцитов.

Представлен краткий литературный обзор, отражающий известные мембранные механизмы токсического действия ионов цинка и свинца на состояние и функцию клеток крови. Приводится информация о методике химической фиксации образцов и их предварительной подготовке к исследованию методами СЗМ. Описаны основные приборы и методика обработки экспериментальных данных. Рассмотрены основные способы характеристики нанорельефа поверхности по данным АСМ-измерений. Отмечается, что для наиболее полного количественного описания свойств шероховатой поверхности целесообразно использовать не только высотные параметры шероховатости, такие как, например, средняя и модальная высота рельефа, асимметрия распределения высот, но и шаговые параметры, которые дают непосредственное представление о плотности поверхностного распределения неровностей. В качестве шагового параметра шероховатости предлагается использовать длину корреляции r_l нормированной автокорреляционной функции профиля шероховатости клеточной мембраны.

Показана возможность использования АСМ для визуализации изменений в тонкой структуре поверхности клеток, подвергшихся воздействию ионов цинка и свинца. Поверхность модифицированных свинцом и цинком эритроцитов отличалась более “грубой” грануляцией по сравнению с контрольными клетками (рисунок 1).

Произведена количественная оценка шероховатости поверхности эритроцитов и лимфоцитов с использованием различных статистических параметров. Установлено, что ионы цинка и свинца вызывали дозозависимое увеличение длины корреляции r_l в случае эритроцитов (рисунок 2, а-б) и дозозависимое снижение величины r_l в случае лимфоцитов (рисунок 2, в). Таким образом, длина корреляции r_l является информативным статистическим параметром, выступающим в качестве индикатора изменений в наноструктуре

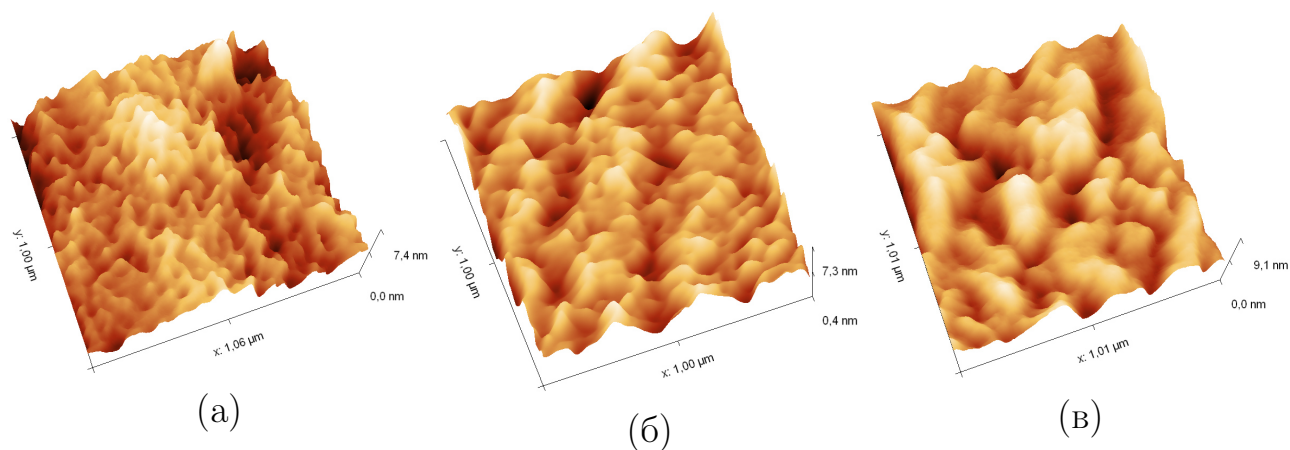


Рисунок 1 – Трехмерные АСМ-изображения тонкой структуры мембраны контрольного эритроцита (а) и эритроцитов, модифицированных 2 мМ сульфата цинка (б) и 5 мкМ ацетата свинца (в)

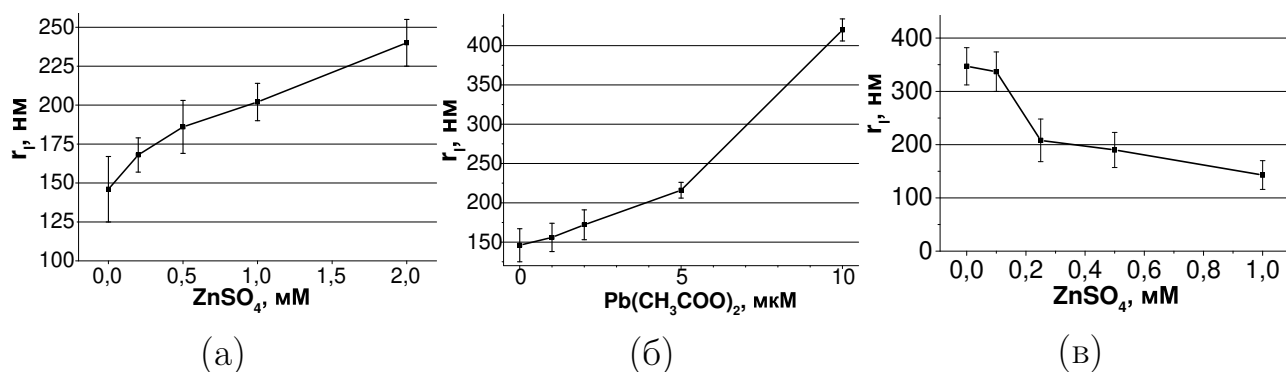


Рисунок 2 – Концентрационные зависимости длины корреляции r_l для эритроцитов, подвергшихся воздействию сульфата цинка (а) и ацетата свинца (б); для лимфоцитов, подвергшихся воздействию сульфата цинка (в)

поверхности клеток крови, сопровождающих развитие патологических состояний, связанных с воздействием тяжелых металлов.

АСМ-исследование поверхностной структуры изолированных мембран (теней) эритроцитов, модифицированных по холестерину, показало возможное участие холестерина в ответе мембраны на воздействие $ZnSO_4$.

Исследование физического состояния липидов и белков в мембранах эритроцитов с использованием флуоресцентных зондов показало, что при воздействии ионов цинка происходит увеличение микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов и уменьшение микровязкости липидного бислоя мембран лимфоцитов. Сопоставление экспериментальных данных, полученных методами АСМ и спектрофлуориметрии, показало, что наблюдается сильная статистически значимая положительная связь между шероховатостью поверхности эритроцитов, охарактеризованной длиной корреляции r_l ,

и интенсивностью флуоресценции флуорескамина, включенного в мембраны эритроцитов. При этом связь между интенсивностью флуоресценции флуорескамина и величиной параметра r_i для лимфоцитов также сильная, но отрицательная. Увеличение интенсивности флуоресценции флуорескамина, наблюдавшееся для обоих типов клеток, указывает на экспонирование фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны, что является одним из признаков апоптоза.

В этой связи дополнительно изучалась реакция эритроцитов на ряд неблагоприятных воздействий, способствующих активации механизма апоптоза (повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция, метаболическое истощение, образование церамидов).

Обнаружено, что в условиях повышенного уровня внутриклеточного кальция происходят изменения формы эритроцитов (деформация центральной области клетки, появление протрузий и выпуклостей на ее поверхности), а также нанорельефа клеточной мембраны. Известно, что нанометровые неоднородности рельефа клеточной поверхности можно соотнести с неровностями, обусловленными комплексами периферических и интегральных мембранных белков, выступающих над липидным бислоем, размеры которых не превышают 100 нм, а также с элементами цитоскелета клетки (с характерными размерами 100–250 нм). Для оценки вклада этих двух видов неровностей в наблюдаемые изменения клеточной поверхности эритроцитов осуществлялась предварительная Фурье-фильтрация АСМ-изображений в спектральных окнах, соответствующих пространственным периодам 20–100 и 100–250 нм. Установлено, что с увеличением концентрации свободных ионов кальция величина шероховатости, связанной со структурой цитоскелета, уменьшалась в периферической части эритроцита (на краю диска) и увеличивалась в центральной части (впадине). Для окна 20–100 нм было характерно уменьшение средней величины и периода шероховатости для всей поверхности эритроцита в целом. Полученные результаты указывают на то, что в процессе трансформации эритроцитов в условиях повышенной концентрации кальция происходит локальная перестройка цитоскелета клеточной мембраны, сопровождающаяся деагрегацией мембранных белковых кластеров.

Исследованы особенности реорганизации поверхности эритроцитов при метаболическом истощении клеток в среде, содержащей йодоацетат натрия, и в среде без глюкозы. Обнаружено, что истощение эритроцитов инкубацией в среде без глюкозы вызывало массовую трансформацию дискоцитов в эхиноциты, при этом для эхиноцитов наблюдалось существенное падение величины поверхностной шероховатости. Методом СБОМ показано, что распределение флуоресцентного аналога сфингомиелина (NBD-C6-сфингомиелина) в плазматической мембране дискоцитов и эхиноцитов не является гомогенным. Про-

ведена оценка изменений ультраструктуры поверхности эритроцитов после инкубации с церамидами. Показано, что по сравнению с контрольными эритроцитами для профилей шероховатости С2-церамид-инкубированных клеток был характерен существенный рост длины корреляции r_l , в то время как после инкубации эритроцитов с С6-церамидом статистически значимого изменения величины параметра r_l не наблюдалось.

Вторая глава посвящена исследованию и оптимизации характеристик сенсора поверхности на основе системы оптоволоконный зонд-кварцевый резонатор для прерывисто-контактного режима работы СБОМ.

В главе приведен краткий обзор литературы, посвященный основным особенностям латерально-силового (ЛС, англ. shear force) и прерывисто-контактного (ПК, англ. tapping mode) режимов работы СБОМ. Отмечается, что основным преимуществом режима ПК, согласно распространенным в литературе представлениям, является отсутствие колебаний зонда в горизонтальном (параллельном поверхности образца) направлении, что позволяет снизить разрушающее воздействие зонда на образец. Рассмотрены существующие типы оптоволоконных зондов для СБОМ, способы их изготовления, а также варианты сопряжения прямых и изогнутых оптоволоконных зондов с чувствительным элементом (кварцевым камертоном). Особое внимание уделено так называемой двухрезонансной конструкции камертонного сенсора, которая за счет точного совпадения между собственными частотами колебаний зонда и камертона обеспечивает существенное повышение добротности системы зонд-камертон. Показано, что для эффективной реализации режима ПК необходима адаптация двухрезонансной конструкции камертонного сенсора поверхности для работы с изогнутыми (кантилеверными) зондами, которая подразумевает предварительную оптимизацию геометрических характеристик зондов, а также способа их сопряжения с камертоном.

Для расчета параметров приклейки изогнутого зонда к камертону, обеспечивающих выполнение условия двойного резонанса, произведено численное моделирование формы колебаний зонда на первой, второй и третьей гармониках. Оказалось, что в общем случае для острия изогнутого зонда характерны не только вертикальные, но и радиальные колебания по отношению к образцу, причем амплитуда последних может быть весьма значительной. Результаты моделирования показали, что для минимизации колебаний зонда в горизонтальном направлении необходимо оптимизировать его геометрические параметры, в частности, радиус изгиба и длину загнутой части.

С учетом этих соображений была реализована технология изготовления изогнутых оптоволоконных зондов с оптимизированными геометрическими параметрами (рисунок 3, а). Для формирования острия зондов использовался метод травления в трубке. Изгиб происходил путем локального разогрева

кварцевого волокна вблизи острия до температуры плавления с помощью CO_2 -лазера.

На основе изготовленных зондов реализован двухрезонансный камертонный сенсор поверхности для режима ПК (рисунок 3, б), добротность которого в несколько раз превышала добротность известных из литературы аналогов (рисунок 3, в). С помощью сенсора получены топографические и оптические изображения различных калибровочных структур.

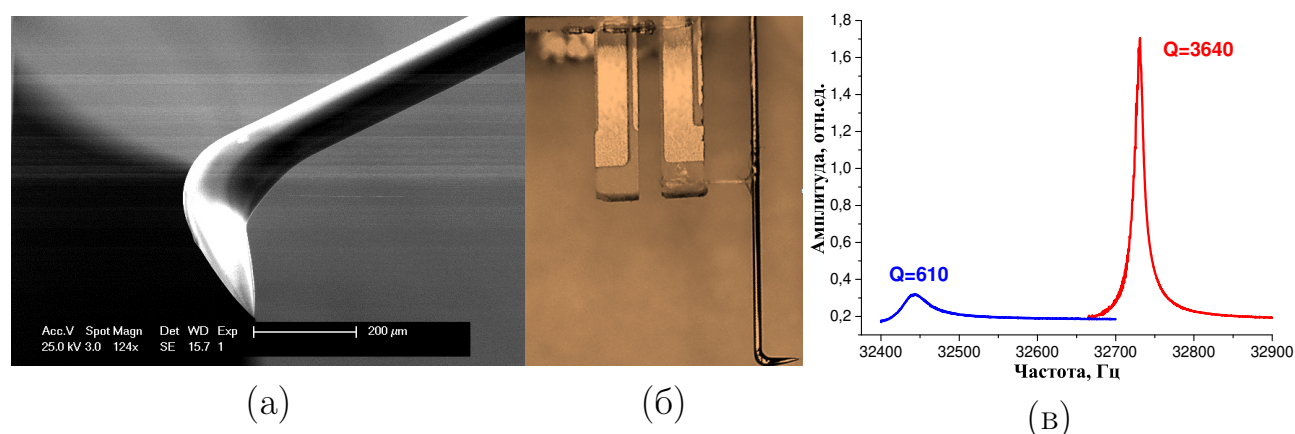


Рисунок 3 – Изображение металлизированного изогнутого зонда, полученное методом электронной микроскопии (а), способ приклейки зонда к кварцевому камертону (б), амплитудно-частотная характеристика камертонного сенсора с изогнутым зондом, приклеенным в стандартной (синий цвет) и двухрезонансной (красный цвет) конфигурации (в)

Исследовано поведение добротности и резонансной частоты системы зонд-камертон в жидком окружении при использовании оптоволоконных зондов прямого и изогнутого типа. Установлены различия в характере изменения добротности для разных типов зондов в зависимости от глубины погружения. Сделан вывод о большей чувствительности сенсора поверхности на базе изогнутого зонда при работе в жидкости на глубине до 500 мкм.

В **третьей главе** приведены результаты исследования люминесцентных свойств NV-центров в различных алмазных образцах, в том числе в присутствии внешнего магнитного поля, с целью создания на их основе оптоволоконных сенсорных систем.

В кратком обзоре литературы описаны основные физические свойства NV-центров в алмазе, представлены различные подходы к организации протоколов магнитометрии на основе одиночных NV-центров и их ансамблей. Описаны исследуемые образцы нано- и микрокристаллических алмазов. Методами СБОМ и оптической спектроскопии исследованы их люминесцентные свойства. Получены экспериментальные зависимости интенсивности люминесценции ансамбля NV-центров в различных образцах алмаза от напряжен-

ности магнитного поля при наблюдении люминесценции в видимом и инфракрасном (ИК) диапазонах. Характерными особенностями зависимостей являются их противофазный характер и наличие ярко выраженных нелинейностей (резонансов) в области нулевого магнитного поля, ширина которых от пика до пика в обоих случаях составляла около 10 Гс (рисунок 4).

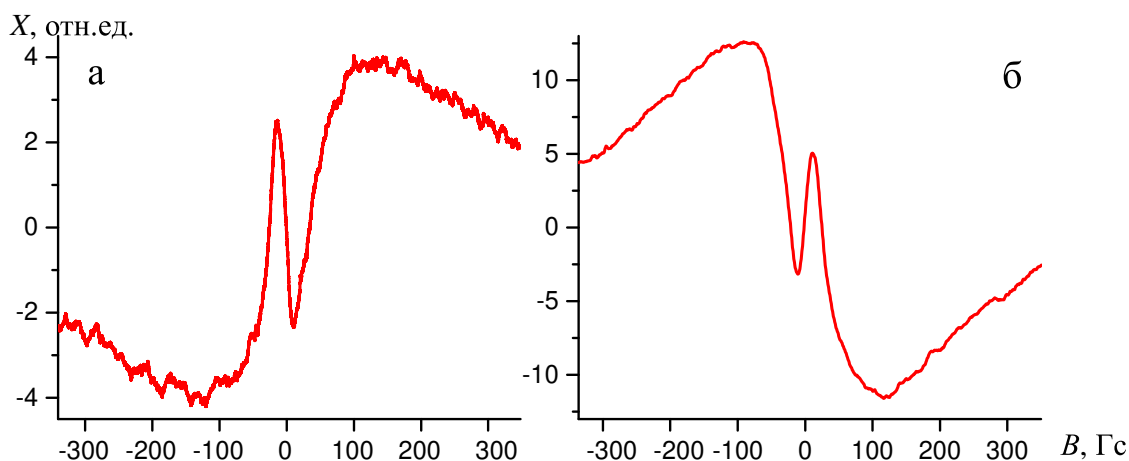


Рисунок 4 – Зависимость выходного сигнала синхронного усилителя X от величины магнитного поля B для ИК (а) и видимой области спектра (б)

Изучено влияние мощности и поляризации возбуждающего лазерного излучения, а также концентрации NV- и P1-центров на величину и форму обнаруженных резонансов. Установлено, что, когда направление колебаний вектора напряженности электрического поля в лазерном луче перпендикулярно направлению магнитного поля, помимо основного резонанса в области нулевого магнитного поля возникает дополнительный, более узкий резонанс, имеющий ширину порядка 2 Гс.

Продемонстрировано, что результаты численного моделирования зависимостей видимой и ИК люминесценции, испускаемой ансамблем NV-центров, от приложенного магнитного поля при феноменологическом учете кросс-релаксации NV-центров между собой адекватно описывают детали соответствующих экспериментальных зависимостей.

Показана возможность функционализации СБОМ-зонда нанокристаллом алмаза без предварительной химической обработки зонда и образца. Функционализация осуществлялась путем захвата нанокристалла острием зонда в процессе сканирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

В диссертации получены следующие научные результаты:

1. С помощью метода сканирующей зондовой микроскопии обнаружены различия в нанорельефе поверхности контрольных эритроцитов и эритроцитов, подвергшихся воздействию ионов токсичных металлов (цинка и свинца), а также химических агентов, инициирующих программированную гибель клетки (апоптоз). Произведена количественная оценка шероховатости поверхности контрольных и модифицированных клеток. Обнаружено концентрационно-зависимое увеличение средней длины корреляции автокорреляционной функции профилей шероховатости эритроцитов, модифицированных ионами цинка и свинца, по сравнению с контрольными клетками, которое связано со сглаживанием шероховатости поверхности металл-модифицированных эритроцитов. Выявлена зависимость параметров шероховатости поверхности эритроцитов от содержания внутриклеточного кальция, позволяющая сделать вывод о перестройке мембранного цитоскелета и деагрегации белковой компоненты липидного бислоя. Обнаружено сглаживание нанорельефа поверхности мембран метаболически истощенных эритроцитов. Установлено, что обработка эритроцитов 50 мкМ С6-церамида не приводит к существенному изменению нанорельефа поверхности в сравнении с контрольными образцами, в то время как обработка 50 мкМ С2-церамида приводит к уменьшению числа шероховатостей на поверхности мембраны [1–5, 7, 8, 14–16, 20–24, 27–30, 38, 39, 42, 43, 45–47, 49, 61].

2. Показано, что воздействие миллимолярных концентраций ионов цинка приводит к уменьшению латеральных размеров неоднородностей на поверхности лимфоцитов, при этом средняя длина корреляции профилей шероховатости лимфоцитов уменьшается [6, 44, 46].

3. Исследованы изменения наноструктуры поверхности изолированных мембран (теней) эритроцитов, подвергнутых воздействию ионов цинка, а также агентов, модифицирующих холестерин. Показано участие холестерина в Zn-индуцированных изменениях поверхностной структуры теней эритроцитов. Обнаружена взаимосвязь между шероховатостью поверхности эритроцитов и лимфоцитов, подвергнутых воздействию ионов цинка, и интенсивностью флуоресценции флуорескамина, встроенного в клеточные мембраны. Выявлены области локализации NBD-С6-сфингомиелина в эритроцитарной мембране [1, 5, 6, 19, 30, 40].

4. Разработан технологический процесс изготовления оптоволоконных зондов для СБОМ, который состоит из операции формирования острозаточенного острия на торце оптического волокна и операции нанесения на конус

острия пленки алюминия таким образом, чтобы на вершине острия образовалась субволновая апертура. Исследованы основные характеристики изготовленных ОЗ и продемонстрирована их работоспособность в различных режимах работы СБОМ [9, 10, 17, 18, 31, 33, 36, 41, 52, 55, 56, 60].

5. На основании численного моделирования изгибных колебаний прямых и изогнутых ОЗ обнаружено, что эффективная реализация режима прерывистого контакта СБОМ возможна лишь при использовании изогнутых ОЗ определенной геометрии. Установлены оптимальные геометрические параметры зондов (угол изгиба, радиус изгиба, длина загнутого и прямого сегментов оптоволоконна), позволяющие минимизировать латеральное силовое воздействие по отношению к исследуемым образцам. Определена оптимальная конфигурация соединения оптимизированных зондов с камертоном [10, 51, 53, 54, 57, 58].

6. Разработана экспериментальная установка для изготовления изогнутых оптоволоконных зондов с оптимизированными геометрическими параметрами путем нагрева поверхности оптоволоконна излучением CO_2 -лазера. Изготовлен высокодобротный сенсор поверхности для режима прерывистого контакта, состоящий из кварцевого камертона и приклеенного к нему изогнутого зонда. Приклейка осуществлялась таким образом, чтобы резонансная частота второй (одноузловой) моды собственных колебаний зонда совпадала с резонансной частотой камертона (условие двойного резонанса). Сравнительный анализ поведения добротности и резонансной частоты системы зонд-камертон для оптоволоконных зондов прямого и изогнутого типа свидетельствует о большей чувствительности сенсора поверхности на базе изогнутого зонда при работе в жидком окружении [10, 32, 34, 50, 51, 54, 58].

7. Исследованы люминесцентные свойства NV-центров в различных образцах алмаза. Получены экспериментальные зависимости интенсивности люминесценции ансамбля NV-центров от напряженности магнитного поля при наблюдении люминесценции в видимом и ИК диапазонах. Обнаружено, что характерными особенностями зависимостей являются их противофазный характер и наличие ярко выраженных нелинейностей (резонансов) в области нулевого магнитного поля, ширина которых от пика до пика составляла около 10 Гс. Показано, что мощность и поляризация возбуждающего лазерного излучения, а также концентрация NV-центров в алмазном образце оказывают влияние на величину и форму обнаруженных резонансов. Установлено, что при взаимно перпендикулярной ориентации направления электрического вектора в лазерном луче и магнитного поля помимо основного резонанса возникает дополнительный, более узкий резонанс, имеющий ширину порядка 2 Гс. Продемонстрировано, что результаты численного моделирования зависимостей интенсивностей видимой и ИК люминесценции, испускаемой ансам-

блем NV-центров, от приложенного магнитного поля при феноменологическом учете кросс-релаксации NV-центров между собой адекватно описывают детали соответствующих экспериментальных зависимостей. Продемонстрирована возможность функционализации зонда СБОМ нанокристаллом алмаза с NV-центрами [11–13, 25, 26, 35–37, 48, 59].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Выявленные с помощью метода АСМ концентрационные зависимости средней корреляционной длины нормированной автокорреляционной функции профилей шероховатости поверхности эритроцитов человека, подвергшихся воздействию ионов цинка и свинца, использованы для разработки способа оценки степени воздействия вышеуказанных металлов на мембрану эритроцитов человека, который внедрен в учебный процесс и используется при проведении научно-исследовательской работы на кафедре медицинской и биологической физики Гомельского государственного медицинского университета (акт внедрения представлен в приложении А к диссертации). Новизна предложенного способа подтверждается полученным патентом на изобретение ВУ № 13764 от 30.07.2010.

Полученные данные об изменениях параметров шероховатости клеток крови человека, сопровождающих развитие патологических состояний, связанных с воздействием тяжелых металлов, могут быть использованы в клинической практике для улучшения диагностики и ранней профилактики сопутствующих заболеваний.

Оптоволоконные зонды прямого и изогнутого типа для СБОМ изготавливаются в Институте физики НАН Беларуси и используются для проведения исследований методом СБОМ. Поставка коммерческих партий зондов реализована в рамках контрактов №903 от 21.11.2012 и №386 от 10.06.2015, заключенных между Институтом физики НАН Беларуси и лабораторией физики живой материи Высшей Федеральной Политехнической Школы г. Лозанна, Швейцария (EPFL). Изготовленные зонды использовались также для исследований в Королевском технологическом институте г. Стокгольм, Швеция (КТН).

На основе обнаруженного эффекта резонансного поведения интенсивности ИК-люминесценции ансамбля NV-центров в области слабых магнитных полей возможно создание нового полностью оптического (без использования СВЧ поля) способа магнитометрии, имеющего ряд конструктивных и эксплуатационных преимуществ (невысокая стоимость, надежность, долговечность, малые габариты, масса и энергопотребление).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Исследование оптических и наноструктурных металлоиндуцированных измерений эритроцитарных мембран методами рассеяния и атомно-силовой микроскопии / А. Я. Хайруллина, Т. В. Ольшанская, Д. С. Филимоненко, В. М. Ясинский, Е. И. Слобожанина, Н. М. Козлова // Оптика и спектроскопия. — 2008. — Т. 105, № 1. — С. 168–175.

2. Ранняя диагностика воздействий микромолярных концентраций ионов свинца по тонкой структуре мембраны эритроцита методом зондовой микроскопии / А. Я. Хайруллина, Е. И. Слобожанина, Д. С. Филимоненко, В. М. Ясинский, Н. М. Козлова // Микроэлементы в медицине. — 2008. — Т. 9, № 12. — С. 41–42.

3. Корреляция между оптическими, структурными и сенсорными свойствами наноструктур из оксида никеля на подложках из оксида алюминия / А. Я. Хайруллина, Т. В. Ольшанская, О. Н. Куданович, Д. С. Филимоненко // Журнал прикладной спектроскопии. — 2010. — Т. 77, № 5. — С. 760–767.

4. Laser induced response on gas impact upon nickel oxide films doped with oxidized silver nanoparticles / A. Ya. Khairullina, T. V. Olshanskaya, A. M. Kudanovich, D. S. Filimonenko, T. N. Vorobyova, A. V. Kobets, I. N. Parchomenko // Proceedings of SPIE. — 2011. — Vol. 7994. — P. 79941H-1–79941H-7.

5. Оптические, наноструктурные и биофизические свойства Zn-индуцированных изменений мембран эритроцитов человека / А. Я. Хайруллина, Т. В. Ольшанская, Д. С. Филимоненко, Н. М. Козлова, Ю. М. Гармаза, Е. И. Слобожанина // Оптика и спектроскопия. — 2011. — Т. 110, № 4. — С. 574–580.

6. Исследование цинк-индуцированных изменений мембран лимфоцитов методами атомно-силовой микроскопии, люминесценции и рассеяния света / Д. С. Филимоненко, А. Я. Хайруллина, В. М. Ясинский, Н. М. Козлова, Г. П. Зубрицкая, Е. И. Слобожанина // Журнал прикладной спектроскопии. — 2011. — Т. 78, № 3. — С. 419–426.

7. Оптическая диагностика физико химических свойств наноконпозигов NiO/Al₂O₃ при воздействии различных газов и нагревании / А. Я. Хайруллина, И. Н. Пархоменко, О. Н. Куданович, Д. С. Филимоненко // Оптика и спектроскопия. — 2012. — Т. 112, № 5. — С. 776–782.

8. Филимоненко Д. С., Белевич Е. И., Петрович В. А. Изменение тонкой структуры поверхности мембран эритроцитов человека в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция // Молодежь в науке – 2013: прилож. к журналу «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». В 5 ч. Ч. 4. – 2014. – С. 166–170.

9. Filimonenko D. S., Yasinskii V. M. Application of scanning near-field optical microscopy for the characterization of optical elements // Журнал прикладной спектроскопии. – 2016. – Т. 83, № 6-16. – С. 99–100.

10. True tapping mode Scanning Near-Field Optical Microscopy with bent glass fiber probes / A. Smirnov, V. M. Yasinskii, D. S. Filimonenko, E. Rostova, G. Dietler, S. K. Sekatskii // Scanning. – 2018. – Vol. 2018. – P. 3249189(1–9).

11. Weak magnetic field resonance effects in diamond with nitrogen-vacancy centers / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, A. P. Nizovtsev, S. Ya. Kilin // Semiconductors. – 2018. – Vol. 52, № 14. – P. 1865–1867.

12. Weak magnetic field effects on the photoluminescence of an ensemble of NV centers in diamond: experiment and modelling / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, A. P. Nizovtsev, S. Ya. Kilin, F. Jelezko // Semiconductors. – 2020. – Vol. 54. – P. 1730–1733.

13. Проявления в ИК-люминесценции процессов кросс-релаксации NV-центров в слабых магнитных полях / Д. С. Филимоненко, В. М. Ясинский, А. П. Низовцев, С. Я. Килин, Ф. Железко // Журнал прикладной спектроскопии. – 2021. – Т. 88, № 6. – С. 858–871.

14. Hysteresis and stochastic fluorescence by aggregated ensembles of graphene quantum dots / N. Belko, L. Golubewa, V. Chizhevsky, S. Karuseichyk, D. Filimonenko, M. Jankunec, H. Rehman, T. Kulahava, P. Kuzhir, D. Mogilevtsev // The Journal of Physical Chemistry C. – 2022. – Vol. 126, № 25. – P. 10469–10477.

Статьи в сборниках научных трудов конференций:

15. Исследование Zn-индуцированных изменений в эритроцитарных мембранах методом атомно-силовой микроскопии / Е. И. Слобожанина, Н. М. Козлова, В. М. Ясинский, Д. С. Филимоненко, А. Я. Хайруллина // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии, VII Международный семинар: Сборник докладов: Минск, 1–3 ноября 2006 г. / Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси; ред.: С. А. Чижик. – Минск, 2006. – С. 158–161.

16. Nanotopography of erythrocyte membrane under the action of metallic compounds / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, N. M. Kozlova,

E. I. Slobozhanina, A. Y. Khairullina // *Physics, Chemistry and Application of Nanostructures: Proceedings of the International Conference Nanomeeting-2007*, Minsk, Belarus, 22–25 May, 2007. / Ed. By: V. E. Borisenko [et al.]— Singapore, 2007. — P. 528–530.

17. Кокиц А. Н., Филимоненко Д. С., Ясинский В. М. Исследование формирования наноструктур под воздействием пространственно-модулированного лазерного излучения на поверхности тонкой плёнки золота // 7-я международная научная конференция «Лазерная физика и оптические технологии»: Сб. науч. тр. конф. В 3 томах / Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси; ред.: Н. С. Казак [и др.]. — Минск, 2008. — Т. 1.— С. 268–272.

18. Филимоненко Д. С., Кокиц А. Н., Ясинский В. М. Исследование периодически наноструктурированных тонких пленок золота методом зондовой микроскопии // Свиридовские чтения: сб. ст. Вып. 4 / БГУ; редкол.: Т. Н. Воробьева [и др.]. — Минск, 2008. — С. 32–38.

19. Модификация холестерина в мембранах эритроцитов: визуализация микроструктуры с помощью атомно-силовой микроскопии / Е. И. Слобожанина, Н. М. Козлова, Ю. М. Гармаза, Д. С. Филимоненко, А. Я. Хайруллина, В. М. Ясинский // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; 8-й съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 25-27 июня 2008 г, Минск: сб. ст. в 2 ч., Ч 1 / БГУ; редкол.: И. Д. Вологовский [и др.]. — Минск, 2008. — С. 268–271.

20. The peculiarity of nanotopography and AFM-based estimation parameters of lead and zinc toxic action on erythrocyte membrane / D. S. Filimonenko, A. Ya. Khairullina, V. M. Yasinskii, E. I. Slobozhanina, N. M. Kozlova // *Proceedings of 17th Int. Symp. “Nanostructures: Physics and Technology”* Minsk, Belarus, June 22-27, 2009. / Ioffe Physical-Technical Institute — Minsk, 2009. — P. 228–229.

21. Composites based on nanostructured oxides and noble metals: optical and sensor properties / A. Ya. Khairullina, T. V. Olshanskaya, A. M. Kudanovich, T. N. Vorobyova, O. N. Vrublevskaya, D. S. Filimonenko // *Proceedings of 17th Int. Symp. “Nanostructures: Physics and Technology”* Minsk, Belarus, June 22-27, 2009. / Ioffe Physical-Technical Institute — Minsk, 2009. — P. 338–339.

22. Оптика наноструктурированных оксидов металлов в красной и инфракрасной области спектра: результаты и перспективы использования / А. Я. Хайруллина, Т. В. Ольшанская, О. Н. Куданович, Т. Н. Воробьева, О. Н. Врублевская, А. В. Кобец, Д. С. Филимоненко // Сб. статей 7-го Белорусско-Российского семинара «Полупроводниковые лазеры и системы на их основе», Минск, 1–5 июня 2009 г. / Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси; ред.: В. З. Зубелевич [и др.]. — Минск, 2009. — С. 213–216.

23. Хайруллина А. Я., Ольшанская Т. В., Филимоненко Д. С. Информационные возможности методов светорассеяния в изучении токсического действия цинка на мембраны эритроцитов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; 9-й съезд Белорус. Обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 23-25 июня 2010 г, Минск: сб. ст. в 2 ч., Ч 1 / Изд. центр БГУ; редкол.: И. Д. Волотовский [и др.]. — Минск, 2010. — С. 349–351.

24. Оптическая диагностика физико химических свойств наноконпози- тов NiO/Al₂O₃ при различных воздействиях / А. Я. Хайруллина, И. Н. Пархоменко, О. Н. Куданович, Д. С. Филимоненко // Сб. статей 8-го Белорусско-Российского семинара «Полупроводниковые лазеры и системы на их основе», Минск, 17–20 мая 2011 г. / Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси; ред.: В. З. Зубелевич [и др.]. — Минск, 2011. — С. 154–157.

25. Scanning near-field optical microscopy of the luminescence of the N–V centers in nanodiamond / D. S. Filimonenko, D. I. Pustakhod, V. N. Chizhevsky, V. M. Yasinskii // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии: сборник докладов X-й междунар. конф., Минск, 13-16 ноября 2012 г. / Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси; ред.: С. А. Чижик [и др.]. — Минск: Беларус. навука, 2012. — С. 309–314.

26. Филимоненко Д. С., Ясинский В. М. Функциональные зонды для сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии // Материалы Белорусско-Латвийского Форума «Наука, инновации, инвестиции», 25-27 сентября 2013 г, Минск / БНТУ — Минск, 2013. — С. 18–19.

27. Филимоненко Д. С., Белевич Е. И., Петрович В. А. Изменение тонкой структуры поверхности мембран эритроцитов человека в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция // Молодежь в науке – 2013 [Электронный ресурс]: материалы Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 19–22 ноября 2013 г. / НАН Беларуси. — Минск, 2013. — С. 289–293. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

28. Петрович В. А., Филимоненко Д. С., Белевич Е. И. Влияние метаболического истощения на состояние мембран эритроцитов человека // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; 11-й съезд Белорус. Обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 17-20 июня 2014 г, Минск: сб. ст. в 2 ч., Ч 1 / Изд. центр БГУ; редкол.: И. Д. Волотовский [и др.]. — Минск, 2014. — С. 214–217.

29. Филимоненко Д. С., Петрович В. А., Белевич Е. И. Применение метода АСМ для исследования реорганизации поверхности эритроцитарных мембран // Современные проблемы физики: международная школа-конференция молодых ученых и специалистов, Минск, 11-13 июня 2014: сбор-

ник научных трудов / Институт физики имени Б. И. Степанова; ред.: В. В. Машко [и др.]. — Минск, 2014. — С. 108–112.

30. Филимоненко Д. С., Петрович В. А., Белевич Е. И. Исследование наноструктуры поверхности эритроцитов методом зондовой микроскопии // Труды 11-й международной научной конференции «ФРЭМЭ-2014», Владимир, 1-3 июля 2014 г.: Книга 1 / под общ. ред. Л. Т. Сушковой. — Владимир, 2014. — С. 39–42.

31. SNOM visualisation of light-triggered switching in photochromic materials / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, G. T. Vasilyuk, S. A. Maskevich, A. E. German, V. F. Oskirko, B. S. Lukyanov, V. I. Minkin // Physics, Chemistry and Application of Nanostructures: Proceedings of the International Conference Nanomeeting-2015, Minsk, Belarus, 26 – 29 May 2015. / Ed. By: V. E. Borisenko [et al.] — Minsk, 2015. — P. 80–84.

32. Смирнов А. Г., Филимоненко Д. С., Ясинский В. М. Лазерные технологии при изготовлении оптоволоконных элементов // Квантовая электроника: материалы 10-й Международной научно-технической конференции, Минск, 9 – 13 ноября 2015 г. / редкол.: М. М. Кугейко [и др.]. — Минск, 2015. — С. 135–136.

33. Filimonenko D. S., Yasinskii V. M. Application of scanning near-field optical microscopy for the characterization of optical elements // [Электронный ресурс]: ICONO/LAT 2016 Technical Digest, Nanophotonics and Plasmonics. / National Academy of Sciences, Belarus. — Minsk, 2016. — P. 85–86. — 1 твердотельный накопитель (флэш).

34. Исследование резонансных свойств системы оптоволоконный зонд–кварцевый камертон в жидкости для режимов shear force и tapping mode / Д. С. Филимоненко, В. М. Ясинский, А. Смирнов, Е. Ростова, С. Секацкий // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии: сборник докладов X-й междунар. конф., Минск, 18-21 октября 2016 г. / НАН Беларуси, Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова; ред.: С. А. Чижик [и др.]. — Минск: Беларус. навука, 2016. — С. 49–53.

35. Weak magnetic field resonance effects in diamond with nitrogen-vacancy centers / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, A. P. Nizovtsev, S. Ya. Kilin // Proceedings of 26th Int. Symp. “Nanostructures: Physics and Technology” Minsk, Belarus, June 18-22, 2018. / Saint Petersburg Academic University — Saint Petersburg, 2018. — P. 239–240.

36. Филимоненко Д. С., Ясинский В. М. Методика исследования оптоволоконных фокусирующих элементов с целью выбора и оптимизации их параметров // Квантовая электроника: материалы 12-й Международной научно-технической конференции, Минск, 18-22 ноября 2019 г. / редкол.: М. М. Кугейко [и др.]. — Минск, 2019. — С. 169–170.

37. Weak magnetic field effects on the photoluminescence of an ensemble of NV centers in diamond: experiment and modelling / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, A. P. Nizovtsev, S. Ya. Kilin, F. Jelezko // Proceedings of 28th Int. Symp. “Nanostructures: Physics and Technology” Minsk, Belarus, September, 2020. / Ioffe Institute — Saint Petersburg, 2020. — P. 178–179.

Тезисы докладов:

38. Optical and structural properties of erythrocytic membrane under action of toxic metals / A. Ya. Khairullina, T. V. Olshanskaya, V. M. Yasinskii, D. S. Filimonenko, E. I. Slobozhanina, N. M. Kozlova // [Электронный ресурс]: ICONO/LAT 2007 Technical Digest, session L06. / National Academy of Sciences, Belarus. — Minsk, 2007. — P. 21. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

39. Optical and structural properties of erythrocytic membrane under action of zinc ions / A. Ya. Khairullina, T. V. Olshanskaya, V. M. Yasinskii, D. S. Filimonenko, E. I. Slobozhanina, N. M. Kozlova // [Электронный ресурс]: Technical Digest of the 9th International Conference on Laser Applications in Life Sciences (Moscow, Russia, 2007), session L07. / M. V. Lomonosov Moscow State University, Russia. — Moscow, 2007. — P. 11. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

40. The features of two-spectrum scanning near-field optical microscope images of erythrocytes under different physicochemical actions / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, N. M. Kozlova, E. I. Slobozhanina, A. Ya. Khairullina, A. N. Kokits // XIII International Conference “Laser Optics-2008”, Saint Petersburg, June 23–28, 2008: Technical program. — Saint Petersburg: 2008. — P. 77.

41. Filimonenko D. S., Kokits A. N., Yasinskii V. M. Research on periodically nanostructured gold thin films with probe microscopy method // Sviridov Readings 2008: 4-th Intern. Conf. on Chemistry and Chemical Education, Minsk, Belarus, 8–10 April, 2008: Book of Abstracts / Belarusian State University; ed.: T. N. Vorobyova [et al.]. — Minsk:Krasiko-Print, 2008. — P. 18.

42. Study of nanostructural Zn-induced changes in erythrocyte membranes by atomic force microscopy / N. Kozlova, A. Khairullina, V. Yasinskii, D. Filimonenko, Y. Harmaza, E. Slobozhanina // 17th Intern. Symp. of the European Association for Red Cell Research, EARCR 2009. Triuggio (Milano, Italy), April 23–27: Final program and abstracts. — Milano, 2009. — P. 64.

43. Нанотопография эритроцитарных мембран, подвергнутых воздействию металлосодержащих соединений / Д. С. Филимоненко, А. Я. Хайруллина, В. М. Ясинский, Н. М. Козлова, Е. И. Слобожанина // Материалы 8-й

международной научной конференции «Сахаровские чтения 2008 года»: экологические проблемы XXI века», 22–23 мая 2008 г., Минск, Беларусь / МГЭУ им. А. Д. Сахарова; ред.: С. П. Кундас [и др.]. — Минск, 2008. — С. 109.

44. Научные и практические перспективы изучения воздействия металлов на наноструктуру мембран эритроцитов / А. Я. Хайруллина, Е. И. Слобожанина, Д. С. Филимоненко, Н. М. Козлова, В. М. Ясинский // Материалы 6-го международного симпозиума «Актуальные проблемы биофизической медицины» 14–17 мая 2009 года, Украина, Киев / Отв. ред.: В. А. Березовский. — Киев, 2009. — С. 109–110.

45. Peculiarities of zink induced changes in the structure and functional state of lymphocyte membrane revealed by fluorescent markers and atomic force microscopy / D. S. Filimonenko, A. Y. Khairullina, E. I. Slobozhanina, N. M. Kozlova, V. M. Yasinskii // 14 International Conference “Laser Optics-2010”, Saint Petersburg, June 28 – July 2, 2010: Technical program. — Saint Petersburg: 2010. — P. 33.

46. Correlation between metal-protein aggregation on erythrocyte membrane surface and polarisation properties of laser radiation scattering / A. Y. Khairullina, T. V. Olshanskaya, E. I. Slobozhanina, N. M. Kozlova, D. S. Filimonenko // 14 International Conference “Laser Optics-2010”, Saint Petersburg, June 28 – July 2, 2010: Technical program. — Saint Petersburg: 2010. — P. 82.

47. Металл-индуцированные изменения структуры мембран клеток крови человека / Д. С. Филимоненко, В. М. Ясинский, А. Я. Хайруллина, Н. М. Козлова, Ю. М. Гармаза, Е. И. Слобожанина // Россия – Беларусь – Сколково: единое инновационное пространство: тезисы Междунар. науч. конф. (Минск, 19 сент. 2012 г.) / Нац. акад. наук Беларуси; редкол.: С. Я. Килин [и др.]. — Минск: Беларус навука, 2012. — С. 161–162.

48. Filimonenko D., Pustakhod D., Yasinskii V. Functionalized SNOM-probes with nanodiamond crystals hosting nitrogen-vacancy color-centers // Fundamental and Applied NanoElectroMagnetics. FANEM-2012: Conference proceedings, May 22–25, 2012, Belarusian State University, Minsk, Belarus. — Minsk: BSU, 2012 — P. 17.

49. Изменение микрорельефа поверхности мембраны эритроцитов, модифицированных церамидами / Д. С. Филимоненко, В. А. Петрович, Е. И. Белевич, Н. М. Козлова, Е. И. Слобожанина // V Съезд биофизиков России. Материалы докладов: в 2 т. — Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2015. — Т. 1. — С. 219.

50. Smirnov A. G., Filimonenko D. S., Yasinskii V. M. Manufacture of fiber optic elements using CO₂ laser installation // XIV International Conference on

Quantum Optics and Quantum Information: Programme and book of abstracts, Minsk, October 27–30, 2015, — Minsk, 2015. — P. 44.

51. Tapping mode SNOM based on properly bended and attached to quartz tuning fork glass fiber-made probes / A. Smirnov, V. M. Yasinskii, D. S. Filimonenko, E. Rostova, G. Dietler, S. K. Sekatskii // Abstracts of The 14th International Conference of Near-Field Optics, Nanophotonics and Related Techniques (NFO-14), September 4-8, 2016, Hamamatsu, Japan. — Hamamatsu, 2016. — P. Tu-9P-70.

52. Филимоненко Д. С. Применение методов ближнеполевой оптической микроскопии для характеристики оптических элементов // XIII Международная научная конференция молодых ученых “Молодежь в науке – 2016”: Материалы — Минск, 2016. — С. 278.

53. Tapping Mode SNOM based on properly bended and attached to quartz tuning fork glass fiber-made probes / A. Smirnov, E. Rostova, S. Sekatskii, G. Dietler, V. Yasinskii, D. Filimonenko // Program and Abstracts of the Annual meeting of the Swiss Physical Society, 23–25 August 2016, Lugano. — Lugano, 2016. — P. 83.

54. True tapping mode Scanning Near-Field Optical Microscopy with bent glass fiber-made probes / A. Smirnov, V. M. Yasinskii, D. S. Filimonenko, E. Rostova, G. Dietler, S. K. Sekatskii // 13th Multinational Congress on Microscopy September 24-29, 2017 in Rovinj, Croatia, BOOK OF ABSTRACTS — Rovinj, 2017. — P. 86.

55. SNOM imaging of the quantum dots luminescence and reversible photoswitching of photochromic materials / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, V. F. Askirka, N. D. Strekal, G. T. Vasilyuk, S. A. Maskevich, A. O. Ayt, V. A. Barachevsky // XV International Conference on Quantum Optics and Quantum Information: Programme and book of abstracts, Minsk, November 20–23, 2017. — Minsk, 2017. — P. 10.

56. Formation of the hot spots by CdSe/ZnS nanocrystals and metal nanoparticles and their detection by near-field optical microscopy and far-field fluorescence / V. F. Askirka, I. G. Motevich, I. F. Sveklo, D. S. Filimonenko, S. A. Maskevich, N. D. Strekal // XV International Conference on Quantum Optics and Quantum Information: Programme and book of abstracts, Minsk, November 20–23, 2017. — Minsk, 2017. — P. 80–81.

57. True tapping mode Scanning Near-Field Optical Microscopy with bent glass fiber-made probes / A. Smirnov, V. Yasinskii, D. Filimonenko, E. Rostova, G. Dietler, S. K. Sekatskii // Program and Abstracts of the Joint annual meeting of Swiss and Austrian Physical Societies, 21 - 25 August 2017, CERN, Geneve. — Geneve, 2017. — P. 127.

58. Novel type SNOM probes: truly tapping mode probes, and long-lived probes made from plastic optical fiber / A. Smirnov, V. M. Yasinskii, D. S. Filimonenko, G. Dietler, S. K. Sekatskii // Abstracts of 15th international conference of Near-field Optics and Nanophotonics (NFO-15), Troyes, France, August 26–31 2018. — Troyes, 2018. — P. P12A10.

59. Weak magnetic field resonances in magnetic field dependent luminescence spectra of the ensemble of NV centers in diamond / D. S. Filimonenko, V. M. Yasinskii, A. P. Nizovtsev, S. Ya. Kilin // XVI International Conference on Quantum Optics and Quantum Information: Programme and book of abstracts, Minsk, May 13–17, 2019. — Minsk, 2019. — P. 45–46.

60. Sekatskii S. K., Filimonenko D. S. High spatial resolution PhotoThermal Induced Resonance imaging in visible spectral range based on Scanning Near-field Optical Microscope fibre probes and electronics // 23rd international conference on non-contact atomic force microscopy: Programme and book of abstracts, Nijmegen, August 1–5, 2022. — Nijmegen, 2022. — P. 80.

Патент:

61. Способ оценки степени воздействия ацетата свинца или сульфата цинка на мембрану эритроцитов человека: пат. ВУ № 13764 / Д. С. Филимо-ненко, А. Я. Хайруллина, В. М. Ясинский, Е. И. Слобожанина, Н. М. Козлова. Оpubл 30.10.2010.

РЕЗЮМЕ

Филимоненко Дмитрий Сергеевич

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ И СКАНИРУЮЩЕЙ БЛИЖНЕПОЛЕВОЙ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ЛОКАЛЬНЫХ ТОПОГРАФИЧЕСКИХ, ОПТИЧЕСКИХ И МАГНИТНЫХ СВОЙСТВ НАНОРАЗМЕРНЫХ ОБЪЕКТОВ

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, сканирующая ближнеполевая оптическая микроскопия, клетки крови, наноструктура поверхности, оптоволоконные зонды, NV-центры, кросс-релаксация

Целью исследования является развитие возможностей и инструментария методов атомно-силовой и сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии для детектирования локальных топографических, оптических и магнитных свойств наноразмерных объектов.

Методы исследования: атомно-силовая и сканирующая ближнеполевая оптическая микроскопия, спектрофотометрические и спектрофлуориметрические методы.

Получены следующие **результаты**. Выявлены концентрационные зависимости корреляционной длины нормированной автокорреляционной функции профилей шероховатости поверхности эритроцитов человека, подвергшихся воздействию ионов цинка и свинца, и лимфоцитов человека, подвергшихся воздействию ионов цинка, которые свидетельствуют о дозозависимом уменьшении плотности шероховатостей на поверхности эритроцитов и увеличении плотности шероховатостей на поверхности лимфоцитов. Обнаружено, что увеличение концентрации внутриклеточного кальция в эритроцитах приводит к перестройке элементов цитоскелета и сопровождается уменьшением латеральных и вертикальных размеров нанощероховатостей мембраны эритроцитов. Предложен и реализован высокочувствительный камертонный сенсор поверхности для прерывисто-контактного режима работы СБОМ на основе кантилеверных оптоволоконных зондов с оптимизированными геометрическими параметрами. Обнаружены два типа резонансных особенностей поведения видимой и ИК фотолюминесценции ансамбля NV-центров в области слабых магнитных полей, изучено влияние мощности и поляризации лазерного излучения на амплитуду и форму обнаруженных резонансов.

Рекомендации по использованию и область применения: полученные результаты могут быть использованы для ранней диагностики токсического действия свинца и цинка на организм человека, а также при разработке новых способов магнитометрии на основе ансамбля NV-центров в алмазе (без использования СВЧ поля).

РЭЗІЮМЭ

Філімоненка Дзмітры Сяргеевіч

ВЫКАРЫСТАННЕ МЕТАДАЎ АТАМНА-СІЛАВОЙ І СКАНІРУЮЧАЙ БЛІЗКАПОЛЬНАЙ АПТЫЧНАЙ МІКРАСКАПІ ДЛЯ ДЭТЭКТЫРАВАННЯ ЛАКАЛЬНЫХ ТАПАГРАФІЧНЫХ, АПТЫЧНЫХ І МАГНІТНЫХ УЛАСЦІВАСЦЕЙ НАНАПАМЕРНЫХ АБ'ЕКТАЎ

Ключавыя словы: атамна-сілавая мікраскапія, сканірующая блізкапольная аптычная мікраскапія, клеткі крыві, нанаструктура паверхні, валаконна-аптычныя зонды, NV-цэнтры, кросс-рэлаксацыя

Мэтай даследвання з'яўляецца развіццё магчымасцей і інструментарыя метадаў атамна-сілавой і сканірующей блізкапольнай аптычнай мікраскапіі для дэтэктыравання лакальных тапаграфічных, аптычных і магнітных уласцівасцей нанапамерных аб'ектаў.

Метады даследавання: атамна-сілавая і сканірующая блізкапольная аптычная мікраскапія, спектрафатаметрычныя і спектрафлуарыметрычныя метады.

Атрыманы наступныя **вынікі**. Выяўлены канцэнтрацыйныя залежнасці даўжыні карэляцыі нармалізаванай аўтакарэляцыйнай функцыі профіляў шурпатасці паверхні эрытрацытаў чалавека пры ўздзеянні іёнаў цынку і свінцу, і лімфацытаў чалавека, пры ўздзеянні іёнаў цынку, якія сведчаць аб дозалежным зніжэнні шчыльнасці шурпатасцей на паверхні эрытрацытаў і павышэнні шчыльнасці шурпатасцей на паверхні лімфацытаў. Устаноўлена, што павелічэнне канцэнтрацыі ўнутрыклеткавага кальцыя ў эрытрацытах прыводзіць да перабудовы элементаў цытаскелета і суправаджаецца мяншэннем латэральных і вертыкальных памераў нанашурпатасцей мембраны эрытрацытаў. Прапанаваны і рэалізаваны высокаадчувальны камертонны сэнсар паверхні для перарывіста-кантактнага рэжыму працы СБАМ на аснове кантылеверных валаконна-аптычных зондаў з аптымізаванымі геаметрычнымі параметрамі. Знойдзены два тыпы рэзанансных асаблівасцей паводзін ансамбля NV-цэнтраў у вобласці слабых магнітных палёў, вывучаны эфект моцнасці і палярызацыі лазернага выпраменьвання на амплітуду і форму выяўленых рэзанансаў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні і вобласць прымянення: атрыманыя вынікі могуць быць выкарыстаны для ранней дыягностыкі таксічнага ўздзеяння свінцу і цынку на арганізм чалавека, а таксама ў распрацоўцы новых метадаў магнітаметрыі на аснове ансамбля NV-цэнтраў у алмазе (без выкарыстання ЗВЧ поля).

SUMMARY

Filimonenko Dmitry

THE USE OF ATOMIC FORCE AND SCANNING NEAR-FIELD OPTICAL MICROSCOPIES TO DETECT LOCAL TOPOGRAPHIC, OPTICAL AND MAGNETIC PROPERTIES OF NANOSIZED OBJECTS.

Keywords: atomic force microscopy, scanning near-field optical microscopy, blood cells, surface nanostructure, optical fiber probes, NV centers in diamond, cross-relaxation

The aim of research is to enhance the capabilities of the methods and instruments of atomic force and scanning near-field optical microscopies for detecting local topographic, optical and magnetic properties of nanosized objects.

Research methods: atomic and scanning near-field optical microscopy, spectrophotometric and spectrofluorimetric methods.

The following **results** have been obtained. The concentration dependencies of the correlation lengths of the normalized autocorrelation function of erythrocyte surface roughness profiles upon the exposure of zinc and lead ions were revealed, which are indicative of the dose-dependent decrease in erythrocyte surface roughness density and increase in lymphocytes surface roughness density. It was found that an increase in erythrocyte intracellular calcium concentration leads to the cytoskeleton restructuring and is accompanied by a decrease in both vertical and lateral nanoroughness of the erythrocyte membrane. A highly sensitive tuning fork surface sensor for the tapping mode SNOM based on the elaborated bent fiber probes with optimized geometry was proposed and implemented. Two types of resonance features in the behavior of the visible and IR photoluminescence from an ensemble of NV centers near zero magnetic field were discovered, the effect of the power and polarization of laser radiation on the amplitude and shape of the revealed zero field features was observed.

Recommendations for use and field of application: the results obtained can be used in early diagnostics of the toxic effect of lead and zinc on the human body, as well as for the development of new all-optical microwave-free magnetic sensing techniques with ensembles of NV centers in diamond.

ФИЛИМОНЕНКО Дмитрий Сергеевич

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ И
СКАНИРУЮЩЕЙ БЛИЖНЕПОЛЕВОЙ
ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ
ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ЛОКАЛЬНЫХ
ТОПОГРАФИЧЕСКИХ, ОПТИЧЕСКИХ И
МАГНИТНЫХ СВОЙСТВ НАНОРАЗМЕРНЫХ
ОБЪЕКТОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук
по специальности 01.04.05 – оптика



Подписано в печать «21» 11 2023 г. Формат 60 × 90 1/16.
Бумага - офисная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,8.
Уч. изд. л. 1,4. Тираж 60 экз. Заказ № 7.

Государственное научное учреждение «ИНСТИТУТ ФИЗИКИ имени
Б. И. СТЕПАНОВА НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»
220072, Республика Беларусь, г. Минск, пр. Независимости, 68-2
Отпечатано на ризографе ИНСТИТУТА ФИЗИКИ НАН Беларуси