

ДОСЯГНЕННЯ ФІЗИЧНОЇ ХІМІЇ В ОБЛАСТІ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ МІКРОСКОПІЇ ТА ВІЗУАЛІЗАЦІЇ НАНОСИСТЕМ

В. М. Огенко*

**Інститут загальної та неорганічної хімії імені В. І. Вернадського НАН України,
просп. Акад. Палладіна, 32/34, Київ 03142, Україна
Email: vladimir.ogenko@gmail.com*

В огляді наведено сучасні погляди та історію розвитку мікроскопічних досліджень наносистем. На особливу увагу заслуговує застосування вуглецевих квантових точок та плазмонного резонансу для підсилення флюоресценції при отриманні ефекту суперроздільної здатності зображень, які дозволяють використовувати оптичні мікроскопи в оцінюванні розмірів кластерних та одиночних молекул. Цей прорив у знятті дифракційної обмеженості дозволив науковцям використовувати робочий діапазон 1–100 нм та отримувати 3D-зображення наносистем та зображення живих клітин.

Ключові слова: Флуоресцентна мікроскопія, оптична інтерференційна мікроскопія, плазмонна мікроскопія, STED-мікроскопія суперроздільної здатності, наносистеми.

ВСТУП. 2014 року було присуджено Нобелівську премію з хімії Еріку Бетцигу, Віл'яму Мернеру, Штефану Геллю «За розвиток флуоресцентної мікроскопії суперроздільної здатності». Цей прорив у знятті дифракційної обмеженості дозволив науковцям проводити дослідження в діапазоні розмірів 1–100 нм. Стало можливим з використанням оптичних мікроскопів досліджувати як одиничні фрагменти молекул, так і їхнє 3D-зображення.

Потрібно також відмітити, що перші роботи було виконано на рівні мистецтва з відбору яскравих люмінесцентних білків, лазерів, розроблення спеціальних програм для оброблення фотографій.

Метою зазначеної роботи є ознайомлення з прогресом у цьому важливому напрямку досліджень за результатами аналізу оригінальних публікацій. Зокрема, цікаво було виявити результати застосування вуглецевих квантових точок у флуоресцентній мікроскопії та плазмонного резонансу на базі благородних металів для підсилення флюоресценції.

У цьому огляді розглянуто деякі публікації з фізичної хімії в області мікроскопії та візуалізації наносистем. Слід зазначити, що на сьогодні фізична хімія є наукою, що межує з багатьма напрямками розвитку хімії, фізики, біології, включаючи хімію наносистем.

Сфера наукових інтересів напрямку «Фізична хімія»

Як відомо, термін «фізична хімія» вперше зустрічається в преамбулі до лекцій М. В. Ломоносова (1752 р.) «Курс истинной физической химии», де наведено таке визначення: «Фізична хімія – це наука, яка має на підставі положень і дослідів фізичних пояснити причину того, що відбувається, через хімічні операції в складних тілах».

Вища атестаційна комісія України Постановою № 17-09/1 від 29.01.98 затвердила наступну формулу спеціальності: «Фізична хімія – це галузь науки, що вивчає хімічні явища та процеси на основі загальних принципів фізики з використанням фізичних експериментальних методів». ВАК визначено також основні напрямки досліджень у фізичній хімії: теорія хімічної будови, теорія хімічних реакцій, поверхневі явища, фотохімічні процеси, елементарні механізми динаміки хімічних процесів та вплив фізичних факторів, хімія ізотопів та радіохімія, нові фізико-хімічні методи досліджень.

Із наведеного вище зрозуміло, що фізична хімія охоплює глибокий пласт наукових досліджень. Щорічна кількість публікацій в зазначених наукових напрямках безперервно збільшується.

Вже за визначенням не виникає сумнівів, що успіхи фундаментальних досліджень у фізичній хімії безпосередньо пов'язані з досягненнями фізики та хімії. Як правило, всі епохальні події в науці, починаючи з 1901 року, щорічно, за заповітом Альфреда Нобеля відзначали присудженням найвищої нагороди – Нобелівської премії за видатні наукові дослідження, революційні винаходи та великий вклад у розвиток культури та суспільства.

Слід відмітити, що присудження Нобелівської премії стимулює інтенсивні дослідження у зазначених напрямках. Як правило, за цими напрямками проводили нові пошукові фундаментальні та прикладні роботи, причому деякі з них сягали масштабів нових наукових революцій (графени, квантові точки, плазмони і т. п.). Ми розділяємо точку зору, зазначену в [1], що «...дослідники не встигають читати тисячі оригінальних опублікованих досліджень» і тому «Оглядові статті мають вирішальне значення для вчених... бути в курсі наукових досягнень» для навчальних, спрямовуючих чи координуючих досліджень, що й спонукало до написання цього огляду у вигляді базової тематичної вибірки.

Деякі науково-природознавчі відкриття та досягнення

Напередодні 122-ї річниці початку роботи Нобелівського комітету, в знак шани, наведемо запозичені нами з «Вікіпедії» назви деяких наукових досліджень та революційних відкриттів нобелівських лауреатів, чий роботи стали науковим фундаментом та «фондом» подальшого розвитку фізичної хімії в процесах дослідження будови та фізико-хімічних властивостей, в тому числі і наносистем.

Нобелівську премію з фізики отримали:

1901 р. – Вільгельм Конрад Рентген – «На знак визнання надзвичайно важливих заслуг перед наукою, що виявилися у відкритті променів, названих згодом на його честь»;

1903 р. – Антуан Беккерель спільно з П'єром і Марією Кюрі – «На знак визнання

видатних заслуг, що виявилися у відкритті мимовільної радіоактивності»;

1924 р. – Манне Сігбан – «Відкриття й дослідження в області рентгенівської спектроскопії»;

1981 р. – Кай Сігбан – «За внесок у розвиток електронної спектроскопії з високою роздільною здатністю»;

1944 р. – Ісидор Рабі – «За резонансний метод вимірювання магнітних властивостей ядер атомів»;

1986 р. – Ернест Руска – «За роботу над електронним мікроскопом» та Герд Бінніг і Генріх Рорер – «За винахід сканувального тунельного мікроскопа»;

1930 р. – Чандрасекара Венката Раман – «Роботи з розсіювання світла й за відкриття ефекту, названого на його честь»;

2010 р. – Андрій Гейм (Andre Geim), Костянтин Новоселов відзначені Нобелівською нагородою «За експерименти з двовимірним матеріалом графеном».

Нобелівську премію з хімії отримали:

1901 р. – Якоб Гендрік Вант-Гофф – «На знак визнання величезної важливості відкриття законів хімічної динаміки і осмотичного тиску в розчинах»;

1911 р. – Марія Кюрі – «За видатні заслуги в розвитку хімії: відкриття елементів радію і полонію, виділення радію і вивчення природи та сполук цього чудового елементу»;

1922 р. – Френсіс Вільям Астон – «За зроблене з допомогою винайденого

ним мас-спектрографа відкриття ізоотопів великого числа нерадіоактивних елементів і за формулювання правила цілих чисел»;

1944 р. – Отто Ган – «За відкриття розщеплення важких ядер»;

1954 р. – Лайнус Карл Полінг – «За дослідження природи хімічного зв'язку та її застосування для визначення структури сполук»;

1956 р. – Сиріл Норман Гіншелвуд, Микола Миколайович Семенов – «За дослідження в області механізмів хімічних реакцій»;

1991 р. – Ріхард Ернст – «За внесок у розвиток методології ядерної магнітної резонансної спектроскопії високого розділення»;

1996 р. – Роберт Керл, Гарольд Крото, Річард Сполі – «За відкриття фулеренів»;

2007 р. – Гергард Ертль – «За дослідження хімічних процесів на поверхнях твердих тіл»;

2010 р. – Річард Гек, Еїті Негісі, Акіра Судзукі – «За реакції крос-каплінгу, що каталізуються паладієм в органічному синтезі»;

2014 р. – Ерік Бетцинг, Вільям Мернер, Стефан Гелль – «За розвиток флуоресцентної мікроскопії суперроздільної здатності»;

2017 р. – Жак Дюбоше, Йоахім Франк, Річард Гендерсон – «За розроблення криоелектронної мікроскопії для визначення структури з високою роздільною здатністю біомолекул у розчині»;

2023 р. – Мунгі Бавенді, Луї Брус, Олексій Єкімов – «За відкриття та розроблення квантових точок».

Таким чином, на озброєнні вчених фізико-хіміків з'явилися нові рентгеноструктурні та рентгенофлуоресцентні прилади, мас-спектрометри, ЯМР, ЕПР, рентген-фотоелектронні спектрометри (ЕСХА), сканувальна електронна мікроскопія, просвічувальна електронна мікроскопія з високою роздільною здатністю, атомно-силові мікроскопи та інші фізичні прилади, які на стику наук поповнювали фундаментальні знання про електронну будову та фізико-хімічні властивості нових матеріалів, у тому числі наносистем. Важливо, що в оптичній мікроскопії подолано дифракційне обмеження і завдяки цьому хіміки, біологи і медики мають можливість без ризику пошкодження біологічних систем прискореними електронами електронних мікроскопів та високого вакууму контролювати поточні процеси в режимі реального часу на рівні окремих молекул, наносистем та нативних біосистем. Відмітимо, що кінець другого тисячоліття ознаменовано «науковим бумом» у галузі наносистем: прийнято Національну наноініціативу США та «Нано» в дослідженнях низки розвинутих країн.

В Україні в Державній цільовій науково-технічній програмі «Нанотехнології та наноматеріали» на 2010–2014 роки» напрям «Нанохімія» отримав конкретне завдання – розроблення та удосконалення нанотехнологій виготовлення наноматеріалів, серед яких розроблення методів хімічного синтезу наноматеріалів, наноматеріали для каталізу, композитні органо-неорганічні матеріали, наносорбенти, розроблення колоїдних нанотехнологій виготовлення нанорозмірних матеріалів, створення нанорозмірних систем медичного і технічного призначення. Про сучасні успіхи «нано» свідчить той

факт, що декілька компаній вже освоюють нанометрові чіпи для смартфонів із топологією 4 нм (наприклад, Media Tek).

Отже, 2014 року Ерік Бетциг, Вільям Мернер, Штефан Гелль отримали Нобелівську премію «За розвиток флуоресцентної мікроскопії суперроздільної здатності». Ш. Гелль розробив STED-мікроскоп (Stimulated Emission Depletion Microscopy). Прилад було обладнано двома лазерами. Один лазер збуджує люмінесценцію спеціально підібраних білків, а інший частково її гасить у вибраній області. Накладанням отриманих зображень створюють зображення високої роздільної здатності, яке досягало 30 нм.

Інший метод розробили Е. Бетциг і В. Мернер (метод одномолекулярної мікроскопії) – система STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), що ґрунтується на послідовній активації та визначенні в часі локалізації флуорофорів, що перемикаються для створення зображення високої роздільної здатності (досягнута величина склала десь 5 нм). У [2] представлено проспект мікроскопів суперроздільної здатності, які виготовляють у промислових масштабах. Відмічено, що ця галузь швидко розвивається. Відомі провідні фірми з наукового приладобудування – Leica, Bruker, Zeiss, Perkin Elmer, Termo Fisher Scientific мають свої оригінальні розробки в області суперроздільної мікроскопії.

Звернемо увагу на наявність інших важливих прийомів методу SRM – «структуроване освітлення» – SIM, яке використовують для покращення просторової роздільної здатності та яке передбачає освітлення зразка візерунковим світлом і використання програмного забезпечення для аналі-

зу інформації в смугах муару за межами нормального діапазону спостереження. Програмне забезпечення для реконструкції розшифровує зображення приблизно з удвічі вищою роздільною здатністю, ніж межа дифракції ~ 100 нм.

SIM має переваги перед іншими методами SRM, а саме можливістю отримання 3D-зображення та зображення живих клітин.

Chuankang Li, Cuifang Kuang та Xu Liu [3] зазначили, що подолання межі дифракції $\sim \lambda/2$ було складним завданням і являло собою великий інтерес для біологічних досліджень. Поява флуоресцентної наноскопії дозволяє досліджувати мікроскопічний світ у діапазоні 1–100 нм за допомогою класичного або звичайного обладнання без аберацій та розподіляти біологічні реакції і мультиепітопне мічення. Пропоновані варіанти, такі як розширювальна мікроскопія (ExM) і Airyscan є інноваційними за вибіркою, освітленням та виявленням. У статті висвітлено досягнення та перспективи флуоресцентної наноскопії. Встановлено, що розширювальна мікроскопія, метод із модуляцією вибірки є корисними для розшифрування субдифракційних особливостей клітин. При цьому забезпечено майже 10-кратне покращення роздільної здатності порівняно з конфокальними або звичайними мікроскопами.

У роботі **Silvia Pujalsand і Lorenzo Albertazzi** [4] обговорено важливість отримання зображень із високою роздільною здатністю для досліджень у наномедицині. Констатовано, що «Наноскопія вже зробила революцію в галузі клітинної біології,

візуалізувавши клітинні структури з нанометричною роздільною здатністю, чутливістю до однієї молекули та в декількох кольорах». Автори вважають, що наноскопія здатна внести в характеристику їхніх структур та нано-біовзаємодій додаткові відомості.

«Можливість позначати цікаві матеріали одним або кількома кольорами дає змогу вивчати ключові події зв'язування, утворення білкової корони, імунне розпізнавання та націлювання. Дослідники мають можливість не тільки відстежувати окремі наночастинки, але й слідкувати за конкретним молекулярним видом у просторі і часі».

Наноскопія буде також здатною до прямої візуалізації молекулярних взаємодій і молекулярного підрахунку. Обговорюється дорожня карта суперроздільної здатності для медицини – швидше, глибше та кількісно.

У біології **Pierre Bon і Laurent Cogne** [5] досліджували механіку, молекулярні двигуни, взаємодії ДНК-білка. У таких чистих системах чи не вперше в флуоресцентній мікроскопії досягнуто роздільну здатність на рівні однієї молекули. Для вивчення основних молекулярних функцій і взаємодій було розроблено передові методи флуоресцентної мікроскопії, такі як флуоресцентна візуалізація впродовж часу життя, флуоресцентна мікроскопія з перенесенням енергії або флуоресцентна кореляційна спектроскопія, які потребують знання флуоресцентної фотофізики на рівні окремої молекули. В очищеному середовищі рухи окремих білків можна виявити без міток за допомогою мікроскопії інтерферометричного розсіювання. Вивчають також

молекулярні механізми в ізольованих клітинах та 3D-мікроскопію високої роздільної здатності.

Серед недоліків відмічено, що флуоресцентне зображення може забезпечити молекулярну специфічність, але складно підтримувати довготривале зображення без деградації зразка.

Joris Schefold, Sophie Meuret, Nick Schilde та інші [6] дослідили нанорозмірне збудження нанокубів Ag за допомогою когерентної катодолюмінесцентної візуалізаційної спектроскопії (CL), щоб виявити фактори, які визначають просторову роздільну здатність CL як глибоко субхвильового методу зображення. Електронний промінь 10–30 кеВ когерентно збуджує локалізовані плазмони в кубах Ag 70 нм при 2,4 і 3,1 еВ. Випромінювання від цих плазмонних мод збирається в дальньому полі разом із розподіленими вторинними електронами. Сканування ліній CL через нанокуби показує експоненціально спадаючі хвости від куба, які виявляють непостійний зв'язок електронного поля з резонансними плазмонними модами. Виміряні довжини розпаду ХЛ коливаються від 8 нм (10 кеВ) до 12 нм (30 кеВ) і відрізняються від розрахункових лише на 1–3 нм. Розроблено статистичну модель розсіювання електронів всередині нанокубів Ag для аналізу вторинних електронних зображень і порівняння їх із даними CL. Краї нанокуба Ag отримано шляхом сканування лінії CL із систематичною похибкою менше 3 нм. Дані демонструють, що CL досліджує індуковані електронами плазмонні поля з нанометровою точністю.

Weiqing Yang, Zhihong Wei, Yan Nie і Yuxi Tian [7] розглянули можливості використання оптичної інтерференційної мікроскопії як методу біовізуалізації складних наночастинок зразків і немаркованих макромолекул шляхом вимірювання їхніх розсіяних світлових полів. Наведено методи розрізнення сигналів розсіювання від різних органел клітини та біологічних макромолекул. Було порівняно переваги та недоліки п'яти популярних методів зображення нефлуоресцентних частинок/молекул, включаючи темнопольну мікроскопію (DFM), поверхневу плазмонну резонансну мікроскопію (SPRM), поверхнево-посилену мікроскопію Рамана (SERM), інтерферометричну мікроскопію розсіювання (iSCAT) і фототермічну мікроскопію (PTM).

Ruben F. Hamans, Matteo Parente та Andrea Baldi [8] дослідили плазмонні наночастинок золота (Au) як фотокаталізатори хімічних перетворень. За певних розмірів виникає повздовжній резонанс і оскільки характерні розміри зв'язок і пор у нанопористих матеріалах NPM зазвичай набагато менші за довжину хвилі падаючого світла (λ), то плазмонний резонанс може збуджуватися в широкому діапазоні електромагнітного спектра від ультрафіолетового (УФ) до інфрачервоного (NIR). Автори повідомляють про одностатинкове дослідження *in situ* флуорогенної хімічної реакції, керованої виключно плазмонними ближніми полями. Використовуючи флуоресцентну мікроскопію з високою роздільною здатністю, отримано карту положення окремих молекул продукту з просторовою роздільною здатністю ~ 30 нм і продемонстровано кореляцію між розподілом електричного

поля навколо окремих наночастинок та їхніми картами каталітичної активності.

Ruben F. Hamans, Matteo Parente та Andrea Baldi [9] повідомляють про ретельні вимірювання поверхневих плазмон-поляритонів (SPP), що проходять вздовж майже ідеальних поверхонь розділення повітря – золото, утворених атомарно плоскими поверхнями синтезованих монокристалів золота. За допомогою мікроскопії ближнього поля з амплітудним і фазовим розділенням отримано їхню довжину поширення та ефективний індекс моди у видимому діапазоні хвиль (532, 594, 632,8, 729 і 800 нм). Відзначено, що наявна діелектрична функція монокристалічного золота передбачає приблизно в 1,5 рази коротші довжини розповсюдження, ніж спостерігали в цих експериментах, тоді як діелектрична функція, визначена для виготовленого полікристалічного золота, збігається з довжинами розповсюдження SPP. Автори стверджують, що довжини розповсюдження SPP, виміряні в представлених експериментах, означають кінцеву межу оптичних втрат у золоті.

Nazar Oleksiievets, Christeena Mathew, Jan-Christoph Thiele та інші [10] зазначили, що суттєвим доповненням до набору інструментів методів мікроскопії з надвисокою роздільною здатністю є флуоресцентна одномолекулярна локалізаційна мікроскопія за часом життя (FL-SMLM). Синергія SMLM і флуоресцентної мікроскопії за часом життя (FLIM) поєднує в собі чудову роздільну здатність зображення з інформацією про час життя та яку можна реалізувати за допомогою двох додаткових екс-

периментальних підходів: конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії (CLSM) або широкопольної мікроскопії. Автори всебічно порівнюють два нових підходи FL-SMLM у різних спектральних областях. Для широкопольної FL-SMLM використано комерційну камеру, а для FL-SMLM на основі CLSM використано систему, оснащену швидкодіючим сканером і однофотонним детектором. Охарактеризовано продуктивність двох систем у локалізації одного випромінювача в 3D.

Georg Ramer, Francesco Simone Ruggeri, Aviad Levin та інші [11] досліджували ІЧ-спектри білків при згортанні і набуті ними структури у воді та в повітрі. Відомо, що неправильне згортання білків може призвести до утворення токсичних амілоїдних агрегатів, пов'язаних із початком нейродегенеративних розладів. «Щоб в'яснити молекулярну основу функціонування та збоїв білка, вкрай важливо отримати доступ до структурної інформації про одиничні збірки та агрегати білків у природних умовах. Разом із цим поточні конформаційно-чутливі спектроскопічні методи не мають просторової роздільної здатності та чутливості, необхідних для характеристики гетерогенних білкових агрегатів у розчині». Щоб подолати це обмеження, автори використали фототермічний резонанс. Завдяки цьому підходу в роботі досліджено супрамолекулярні агрегати дифенілаланіну, основного модуля розпізнавання β -амілоїдного пептиду хвороби Альцгеймера та його похідного – дифенілаланіну. Таким чином, у роботі отримано ІЧ-спектри і карти наноструктур у повітрі та воді з боковою роздільною здатністю, що дозволяє точно

ідентифікувати хімічний і структурний стан морфологічно подібних структур на рівні одного агрегату.

Anna Bezryadina, Junxiang Zhao, Yang Xiata та інші [12] продемонстрували, що локалізована плазмонна мікроскопія зі структурованим освітленням (LPSIM) забезпечує багатоколірне широкопольне зображення надвисокої роздільної здатності з низькою фототоксичністю та високою швидкістю. LPSIM використовує нанорозмірну плазмонну антенну ґратку для забезпечення серії настроюваних шаблонів освітлення за межею традиційної дифракції, дозволяючи покращити роздільну здатність до кількох десятків нанометрів. Продemonстровано LPSIM широкого поля з просторовою роздільною здатністю 50 нм і швидкістю відео, відображаючи динаміку мікротрубочок із низькою інтенсивністю освітлення. Конструкція системи LPSIM робить її придатною для зображення поверхневих ефектів клітин і тканин зі звичайними протоколами підготовки зразків. LPSIM можна розширити до набагато вищої роздільної здатності, що являє собою чудову технологію для візуалізації живих клітин, динаміки та взаємодії білків.

C. D. Rankine and T. J. Penfold [13] відзначили, що «розроблення високоякісних джерел світла третього та четвертого поколінь, таких як синхротрони та рентгенівські лазери на вільних електронах, поява лабораторних рентгенівських спектрометрів, а також інструментальні та методологічні досягнення в спектроскопії рентгенівського поглинання і (не)резонансного випромінювання мали далекосяжні наслід-

ки в природничих науках». За останнє десятиліття відбувся значний прогрес у теорії спектроскопії серцевина – дірки. У цій перспективі розглянуто проблеми обчислення збуджених станів і спектрів ядра, а також, найсучасніші розробки в теорії електронної будови, динаміці та підходах, керованих навчальними машинами.

C. Verma, Aditya Yadav, Chethana Rao та інші [14] розглянули послідовний прогрес використання вуглецевих квантових точок як ефективного нанозонда для різних методів візуалізації суперроздільної мікроскопії. Досліджено властивості випромінювання на рівні однієї частинки, перемикання увімкнення – вимкнення, робочий цикл, які є важливими критеріями для будь-якого флуоресцентного зонда. Обговорено успішне застосування вуглецевих квантових точок для отримання високо-роздільної структури різних субклітинних органел. Підсумовано деякі ключові характеристики вуглецевих квантових точок для їхнього успішного застосування як нового флуоресцентного зонда. Продemonстровано можливість їхнього використання як ефективних флуоресцентних нанозондів у мікроскопії STED (стимульована емісія затухання), STORM (стахостична реконструктивно-оптична мікроскопія), PALM (фотоактивована локалізаційна мікроскопія) та інші. З усіх наведених вище одночастинкових досліджень зроблено важливий висновок, що поверхневі стани або групи загалом відповідають за флуоресценцію вуглецевих наноточок. Переривчастість флуоресценції виникає через перенесення електронів між яскравими флуоресцентними станами та нефлуоресцентними тем-

ними станами. Відмічено, що миготливу поведінку можливо налаштувати за допомогою агентів, що приймають і донують електрони, або за допомогою індукованого лазером перемикавання.

Yi-Teng Hsiao, Chia-Ni Tsai, Ching-Ya Cheng та інші [15] вважають, що оптична інтерференційна мікроскопія є потужним методом біовізуалізації шляхом вимірювання складних світлових полів, пов'язаних зі зразком. На сьогодні сучасна інтерференційна мікроскопія дозволяє безпосередньо візуалізувати дуже малі поодинокі біологічні наночастинки і немарковані макромолекули. Стабільний і невизначений сигнал лінійного розсіювання дозволяє безперервно спостерігати за зразком із високою швидкістю, пропонуючи можливості досліджувати одномолекулярну біофізику з безпрецедентними деталями. Відмічено, що «використання інтерференційної мікроскопії для дослідження складних біологічних зразків, таких як біологічна клітина, стає захоплюючим полем дослідження». Динамічний оптичний сигнал живих клітин містить багату часову інформацію, яка корисна для підвищення молекулярної специфічності та функціональної інформації при візуалізації клітин без міток.

Для флуоресцентної мікроскопії високої роздільної здатності (наноскопії) **Yi-Teng Hsiao, Chia-Ni Tsai, Ching-Ya Cheng** та інші описали [16] компактні, переривчасті миготливі та фотоактивовані барвники. Поєднуючи ядро фотоактивованого ксантону (РaX) із групою тетразину, досягнуто мінімального розміру та високочутливі молекулярні діади для вибіркового мічення неприродних амінокислот, введених шля-

хом розширення генетичного коду. Використано властивості гасіння збудженого стану тетразинової групи для послаблення швидкості фотоактивації РaX і подальшого зменшення загального випромінювання флуоресценції фотогенерованого флуорофору, що забезпечує обидва механізми селективності. У поєднанні з наноскопією MINFLUX (Minimal Fluorescence) автори використовують діади для візуалізації ниток віментину з мінімальною помилкою зчеплення, демонструючи точність позиціонування флуорофору в молекулярному масштабі.

Gwosch, K.C. Pape, J. K. Balzarotti [17] відзначають, що кінцевою метою біологічної флуоресцентної мікроскопії з високою роздільною здатністю є забезпечення тривимірної роздільної здатності на рівні розміру флуоресцентного маркера. Показано, що шляхом локалізації окремих флуорофорів, що перемикаються за допомогою пробного пучка збудження у формі бублика, наноскопія MINFLUX може забезпечити роздільну здатність у діапазоні від 1 до 3 нм для структур у фіксованих і живих клітинах. Зображення INFLUX ядерних порових комплексів клітини ссавців показує, що цю справжню нанометрову роздільну здатність можна досягти в трьох вимірах і в двох кольорових каналах.

Sarah Wieghold та Lea Nienhaus [18] зазначили, що поєднання методів оптичної спектроскопії та сканувальної тунельної мікроскопії є перспективним для розгляду оптичних процесів на нанорівні та отримання однозначного розуміння процесів на рівні однієї молекули, що необхідно для

повного виявлення складного зв'язку між структурою та властивостями нових матеріальних систем. Автори висвітлюють поглинання однієї молекули, виявленої за допомогою сканувальної тунельної мікроскопії (SMA-STM) для дослідження взаємодії світло – матерія наночастинок, квантових точок, молекулярних і тонких плівок. Крім цього показано, як техніку SMA-STM було розширено для дослідження нових класів матеріалів, а також модифікації конструкцій, які дозволяють вивчати як зображення з роздільною здатністю в часі, так і томографію.

Alemayehu Nana Koya, Xiangchao Zhu, Nareg Ohannesian [19] розглянули застосування плазмоніки в діапазонах довжин хвиль (від ультрафіолетового до інфрачервоного) штучно сконструйованих нанопористих плазмонних матеріалів (NPM) на основі металів Au, Ag, Cu, Al, Mg і Pt. Встановлено, що зразки на основі нанопористого золота та змішаних металів мають велику питому поверхню, відмінні оптичні властивості, високу електропровідність, що відкриває перспективи для багатьох застосувань, зокрема в спектроскопії та фотокаталізі.

Резонансне збудження поверхневих плазмонів у металевих наноструктурах призводить до посилення електромагнітних полів у надмалих об'ємах за межею дифракції. Оскільки характерні розміри зв'язок і пор у NPM зазвичай набагато менші за довжину хвилі падаючого світла (λ), то плазмонний резонанс може збуджуватися в широкому діапазоні електромагнітного спектра від ультрафіолетового (УФ) та до майже інфрачервоного шляхом підбо-

ру розмірів пор, модуляції діелектричних властивостей металів або зміною їхнього діелектричного середовища. Зокрема, електромагнітні гарячі точки, пов'язані з NPM, з їхнім електромагнітним посиленням, простотою експлуатації широко використовують у поверхнево-посиленій раманівській спектроскопії (SERS) і для посилення флуоресценції.

Izzah Machfuudzoh, Tatsuki Hinamoto, F. Javier García de Abajo [20] показали, що сферична діелектрична частинка може підтримувати так звані *моди шепітливої галереї* (WGM), які розглядали як циркулюючі електромагнітні хвилі, що призводить до просторового обмеження світла всередині частинки. Це дослідження демонструє нанорозмірну візуалізацію оптичного поля самоінтерференції світла, вилученого зі збуджених мод за допомогою експериментально отриманих карт фотонів. Щоб вибірково вибрати конкретні режими при заданому куті виявлення випромінювання світла та резонансній довжині хвилі, автори використовували скануючу трансмісійну електронну мікроскопію на основі катодолюмінесценції, доповнену можливостями визначення кута, поляризації та довжини хвилі. Моделювання розподілу внутрішнього поля мод шепітливої галереї показують, що випромінювання, яке генерує сферичний резонатор на заданій резонансній частоті, складається з інтерференції між кількома модами, причому одна або більше з них є порівняно домінуючими. Завдяки цьому досягнуто прямої візуалізації внутрішніх полів всередині резонатора.

У [21] **Siwoo Jin, Jiseong Park, Wonhee John Lee** та інші пропонують технологію відеозапису життя на молекулярному рівні. Така технологія є ключем до здійснення спостереження в реальному часі з відповідною роздільною здатністю в тривимірному (3D) просторі в живих клітинах. Повідомляється про оптичний мікроскопічний метод для дослідження ендосомальної динаміки з належним просторово-часовим дозволом у 3D-просторі в живих клітинах – плазмонний темнопольний STORM (pdf-STORM). Підтверджено, що pdf-STORM має просторову роздільну здатність, порівняну з роздільною здатністю скануючої електронної мікроскопії. Спостерігаючи за двома оптичними зондами в одній органелі, автори змогли відстежити обертальні рухи та продемонструвати доцільність використання pdf-STORM для спостереження за кутовими зміщеннями ендосоми.

Judith Langer, Dorleta Jimenez de Aberasturi, Javier Aizpurua [22] відмічають, що «відкриття посилення з фактором (10^8 і більше) комбінаційного розсіювання молекулами, адсорбованими на наноструктурованих металевих поверхнях срібла і золота, є віхою в історії спектроскопічних та аналітичних методів». У цій роботі понад 50 видатних авторів з усього світу об'єдналися, щоб узагальнити сучасний стан розуміння та використання SERS.

Перспективи вражають. Наносенсори та нанорепортери з поверхнево-посиленням комбінаційним розсіюванням є ефективними та універсальними платформами для біохімічного зондування, візуалізації та медичної тераностики. Поверхнево розширені методи виявлення комбінаційного

розсіювання, які мають високу здатність мультиплексування, будуть критично важливими для майбутньої персоналізованої та геномної медицини. Здатність виявляти кілька біомаркерів одночасно, таких як нуклеїнові кислоти (ДНК, мРНК, мікроРНК тощо), є важливою для багатьох застосувань і для майбутньої медицини на основі діагностики РОС, високопродуктивних систем скринінгу, біологічних досліджень і ранньої медичної діагностики на генному і молекулярному рівнях.

«Поверхнево посилене комбінаційне розсіювання застосовують не лише для сенсорних цілей, а й також як інструмент точного зображення зразків. Мікроскопія Immuno-SERS (iSERS) використовує переваги наноміток SERS. Основними перевагами цієї нової нанобіофотонної техніки є паралельна локалізація багатьох білків на клітинах і тканинах, кількісне визначення білка та високий контраст зображення».

Наведена праця віддзеркалює унікальні досягнення науки і може слугувати дорожньою картою розвитку низки нових фундаментальних напрямків науки.

ВИСНОВКИ. В огляді висвітлено досягнення та перспективи флуоресцентної наноскопії SRM. Флуоресцентна мікроскопія високої роздільної здатності успішно розвивається та вивчає наносвіт у діапазоні 1–100 нм на рівні сканувальної електронної мікроскопії. В клітинній біології, наномедицині тощо розробляють дорожні карти наукових проривів методів візуалізації суперроздільної здатності для «живих» зображень. Обрії мікроскопії Immuno-SERS та медицини індивідуальної діагностики розширюються, обіцяючи захоплюючі перспективи.



Роботу виконано в межах наукової роботи 323 НТ фонду бюджетного фінансування НАН України.

ACHIEVEMENTS IN PHYSICAL CHEMISTRY IN THE FIELD OF MICROSCOPY AND VISUALIZATION OF NANOSYSTEMS.

V.M. Ogenko*

**Vernadsky Institute of General and Inorganic Chemistry N.A.S of Ukraine,
32/34 Acad. Palladin av., 03142 Kyiv, Ukraine
Email: vladimir.ogenko@gmail.com*

The review presents modern views and the history of the development of microscopic studies of nanosystems which have been started 2014, after the Nobel Prize in Chemistry was awarded to Eric Betzig, William Möerner, and Stefan Gell "for the development of super-resolved fluorescence microscopy". Their work ushered in a new era of optical microscopy, enabling the precise examination of individual molecules and molecular clusters by using optical microscopes. By circumventing the diffraction limitations that had constrained traditional optical microscopes, scientists gained access to the nanoscale realm, investigating structures within the 1–100 nanometer range. Special attention is paid to the use of carbon quantum dots and plasmon resonance to enhance fluorescence when obtaining the effect of super-resolution images, which allow the use of optical microscopes in the estimation of the sizes of cluster and single molecules. This

breakthrough in removing the diffraction limitation allowed scientists to use the working range of 1–100 nm and obtain 3D images of nanosystems and images of living cells. Particular attention is paid to the achievements and prospects of high-resolution fluorescent nanoscopy SRM, which is successfully developing and studying the nanoworld in the range of 1–100 nm at the level of scanning electron microscopy. In cell biology, nanomedicine, etc. are developing roadmaps for scientific breakthroughs in super-resolution visualization methods for "live" images. Prospects of Immuno-SERS microscopy and medicine of individual diagnosis are considered

Key Findings:

1. This article highlights the achievements and future prospects of super-resolution fluorescence microscopy SRM.
2. High-resolution fluorescence microscopy has proven instrumental in advancing our understanding of the living world within the 1–100 nanometer range, which is akin to the capabilities of scanning electron microscopy.
3. Within the domains of cell biology and nanomedicine, roadmaps for scientific breakthroughs are emerging, fueled by super-resolution imaging techniques, providing "live" insights into cellular processes.
4. The horizons of Immuno-SERS Microscopy and Personalized Diagnostics Medicine are expanding, promising exciting prospects in the field of medical diagnostics.

Keywords: Fluorescence microscopy, optical interference microscopy, plasmon microscopy, super-resolution STED microscopy, nanosystems.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Warren C. W. Chan. Writing Excellent Review Articles. *ACS Nano* 2023. 17(3):1723-1724. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00497>
2. <Super-Resolution Microscopy. | Thermo Fisher Scientific - CA> . <https://www.thermofisher.com>
3. Chuankang Li, Cuifang Kuang and Xu Liu. Prospects for Fluorescence Nanoscopy. *ACS Nano* 2018. 12 (5) : 4081–4085 <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02142>
4. Silvia Pujalsand Lorenzo Albertazzi. Super-resolution Microscopy for Nanomedicine Research.: *ACS Nano* 2019. 13 (9): 9707–9712. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05289>
5. Pierre Bon and Laurent Cogne. On Some Current Challenges in High-Resolution Optical Bioimaging. *ACS Photonics* 2022. 9 : 2538–2546. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.2c00606>
6. Joris Schefold, Sophie Meuret, Nick Schilder, Toon Coenen, Harshal Agrawal, Erik C. Garnett, and Albert Polman. Spatial resolution of coherent cathodoluminescence super-resolution microscopy. *ACS Photonics* 2019. 6 (4) 1067–1072. DOI: 10.1021/acsp Photonics.9b00164
7. Weiqing Yang, Zhihong Wei, Yan Nie and Yuxi Tian. Optical Detection and Imaging of Nonfluorescent Matter at the Single-Molecule/Particle Level. *J. Phys. Chem. Lett.* 2022. 13: 9618–9631. doi: 10.1021/acs.jpcclett.2c02228.
8. Ruben F. Hamans, Matteo Parente, and Andrea Baldi. Super-Resolution Mapping of a Chemical Reaction Driven by Plasmonic Near-Field: *Nano Lett.* 2021. 21: 2149–2155. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04837>
9. Ruben F. Hamans, Matteo Parente, and Andrea Baldi. Ultimate Limit for Optical Losses in Gold, Revealed by Quantitative Near-Field Microscopy : *Nano Lett.* 2022. 22: 5759–5764. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c01059>
10. Nazar Oleksiivets, Christeena Mathew, Jan Christoph Thiele, José Ignacio Gallea, Oleksii Nevskiy, Ingo Gregor, André Weber, Roman Tsukanov, and Jörg Enderlein. Single-Molecule Fluorescence Lifetime Imaging Using Wide-Field and Confocal-Laser Scanning Microscopy. A Comparative Analysis : *Nano Lett.* 2022 .2 2: 6454–6461. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c01586>
11. Georg Ramer, Francesco Simone Ruggeri, Aviad Levin, Tuomas P. J. Knowles, and Andrea Centro. Determination of Polypeptide Conformation with Nanoscale Resolution in Water. *ACS Nano* 2018. 12 (7) : 6612-6619. DOI: 10.1021/acsnano.8b01425
12. Anna Bezryadina, Junxiang Zhao, Yang Xia, Xiang Zhang, and Zhaowei Liu: High Spatio-temporal Resolution Imaging with Localized Plasmonic Structured Illumination Microscopy. *ACS Nano*. 2018. 12 8 : 8248–8254. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03477>
13. C. D. Rankine and T. J. Penfold Progress in the Theory of X-ray Spectroscopy: From Quantum Chemistry to Machine Learning and Ultrafast Dynamics. *J. Phys. Chem. A* 2021. 125. 20 : 4276–4293. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c11267>
14. Navneet C. Verma, Aditya Yadav, Chethana Rao, Pushpendra M. Mishra, and Chayan K. Nandi. Emergence of Carbon Nanodots as a Probe for Super-Resolution Microscopy. *J. Phys. Chem. C*. 2021. 125: 1637–1641. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c09695>
15. Molecularly Specific and Functional Live Cell Imaging by Label-Free Interference Microscopy. Yi-Teng Hsiao, Chia-Ni Tsai, Ching-Ya Cheng, and Chia-Lung Hsieh . *ACS photonics*. 9(7): 2237-2245. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.2c00599>
16. Yi-Teng Hsiao, Chia-Ni Tsai, Ching-Ya Cheng Maria Augusta do R. B. F. Lima, Alexey N. Butkevich, Mariano L. Bossi, and Stefan W. Hell. Bioorthogonal Caging-Group-Free Photoactivatable Probes for Minimal-Linkage-Error Nanoscopy . *ACS Cent. Sci.* 2023. 9 (8):

- 1581–1590.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00746>
17. Gwosch, K. C.; Pape, J. K.; Balzarotti, F.; Hoess, P.; Ellenberg, J.; Ries, J.; Hell, S. W. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells. *Nat. Methods*. 2020. 17 (2) : 217–224.
 doi: 10.1038/s41592
 18. Viewing Optical Processes at the Nanoscale: Combining Scanning Tunneling Microscopy and Optical Spectroscopy. Sarah Wieghold and Lea Nienhaus. *The Journal of Physical Chemistry C* 2023 . 127 (8): 3913–3920.
 DOI:10.1021/acs.jpcc.2c08912
 19. Alemayehu Nana Koya, Xiangchao Zhu, Nareg Ohannesian, A. Ali Yanik, Alessandro Alabastri, Remo Proietti Zaccaria, Roman Krahne, Wei-Chuan Shih, and Denis Garoli. Nanoporous Metals: From Plasmonic Properties to Applications in Enhanced Spectroscopy and Photocatalysis. *ACS Nano* 2021. 15. 4: 6038–6060.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10945>
 20. Izzah Machfuudzoh, Tatsuki Hinamoto, F. Javier García de Abajo, Hiroshi Sugimoto, Minoru Fujii, and Takumi Sannomiya. Visualizing the Nanoscopic Field Distribution of Whispering-Gallery Modes in a Dielectric Sphere by Cathodoluminescence *ACS Photonics*. 2023 10, 5, 1434–1445 . <https://doi.org/10.1021/acs-photonics.3c00041>
 21. Siwoo Jin, Jiseong Park, Wonhee John Lee, Yongdeok Ahn, Youngchan Park, Minsoo Park, Inchan Hwang, Kwanyong Seo, and Daeha Seo. Two GPSes in a Ball: Deciphering the Endosomal Tug-of-War Using Plasmonic Dark-Field STORM. *JACS Au* 2022. 2. 7 : 1596–1603.
<https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00180>
 22. Judith Langer, Dorleta Jimenez de Aberasturi, Javier Aizpurua. Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* 2020. 14 (1): 28–117
 DOI: 10.1021/acsnano.9b04224.
- ## REFERENCES
1. Warren C.W., Chan. Writing Excellent Review Articles. *ACS Nano*. 2023. 17(3): 1723–1724.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00497>
 2. <Super-Resolution Microscopy.[Thermo Fisher Scientific-CA>.
<https://www.thermofisher.com>
 3. Chuankang Li, Cuifang Kuang and Xu Liu. Prospects for Fluorescence Nanoscopy. *ACS Nano*. 2018. 12(5): 4081–4085.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02142>
 4. Albertazzi Silvia Pujalsand Lorenzo. Super-resolution Microscopy for Nanomedicine Research. *ACS Nano*. 2019. 13 (9): 9707–9712.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05289>
 5. Bon Pierre and Cogne Laurent. On Some Current Challenges in High-Resolution Optical Bioimaging. *ACS Photonics*. 2022. 9 : 2538–2546.
<https://doi.org/10.1021/acsphotonics.2c00606>
 6. Schefold Joris, Meuret Sophie, Schilder Nick, Coenen Toon, Agrawal Harshal, Garnett Erik C. , and Polman Albert. Spatial resolution of coherent cathodoluminescence super-resolution microscopy. *ACS Photonics*. 2019. 6 (4) 1067–1072.
 DOI: 10.1021/acsphotonics.9b00164
 7. Weiqing Yang, Zhihong Wei, Yan Nie and Yuxi Tian. Optical Detection and Imaging of Nonfluorescent Matter at the Single-Molecule/Particle Level. *J. Phys. Chem. Lett.* 2022. 13: 9618–9631.
 doi: 10.1021/acs.jpcclett.2c02228.
 8. Hamans Ruben F. , Parente Matteo, and Baldi Andrea. Super-Resolution Mapping of a Chemical Reaction Driven by Plasmonic Near-Field: *Nano Lett.* 2021. 21: 2149–2155.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04837>
 9. Hamans Ruben F. , Parente Matteo, and Baldi Andrea. Ultimate Limit for Optical Losses in Gold, Revealed by Quantitative Near-Field Microscopy : *Nano Lett.* 2022. 22: 5759–5764.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c01059>
 10. Oleksiivets Nazar, Mathew Christeena, Thiele Jan Christoph, Gallea José Ignacio, Nevskiy

- Oleksii, Gregor Ingo, Weber André, Tsukanov Roman, and Enderlein Jörg. Single-Molecule Fluorescence Lifetime Imaging Using Wide-Field and Confocal-Laser Scanning Microscopy. A Comparative Analysis. *Nano Lett.* 2022. **22**: 6454–6461.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c01586>
11. Ramer Georg, Ruggeri Francesco Simone, Levin Aviad, Knowles Tuomas P. J., and Centro Andrea. Determination of Polypeptide Conformation with Nanoscale Resolution in Water. *ACS Nano*. 2018. **12** (7) : 6612–6619. DOI: 10.1021/acsnano.8b01425
12. Bezryadina Anna, Zhao Junxiang, Xia Yang, Zhang Xiang, and Liu Zhaowei: High Spatio-temporal Resolution Imaging with Localized Plasmonic Structured Illumination Microscopy. *ACS Nano*. 2018. **12** (8): 8248–8254. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03477>
13. Rankine C. D. and Penfold T. J. Progress in the Theory of X-ray Spectroscopy: From Quantum Chemistry to Machine Learning and Ultrafast Dynamics. *J. Phys. Chem. A* 2021. **125** : 4276–4293.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c11267>
14. Navneet C. Verma, Aditya Yadav, Chethana Rao, Pushpendra M. Mishra, and Chayan K. Nandi. Emergence of Carbon Nanodots as a Probe for Super-Resolution Microscopy. *J. Phys. Chem. C*. 2021. **125**: 1637–1641. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c09695>
15. Molecularly Specific and Functional Live Cell Imaging by Label-Free Interference Microscopy. Yi-Teng Hsiao, Chia-Ni Tsai, Ching-Ya Cheng, and Chia-Lung Hsieh. *ACS photonics*. **9**(7): 2237–2245.
<https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.2c00599>
16. Yi-Teng Hsiao, Chia-Ni Tsai, Ching-Ya Cheng Maria Augusta do R. B. F. Lima, Alexey N. Butkevich, Mariano L. Bossi, and Stefan W. Hell. Bioorthogonal Caging-Group-Free Photoactivatable Probes for Minimal-Linkage-Error Nanoscopy. *ACS Cent. Sci.* 2023. **9** (8): 1581–1590.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00746>
17. Gwosch K. C., Pape J. K., Balzarotti F., Hoess P. Ellenberg J., Ries J., Hell S. W. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells. *Nat. Methods*. 2020. **17** (2): 217–224. doi: 10.1038/s41592
18. Viewing Optical Processes at the Nanoscale: Combining Scanning Tunneling Microscopy and Optical Spectroscopy. Sarah Wiegbold and Lea Nienhaus. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2023. **127**(8): 3913–3920. DOI:10.1021/acs.jpcc.2c08912
19. Alemayehu Nana Koya, Xiangchao Zhu, Nareg Ohannesian, A. Ali Yanik, Alessandro Alabastri, Remo Proietti Zaccaria, Roman Krahne, Wei-Chuan Shih, and Denis Garoli. Nanoporous Metals: From Plasmonic Properties to Applications in Enhanced Spectroscopy and Photocatalysis. *ACS Nano*. 2021. **15**(4): 6038–6060.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10945>
20. Izzah Machfuudzoh, Tatsuki Hinamoto, F. Javier García de Abajo, Hiroshi Sugimoto, Minoru Fujii, and Takumi Sannomiya. Visualizing the Nanoscopic Field Distribution of Whispering-Gallery Modes in a Dielectric Sphere by Cathodoluminescence. *ACS Photonics*. 2023. **10**(5): 1434–1445 .
<https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.3c00041>
21. Siwoo Jin, Jiseong Park, Wonhee John Lee, Yongdeok Ahn, Youngchan Park, Minsoo Park, Inchan Hwang, Kwanyong Seo, and Daeha Seo. Two GPSes in a Ball: Deciphering the Endosomal Tug-of-War Using Plasmonic Dark-Field STORM. *JACS Au*. 2022. **2**(7): 1596–1603.
<https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00180>
22. Langer Judith, Aberasturi Dorleta Jimenez de, Aizpurua Javier. Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano*. 2020. **14** (1): 28–117. DOI: 10.1021/acsnano.9b04224.

Стаття надійшла 01.08.2023.