

Інститут фізики Національної академії наук України

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МОНАСТИРСЬКИЙ ГРИГОРІЙ ПАВЛОВИЧ

УДК 535.37, 543.42, 577.312, 539.23, 620.187.2

ДИСЕРТАЦІЯ

ЕФЕКТИ ТА МЕХАНІЗМИ СТРУКТУРНИХ ПЕРЕБУДОВ В МОДЕЛЬНИХ
ТА РЕАЛЬНИХ МЕМБРАНАХ ПІД ДІЄЮ НАНОЧАСТИНОК MoS_2 ТА WS_2

104 ФІЗИКА ТА АСТРОНОМІЯ

10 – ПРИРОДНИЧІ НАУКИ

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Г.П. Монастирський

Науковий керівник:

Довбешко Галина Іванівна
доктор фізико-математичних наук
професор

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

У дисертаційній роботі «Ефекти та механізми структурних перебудов в модельних та реальних мембранах під дією наночастинок MoS_2 та WS_2 », поданої на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 104 «Фізика та астрономія», досліджено вплив зовнішніх чинників та наночастинок дихалькогенідів перехідних металів (MoS_2 , WS_2) на структурні та функціональні характеристики біологічних і модельних мембран.

У першому розділі наведено огляд сучасних літературних джерел з біофізики клітинних мембран, їх будови, функціональних особливостей, зокрема ліпідних рафтів та фазової поведінки ліпідів. Один із параграфів присвячений аналізу ліпосом як модельних систем для вивчення мембранних процесів та систем доставки лікарських засобів.

У другому розділі детально описано методику експериментальних досліджень, включаючи інфрачервону Фур'є-спектроскопію (FTIR - Fourier-transform infrared spectroscopy), спектроскопію комбінаційного розсіювання (Raman scattering), люмінесцентну спектроскопію, оптичну та конфокальну мікроскопію, скануючу електронну мікроскопію (SEM), енергодисперсійний аналіз (EDS - Energy-dispersive X-ray spectroscopy) та динамічне розсіювання світла (DLS dynamic light scattering). Висвітлено принципи роботи, переваги, а також специфіку застосування кожного методу для аналізу ліпідних мембран та наночастинок.

У третьому розділі за допомогою методів SEM та EDS досліджено морфологічну будову, хімічний склад, а також електричні та магнітні властивості 2D наночастинок MoS_2 і WS_2 . Показано, що ці матеріали демонструють дефіцит сірки та схильність до поверхневого окиснення. MoS_2 проявляє феромагнітні властивості.

У четвертому розділі проаналізовано взаємодію модельних мембран (ліпосом) з наночастинками MoS_2 та WS_2 на основі DLS, FTIR, спектроскопію комбінаційного розсіювання та квантово-хімічного моделювання. Вперше

виявлено, що MoS_2 та WS_2 мають здатність взаємодіяти з ліпідами і знаходитись всередині ліпосом. Показано, що MoS_2 і WS_2 викликає зміни у структурі ліпосом та впливає на спектральні маркери мембран. Наночастинки WS_2 у водному чи буферному середовищі біологічних молекул та клітин, переважно знаходяться в окисленому стані, в той час як MoS_2 є більш стійким до окислення.

У п'ятому розділі досліджено структурні перебудови у клітинах легеневої карциноми Льюїса (LLC) під впливом 2D-наночастинок MoS_2 і WS_2 . Проведено аналіз морфології клітин за допомогою електронної, оптичної та флуоресцентної мікроскопії. Вперше виявлено зміни в цитоскелеті, та структурі під дією наночастинок MoS_2 і WS_2 .

Отримані результати мають значний потенціал для подальшого використання у моделюванні мембранних процесів, створенні новітніх систем доставки ліків, діагностичних засобів.

Ключові слова: MoS_2 WS_2 , наночастинки, спектральні та оптичні властивості, ліпосоми, мембранні міметики, коливальна спектроскопія, спектроскопія комбінаційного розсіювання, люмінесцентна спектроскопія, оптична мікроскопія, електронна мікроскопія.

SUMMARY

In the dissertation work titled "Effects and Mechanisms of Structural Rearrangements in Model and Real Membranes under the Action of MoS₂ and WS₂ Nanoparticles," submitted for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 104 "Physics and Astronomy," the influence of external factors and nanoparticles of transition metal dichalcogenides (MoS₂, WS₂) on the structural and functional characteristics of biological and model membranes has been investigated.

In the first chapter, an overview of modern literature sources on the biophysics of cellular membranes, their structure, functional features, including lipid rafts and the phase behavior of lipids, is presented. One of the paragraphs is devoted to the analysis of liposomes as model systems for studying membrane processes and drug delivery systems.

In the second chapter, the methodology of experimental studies is described in detail, including Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman scattering spectroscopy, luminescence spectroscopy, optical and confocal microscopy, scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), and dynamic light scattering (DLS). The principles of operation, advantages, as well as the specifics of application of each method for the analysis of lipid membranes and nanoparticles are highlighted.

In the third chapter, using SEM and EDS methods, the morphological structure, chemical composition, as well as electrical and magnetic properties of 2D nanoparticles MoS₂ and WS₂ have been investigated. It is shown that these materials demonstrate a sulfur deficiency and a tendency to surface oxidation. MoS₂ exhibits ferromagnetic properties.

In the fourth chapter, the interaction of model membranes (liposomes) with MoS₂ and WS₂ nanoparticles has been analyzed based on DLS, FTIR, Raman scattering spectroscopy, and quantum-chemical modeling. For the first time, it has been revealed that MoS₂ and WS₂ have the ability to interact with lipids and be located inside liposomes. It is shown that MoS₂ and WS₂ cause changes in the structure of

liposomes and affect the spectral markers of membranes. WS₂ nanoparticles in aqueous or buffer environments of biological molecules and cells are predominantly in an oxidized state, while MoS₂ is more resistant to oxidation.

In the fifth chapter, structural rearrangements in Lewis lung carcinoma cells (LLC) under the influence of 2D nanoparticles MoS₂ and WS₂ have been investigated. The analysis of cell morphology has been conducted using electron, optical, and fluorescence microscopy. For the first time, changes in the cytoskeleton and structure under the action of MoS₂ and WS₂ nanoparticles have been revealed.

The obtained results have significant potential for further use in modeling membrane processes, creating novel drug delivery systems, and diagnostic tools.

Key words:: MoS₂ WS₂, nanoparticles, spectral and optical properties , liposomes, membrane mimetics, -vibrational spectroscopy, luminescence spectroscopy, Raman spectroscopy , optical microscopy, electron microscopy

ВСТУП

Дисертаційна робота присвячена міждисциплінарному дослідженню фізико-хімічних процесів, що відбуваються у модельних та біологічних мембранах, під впливом двовимірних наночастинок дихалькогенідів перехідних металів (MoS_2 , WS_2). У роботі поєднано сучасні спектроскопічні (FTIR, спектроскопію кобмінаційного розіювання), мікроскопічні (SEM, оптична, конфокальна мікроскопія), динамічні світлорозсіювальні методи з елементами квантово-хімічного моделювання. Робота має як фундаментальне значення для біофізики, так і прикладне спрямування в напрямку біосенсорики та наномедичних технологій.

Обґрунтування актуальності теми

Мембрани є ключовими структурними та функціональними елементами клітин, які забезпечують бар'єрні, рецепторні, сигнальні та транспортні функції. Зміни їхньої структури під впливом зовнішніх фізичних або хімічних факторів, можуть істотно впливати на життєдіяльність клітини. Сучасні дослідження зосереджуються на впливі наночастинок на біомембрани, однак чітке розуміння механізмів структурних перебудов мембран при взаємодії з двовимірними наночастинок, такими як MoS_2 і WS_2 , усе ще залишається недостатнім. Відсутність системного порівняльного аналізу модельних і реальних мембран у цих умовах гальмує практичне впровадження результатів. Таким чином, тема є актуальною для фундаментальних досліджень з біофізики, медицини та фармацевтики.

Мета дослідження

Метою роботи є визначення спектральних і морфологічних особливостей, молекулярних механізмів впливу наночастинок MoS_2 і WS_2 на модельні мембрани і мембрани клітин LLC, виявити взаємозв'язок між структурними перебудовами та спектральними характеристиками, які можна використовувати як діагностичні маркери.

Завдання дослідження

1. Розробити та апробувати технологію приготування модельних мембранних систем на основі фосфоліпідів з включенням наночастинок MoS_2 та WS_2 .
2. Встановити спектроскопічні маркери структурних перебудов у модельних ліпосомах під впливом наночастинок.
3. Вдосконалити та апробувати методики підготовки зразків ліпосом і клітин LLC для аналізу методами електронної мікроскопії.
4. Провести морфологічний аналіз ліпосом і клітин LLC з використанням CEM та оптичної мікроскопії.
5. Встановити кореляції між спектроскопічними та морфологічними особливостями штучних мембран і клітин при взаємодії з наночастинок MoS_2 та WS_2 .

Об'єкт і предмет дослідження

- Об'єкт дослідження: модельні ліпідні мембрани -ліпосоми з ДОПС -1,2-діолеоїл-sn-гліцєро-3-фосфохолін (DOPC - Dioleoylphosphatidylcholine) , холестеролом і сфінгомієліном, а також клітини LLC.
- Предмет дослідження: спектральні та морфологічні особливості штучних мембран та клітин LLC під дією 2D наночастинок MoS_2 і WS_2 .

Обґрунтування вибору методів

Для досягнення мети дослідження застосовано комплекс сучасних методів:

- FTIR та спектроскопію комбінаційного розсіювання — для аналізу коливальних станів ліпідів для визначення спектральних маркерів.
- Люмінесцентна спектроскопія для структурної характеристики систем наночастинок – мембрана.
- CEM та оптична мікроскопія — для візуалізації морфології ліпосом, наночастинок, наночастинок в ліпосомах та клітинах і виявлення морфологічних змін.
- DLS — для визначення розміру частинок

- Квантово-хімічне моделювання — для характеристики взаємодії та зв'язування між ліпідами і наночастинками

Ці методи забезпечують високу просторову, спектральну та структурну чутливість і дозволяють всебічно дослідити систему «мембрана-наночастинка», так і взаємодії в цій системі.

Наукова новизна

- Використовуючи комплексний підхід, що включає методи спектроскопії, оптичної та електронної мікроскопії, проведено дослідження модельних мембран із фосфоліпідів з наночастинками MoS₂ та WS₂.
- Виявлено неоднорідності в структурній організації ліпосом при різних локалізації наночастинок (всередині ліпосоми та на ліпосомі), перерозподіл водневих зв'язків, нековалентний характер взаємодії з частинками, місця зв'язування.
- Вперше в Україні отримано СЕМ зображення ліпосом з наночастинками MoS₂ та WS₂.
- Вперше отримано СЕМ-зображення клітин LLC за умови деадгезивного росту, використовуючи метод сушки у вакуумі та метод сушки в критичній точці (CPD Critical point drying).
- Показано переваги застосування методу сушки в критичній точці для виявлення структурних особливостей клітин LLC.
- Вперше візуалізовано місця знаходження 2D наночастинок MoS₂ та WS₂ в ліпосомах та клітинах LLC, що вказує на входження наночастинок в мембрани реальних та модельних систем.

Практична значущість результатів

- Вперше в Україні застосовано до пробопідготовки клітин LLC метод сушки в критичній точці (CPD Critical point drying)

- Вдосконалено та апробовано методику підготовки зразків ліпосом з наночастинками MoS₂ та WS₂ для отримання зображень методом електронної мікроскопії.
- Запропоновані підходи до виявлення спектроскопічних маркерів взаємодії наночастинок з ліпосомами, що є важливими для діагностики, розробки систем доставки ліків.
- Методичні підходи, застосовані у роботі, можуть бути адаптовані для вивчення біологічних систем.

Особливу увагу приділено дослідженням методом скануючої електронної мікроскопії, з використанням системи із автоемісійним катодом, для отримання високо-роздільних зображень, морфологічних деталей клітин, фазового та елементного складу наночастинок і модельних ліпосом.

Результати цієї роботи дозволять не лише глибше зрозуміти механізми взаємодії біомолекул із лікарськими засобами і наноматеріалами, а й сприятимуть розробці ефективніших підходів для створення нових терапевтичних препаратів та діагностичних інструментів.

Особистий внесок здобувача полягає в пробопідготовці експериментальних зразків для електронної мікроскопії, проведенні експериментальних досліджень, а саме: методами, флуоресцентної оптичної мікроскопії, та скануючої електронної мікроскопії (SEM) та енергодисперсійної спектроскопії (EDS). Здобувач брав активну участь в постановці задачі, виборі об'єктів та методів дослідження; обговорення та інтерпретація результатів, а також формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником. Автор брав безпосередню участь у написанні окремих розділів наукових статей та публікації досліджень.

Апробація результатів дисертації

Матеріали дисертаційної роботи представлені у вигляді доповідей на міжнародних наукових конференціях:

1. CEM imaging of LLC cells interactions with MoS₂ and WS₂ nanoparticles Nanotechnology and Nanomaterials" (NANO-2025), August 20- 23, 2025

Bukovel, Ukraine

2. Influence of WS₂ nanoflakes on FTIR and raman spectroscopy of liposomes. 8th International Conference Nanobiophysics: fundamental and applied aspects. October 3-6, 2023, Kyiv, Ukraine. P.74
3. Can 2D WS₂ and MoS₂ nanoparticles influence on formation and properties of liposomes? XV International Conference on Applied Biophysics, Bionics and Biocybernetics April 11-12, 2024, in Kyiv. P. 28
4. WS₂ and MoS₂ 2D nanoparticles as inducers of changes in liposome formation and spectroscopic properties XVII International Conference on Molecular Spectroscopy and XXVIth Galyna Puchkovska International School-CEMinar ISSSMC-2024 , 22-25 September, Wojanow, Poland P. 37
5. How recognize the formation of lipid rafts in membrane: data of FTIR spectroscopy, The 1st International Online Conference on Photonics IOCP-2024 14-16 October, 2024 Italy, p.17
6. 2D MoS₂ nanoparticles as a platform for imaging of cancer cells G. Dovbeshko *, M. Olenchuk , O. Gnatyuk , G. Monastyrskyi , S. Karakhim , V. Boiko, D. Kolesnik , G. Solyanik (pp I-04) 1st International Conference on Advanced Materials for Bio-Related Applications, AMBRA 2022, 16.05 -19.05.2022, Wrocław, Poland
7. 2D наночастинки дисульфиду молібдену як платформа для візуалізації культур клітин Оленчук М., Афоніна У., Гнатюк О., Монастирський Г., Карахим С., Довбешко Г. (р. 37) XIV Міжнародна конференція по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці 4-5 листопада 2021 р. у м. Києві.
8. Multiscale Imaging of Non-Adherent Tumor Cells: From Optical to Electron Microscopy. International Conference on Excited States of Transition- ESTE 2025. August 24 to 29, 2025, Wrocław, Poland
9. COMPREHENSIVE OPTICAL AND ELECTRONIC IMAGING OF LEWIS LUNG CARCINOMA CELLS Maryna Olenchuk, Olena Gnatyuk, Grygorii Monastyrskyi, Anja Boisen, Zhongyang Zhang, Denis Kolesnyk, Galina Solyanik, Sergiy Karakhim, Galyna Dovbeshko. I Всеукраїнська наукова інтернет-

конференція з міжнародною участю «Фундаментальні підходи та інновації в хімії», 5 червня 2025, Черкаси, Україна, ст.34.

10. High-resolution CEM microscopy for studying liposomes and model circulating tumor cells incubated with MoS₂ and WS₂ nanoparticles. 9th International Conference “NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects”. 6-9 October 2025, Kharkiv, Ukraine

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Робота виконувалась у відділі Фізики біологічних систем, Інституту фізики Національної академії наук України в рамках тем:

1.4.В/196, Державний реєстраційний номер 0118U003377, Фізичні ефекти та механізми взаємодії біологічних молекул та надмолекулярних біологічних систем з наночастинками та наноструктурованими середовищами (2018-2022 рр)

1.4. В/218, Державний реєстраційний номер: 0123U100990, Фізичні ефекти та молекулярні механізми взаємодії біологічних молекул та біологічних систем різного рівня структурної організації з малими молекулами, нанорозмірними та супрамолекулярними комплексами (2023-2027 рр)

2022-2025 - НФДУ 2021.01/0229 “Біофізичні характеристики циркулюючих метастатичних клітин як потенційних мішеней антиметастатичної терапії».

2020-21, 2023 - НФДУ № 2020.02/0027, «Низькорозмірні графеноподібні дихалькогеніди перехідних металів з контрольованими полярними та електронними властивостями для перспективних застосувань у наноелектроніці та біомедицині»

За матеріалами дисертації опубліковано 5 наукових робіт у фахових міжнародних та українських наукових журналах, що індексуються в наукометричних базах даних Scopus та Web of Science та 9 тез доповідей на українських та міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг роботи

Дисертація містить вступ, п'ять розділів та висновки. Повний обсяг дисертації складає 169 стор., що містить 59 рисунки, 3 таблиці. Список використаних літературних джерел - 169 найменування на 16 сторінках

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ

1. Optical and electron microscopy imaging of model circulating tumour cells. M. Olenchuk¹, G. Monastyrskyi , O. Gnatyuk , A. Boisen , Z. Zhang , G. Solyanik , D. Kolesnyk , S. Karakhim , G. Dovbeshko , Biophysical Bulletin. 2025;53:46–59. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-04> (Q4)

2. The influence of WS₂ 2D NPs on the liposomes formation, morphology and spectral properties , Journal of Molecular Structure (PREPRINT) Olena P Gnatyuk, Maryna V. Olenchuk, Grygorii P. Monastyrskyi, Yurii M. Barabash, Ievgen V. Gubareni, Ganna V. Levchenko, Andrii S. Nikolenko, Anatoliy S. Tolochko, Ihor M. Kupchak, Galyna I. Dovbeshko . January 2025, DOI: [10.2139/ssrn.5196556](https://doi.org/10.2139/ssrn.5196556) (Q2)

3. MoS₂ 2D nanoparticles as inducers of changes in liposomes formation and their spectroscopic properties G. Monastyrskyi, O. Gnatyuk, I. Gubareni, G. Levchenko, A. Nikolenko, M. Olenchuk, A. Tolochko, I. Kupchak, and G. Dovbeshko , Low Temperature Physics, 2025, Vol. 51, No. 2, pp. 287–299 , <https://doi.org/10.1063/10.0035414> (Q3)

4. Effect of 2D-WS₂ Nanoparticles on a Local Electrical Field at a Membrane Vicinity: Vibrational Spectroscopy Data , Galina I. Dovbeshko , Ulyana K. Afonina Marina V. Olenchuk , Ihor M. Kupchak , Olena P. Gnatyuk , Grygorii P. Monastyrskyi , Andrii S. Nikolenko , Hanna V. Shevlyakova and Anna M. Morozovska Journal of Physical Chemistry C, 2024, 128(3), pp. 1131–1138 <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c05693> (Q2)

5. Transient processes in electric transport in the powder MoS₂ samples, V. V. Vainberg, O. S. Pylypchuk, V. N. Poroshin, M. V. Olenchuk, G. I. Dovbeshko, and

G. P. Monastyskyi, Journal of Applied Physics 131, 234301 (2022);
<https://doi.org/10.1063/5.0090012> (Q2)

6. Magnetic properties of MoS₂ and WS₂ powders Andrii Bodnaruk, Grygorii Monastyrskyi, Valerii Bykov, Maryna Olenchuk, Galyna Dovbeshko Proceedings of the 2022 IEEE 41th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO) (p 91) (SJR 0.174, H-Index 12) DOI: [10.1109/ELNANO54667.2022.9927028](https://doi.org/10.1109/ELNANO54667.2022.9927028)

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ВСТУП.....	6
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ	12
ЗМІСТ	14
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	17
1.1. Опис клітинних мембран та їхніх функцій	18
1.2. Ліпідні рафти і мікродомени	26
1.3. Використання ліпосом як модельних мембран і систем доставки ліків.....	30
1.4. Використання наноматеріалів для дослідження мембран	33
1.5. Підсумки Розділу 1	37
РОЗДІЛ 2: МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	39
2.1 Метод інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (FTIR).....	39
2.2 Спектроскопія комбінаційного розсіювання	48
2.3 Люмінесцентна спектроскопія	55
2.4. Методи оптичної мікроскопії.....	61
2.5. Скануюча електронна мікроскопія та енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія	65
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ДВОВИМІРНИХ НАНОСТРУКТУР ДИХАЛЬКОГЕНІДІВ ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ WS₂ ТА MOS₂.....	75
3.1. Скануюча електронна мікроскопія та енерго-дисперсійний аналіз наноматеріалів WS ₂ та MoS ₂	75
3.2 Електричні та магнітні властивості MoS ₂ та WS ₂	88
3.4. Висновки до Розділу 3.....	91
РОЗДІЛ 4. СПЕКТРОСКОПІЧНІ І МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ МОДЕЛЬНИХ МЕМБРАН ТА ЇХ ВЗАЄМОДІЇ З НАНОЧАСТИНКАМИ MOS₂ ТА WS₂	92
4.1. Характеризація модельних мембран- ліпосом.....	92
4.1.1. Створення модельних ліпосом	94
4.2. Спектроскопічні дослідження систем з модельними мембранами	99
4.3. Мікроскопічні дослідження морфології та взаємодій в модельних системах	110
4.4. Аналіз механізмів взаємодії.....	126
4.5. Висновки до Розділу 4.....	128

РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНИХ ПЕРЕБУДОВ У	
МЕМБРАНАХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ	
ЛЬЮІС	129
5.1. Клітини карциноми легені Льюїс та їх пробопідготовка.....	129
5.2. Флуоресцентна мікроскопія клітин LLC	130
5.3. Конфокальна мікроскопія клітин LLC	131
5.4. Скануюча електронна мікроскопія клітин LLC	136
5.5. Висновки до Розділу 5.....	150
ВИСНОВКИ	151
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	153

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

TMDC - Дихалькогеніди перехідних металів

2D-MoS₂ — двовимірні наночастинки дисульфиду молібдену

2D-WS₂ — двовимірні наночастинки дисульфиду вольфраму

DOPC- фосфоліпід 1,2-діолеїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін,

LLC — клітини карциноми легені Льюїса (Lewis Lung Carcinoma)

FTIR — ІЧ Фур'є-спектроскопія (Fourier-transform infrared spectroscopy)

Raman spectroscopy — Спектроскопія комбінаційного розсіювання, або ж спектроскопія раманівського розсіювання

CEM — скануюча електронна мікроскопія (Scanning Electron Microscopy)

EDS — енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)

DLS — динамічне розсіювання світла (Dynamic Light Scattering)

CARS — когерентне антистоксове розсіювання (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering)

SERS – (Surface enhanced Raman spectroscopy) Підсилена поверхнею раманівська спектроскопія

SEIRA – (Surface enhanced infrared absorption) Підсилене поверхнею інфрачервоне поглинання

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Клітинні мембрани є одними з найважливіших органел клітини, що захищають клітину від зовнішнього середовища, виконують роль селективного бар'єра, підтримують її цілісність і забезпечують взаємодію з оточенням [7,8]. Вони не лише відмежовують внутрішній простір клітини від міжклітинного середовища, а й регулюють транспорт іонів та молекул, беруть участь у передачі сигналів та визначають просторову організацію внутрішньоклітинних структур.

Вивчення клітинних мембран, є одним із важливих завдань сучасної біофізики, оскільки саме мембрана, формує первинний рівень регуляції клітинного гомеостазу. Її основу становить подвійний ліпідний бішар, у який інтегровані білки та вуглеводні залишки [9–11]. Така архітектура забезпечує поєднання бар'єрних, транспортних та сигнальних функцій, а також визначає механічні й електростатичні властивості клітини.



Рис.1 Модельне зображення мембрани

Завдяки розвитку високороздільних методів візуалізації — флуоресцентної, атомно-силової та електронної мікроскопії — стало можливим безпосереднє спостереження мембранних компонентів і процесів, що визначають поведінку клітин [13,14]. Це дало змогу деталізувати уявлення про роль кривини, асиметрії та локальної сегрегації компонентів у структурно-функціональній організації мембран. Сучасні дослідження показали, що взаємодія ліків, наночастинок та інших агентів з мембранами визначається не лише хімічною природою мембран, а й мікродоменою організацією, структурними змінами та механотрансдукцією. Встановлено, що саме ці фактори значною мірою впливають на ефективність фармакологічних систем доставки та біосумісність наноматеріалів [12].

Розвиток нанотехнологій відкрив нові підходи до створення біоміметичних систем і синтетичних мембран [15–17]. Проте, на відміну від складних природних мембран, ці моделі мають спрощену будову і використовуються передусім для відтворення окремих функцій, зокрема контрольованої доставки лікарських речовин. Фізико-хімічні механізми, що лежать в основі функціонування природних мембран, залишаються предметом активних досліджень.

1.1.Опис клітинних мембран та їхніх функцій

Клітинні мембрани являють собою динамічну та багатофункціональну структуру, яка складається з тонкого (~5–10 нм) еластичного ліпідного бішару. Її архітектура формується за рахунок гідрофобних взаємодій між неполярними хвостами фосфоліпідів, Рис.2, які орієнтуються один до одного, уникаючи контакту з водним розчином, тоді як полярні гідрофільні головки орієнтуються назовні, до водного середовища



Рис.2 Схематичне зображення мембрани

Ця самоорганізація призводить до створення динамічної двошарової структури. Текучість залежить від температури, насиченості жирних кислот фосфоліпідів і вмісту холестеролу, і є критично важливою для таких процесів, як міграція білків, ендоцитоз та екзоцитоз. Мембрана бере участь у транспорті макромолекул через утворення везикул: під час ендоцитозу клітина поглинає речовини, а екзоцитоз забезпечує виведення вмісту везикул назовні, що має значення для секреції гормонів та видалення продуктів метаболізму [10].

Ключова функція мембрани полягає у забезпеченні вибіркової проникності, що визначається термодинамічними та кінетичними факторами. Ліпідний бішар дозволяє проходження гідрофобних молекул і малих нейтральних молекул, таких як O_2 та CO_2 , шляхом простої дифузії, яка підпорядковується законам дифузії, де рух частинок відбувається за градієнтом їх концентрації або парціального тиску. Однак, для полярних молекул, іонів та макромолекул гідрофобне ядро мембрани є практично непроникним. Для таких частинок існують спеціалізовані білкові канали та

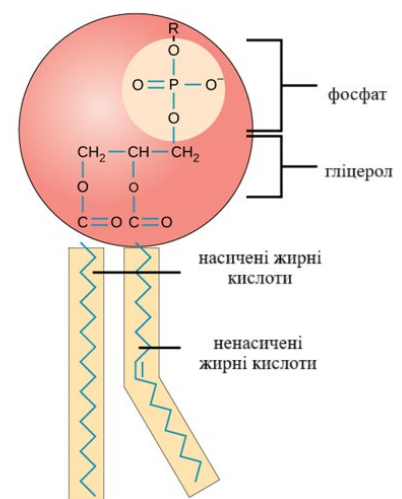
переносники, які полегшують їхній рух крізь мембрану. Ці білки, вбудовані у фосфоліпідний бішар, створюють специфічні гідрофільні шляхи, які знижують енергетичний бар'єр для переміщення речовин. Це явище, є пасивним процесом, де рушійною силою залишається градієнт електрохімічного потенціалу. Активний транспорт, на відміну від пасивного, дозволяє переміщувати речовини проти їхнього електрохімічного градієнта, що вимагає зовнішньої енергії, зазвичай від гідролізу АТФ [7,8,10].

Мембрана також забезпечує міжклітинну адгезію, що є необхідною умовою для формування тканин. Спеціалізовані білкові комплекси, утворюють зв'язки між сусідніми клітинами, а також між клітинами та позаклітинним матриксом. Ці зв'язки надають тканинам механічної міцності та забезпечують їхню структурну цілісність

Таким чином, клітинна мембрана — це складна, багатофункціональна структура, що поєднує фізичні властивості ліпідів з біохімічною активністю вбудованих білків [8, 11, 17, 19]. Вона регулює обмін речовин, підтримує гомеостаз, забезпечує клітинну комунікацію, розпізнавання та структурну цілісність, що робить її центральним елементом у життєдіяльності кожної клітини та організму в цілому.

1.1.1. Склад мембрани, структурні форми та властивості

Ліпіди є основними структурними компонентами клітинної мембрани, формуючи її базовий каркас і забезпечуючи її фізико-хімічні властивості. Серед них центральне місце займають фосфоліпіди [43,44], які разом з холестерином, сфінголіпідами та гліколіпідами формують двошаровий бар'єр між клітиною і навколишнім середовищем



Фосфоліпіди, Рис4, складаються з гідрофільної (полярної) "голівки", яка взаємодіє з водним середовищем, та двох гідрофобних (неполярних) жирнокислотних хвостів, що взаємодіють один з одним усередині мембрани [43,44]. Ця амфіфільна природа зумовлює самозбірку фосфоліпідів у бішар у водному середовищі. Загальна формула: $\text{CH}_2\text{-O-COR}_1$, CH-O-COR_2 , $\text{CH}_2\text{-O-PO}_4\text{-X}$

- R_1 , R_2 — залишки жирних кислот (насичених або ненасичених).

Рис.3. Структура фосфоліпиду [142]

- X — полярна група (наприклад, холін, етаноламін, серин, інозитол).
- Структура: молекула фосфоліпиду складається з гліцеролу, до якого приєднані дві жирні кислоти та фосфатна група з полярним компонентом. Це забезпечує амфіфільні властивості молекули: гідрофільну «голівку» та гідрофобні «хвости».

Сфінголіпіди, які містять сфінгозинову основу замість гліцеролу, зосереджені в певних мікродоменах, зокрема в ліпідних рафтах, і беруть участь у сигнальних процесах та міжмембранній взаємодії [46]

Загальна формула: $\text{R-CH(OH)-CH(NH-COR')CH}_2\text{OH}$, де R — алкільний або алкенільний ланцюг сфінгозину. R' — залишок жирної кислоти.

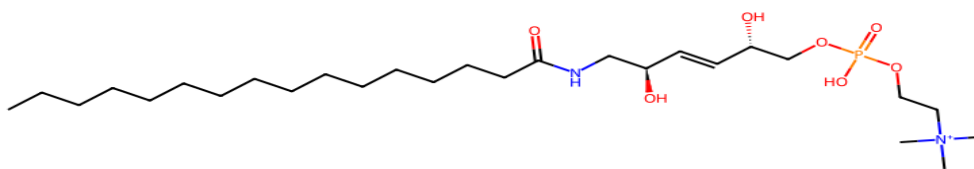


Рис.3.1 Структура сфінголіпідів

Структура: Сфінголіпіди, Рис.3.1, базуються на сфінгозині — аміноспирті з довгим вуглецевим ланцюгом. До нього приєднується жирна кислота, утворюючи керамід, який може зв'язуватися з фосфатною або вуглеводною групою

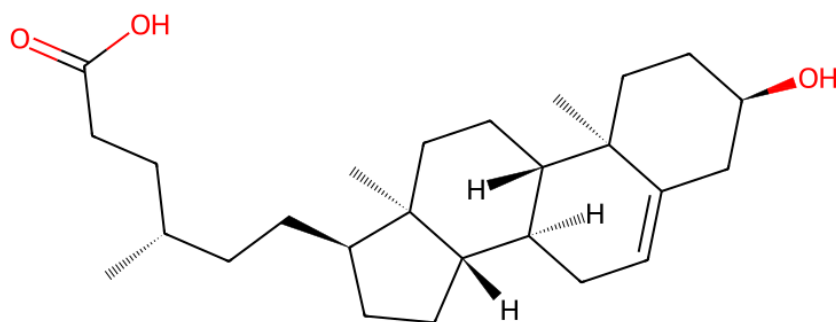


Рис.3.2 Структура холестеролу

Холестерол, Рис.3.2, розташовується між фосфоліпідними хвостами і відіграє ключову роль у регуляції текучості мембрани, підвищенні стабільності бішару та зменшенні проникності для дрібних молекул. У мембранах плазматичного типу холестерин може становити до 30–50% усіх ліпідів. Молекулярна формула: $C_{27}H_{46}O$. Структура: Холестерол складається з чотирьох злитих вуглецевих кілець (стероїдне ядро), гідроксильної групи (-OH) та короткого вуглеводневого ланцюга [45]. Гідроксильна група взаємодіє з гідрофільними головками фосфоліпідів, а стероїдне ядро — з гідрофобними хвостами [47-56].

Гліколіпіди, Рис.3.3, мають вуглеводний компонент і виступають переважно на зовнішній стороні мембрани. Вони відіграють роль у клітинному розпізнаванні, імунних реакціях та взаємодії з позаклітинним матриксом [49].

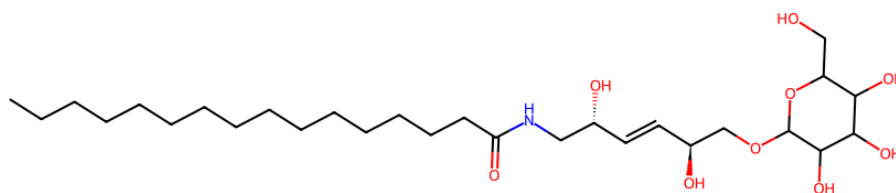


Рис.3.3. Структура гліколіпідів

Загальна формула: $R-CH(OH)-CH(NH-COR')CH_2O-Sugar$

- R — алкільний або алкенільний ланцюг сфінгозину
- R' — залишок жирної кислоти.
- Sugar — вуглеводний компонент (наприклад, глюкоза, галактоза)

Гліколіпіди складаються з цераміду, до якого приєднаний вуглеводний залишок. Вони локалізуються на зовнішній стороні клітинної мембрани та беруть участь у клітинному розпізнаванні та міжклітинній взаємодії [50,51]

Ці ліпіди разом формують основу клітинних мембран, забезпечуючи їхню структурну цілісність, текучість та функціональність

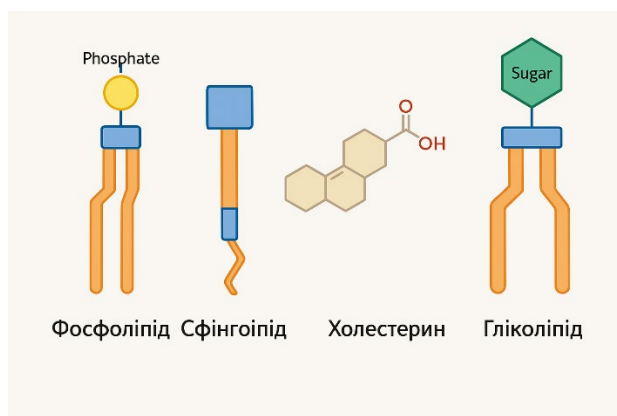


Рис.4. Схематичне зображення структури ліпідів мембрани

Розподіл ліпідів у мембрані не є випадковим: спостерігається асиметрія між зовнішнім та внутрішнім шарами. Узгоджена дія фосфоліпідів і допоміжних ліпідів забезпечує не лише фізичну бар'єрну функцію, а й участь

у таких процесах, як фагоцитоз, мембранна трансдукція сигналу, ендо- і екзоцитоз, а також формування доменів для рецепторів і ферментів [52,53]

Також холестерол забезпечує необхідну гнучкість мембрани, дозволяючи їй швидко адаптуватися до змін зовнішнього середовища [57]. Це особливо важливо для клітин, що активно змінюють свою форму або місцезнаходження

Сфінголіпіди. Сфінголіпіди, такі як сфінгомієлін та гліколіпіди, є ключовими компонентами ліпідних рафтів. Вони мають довгі насичені ацильні ланцюги, які сприяють тісному пакуванню ліпідів та утворенню стабільних структур [58].

Гліколіпіди. Гліколіпіди, такі як гангліозиди, відіграють важливу роль у функціонуванні ліпідних рафтів. Вони беруть участь у міжклітинній взаємодії, сигналізації та формуванні мембранних доменів [59].

Фосфоліпіди. Хоча фосфоліпіди з ненасиченими ацильними ланцюгами є менш поширеними в ліпідних рафтах, вони все ж таки присутні. Насичені фосфоліпіди, такі як фосфатидилхолін та фосфатидилетаноламін, можуть взаємодіяти з холестерином та сфінголіпідами [60], утворюючи стабільні домени. Ці ліпіди є важливими для підтримання структурної цілісності та функціонування рафтів.

Сучасні уявлення про архітектуру клітинних мембран базуються на рідинно-мозаїчній моделі Сінгера та Ніколсона (1972) [9], яка описує їх як подвійний фосфоліпідний шар з інтегрованими білками та вуглеводами. Мембрана має асиметрію між зовнішнім і внутрішнім моношарами, що проявляється як у розподілі ліпідів, так і в електростатичному профілі: негативно заряджені ліпіди переважно локалізовані у внутрішньому моношарі, створюючи різницю потенціалів, що впливає на розташування білків і взаємодії з цитоскелетом.

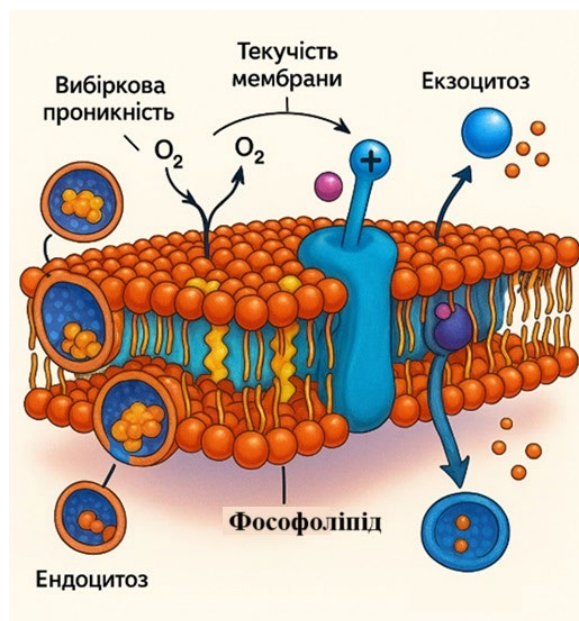


Рис. 5. Функціональна динаміка і компоненти мембрани

Важливим доповненням стала еластична, або гнучка, модель, що виникла у 1970-х роках у працях Хельфріха та інших авторів [11]. У ній мембрана розглядається як тонка пружна плівка з певним модулем згинання, здатна до деформацій без розриву бішару. В енергетичному підході описано спонтанну кривину, середню й гаусову кривину поверхні, що дозволило пояснити рівноважні форми клітин та везикул, а також механізми утворення трубочок і інвагінацій [12–14].

Подальший розвиток досліджень показав, що мембрана має виражену латеральну гетерогенність [15–18]. Паралельно запропоновано модель „picket-fence”, у якій цитоскелетна мережа поділяє мембрану на компартменти розміром у десятки нанометрів, обмежуючи латеральну дифузію [19]. У результаті сучасна концепція поєднує риси рідинно-мозаїчної моделі з уявленням про багаторівневу ієрархію доменів — від нанорозмірних кластерів до областей, що виникають за участі цитоскелету

Особливості будови мембран різних типів клітин — від еритроцитів до нейронів — визначаються поєднанням ліпідного складу, білкового наповнення та зв’язків з підмембранним скелетом.

Дослідження модельних систем, підтвердили, що кривина, асиметрія та локальна сегрегація компонентів істотно впливають на функціональні властивості мембран. Такі системи дозволяють експериментально перевіряти передбачення результатів моделювання і уточнювати їх, у поєднанні з молекулярною динамікою, яка дає змогу описувати наномасштабні явища — від поведінки окремих ліпідів до формування стабільних доменів.

Таким чином, розуміння особливостей будови клітинних мембран виходить далеко за рамки початкової мозаїчної моделі, включаючи складну багаторівневу організацію, де локальна структура визначає механіку, електростатику та динаміку всієї мембранної системи [20,21].

1.2. Ліпідні рафти і мікродомени

Ліпідні рафти — це мікродомени клітинних мембран, що як правило, складаються специфічних ліпідів, зокрема сфінголіпідів і холестерину. Вони відіграють важливу роль в організації мембранної структури клітини та виконанні низки біологічних функцій, таких як сигнальна трансдукція, міжклітинна комунікація, транспортування та взаємодія з зовнішнім середовищем [23].

Рафтові ділянки мембрани мають властивості рідино-впорядкованої фази (liquid-ordered phase) [24] і здатні витіснити менш впорядковані ділянки, утворюючи функціональний поділ фаз.

Холестерол взаємодіє з фосфоліпідами та гліколіпідами, змінюючи їхню конформацію та сприяючи організації в мембрані [25]. Сфінголіпіди й глікосфінголіпіди завдяки довгим насиченим гідрофобним ланцюгам легко взаємодіють між собою та з мембранними білками, що забезпечує стабільність і функціональність рафтів.

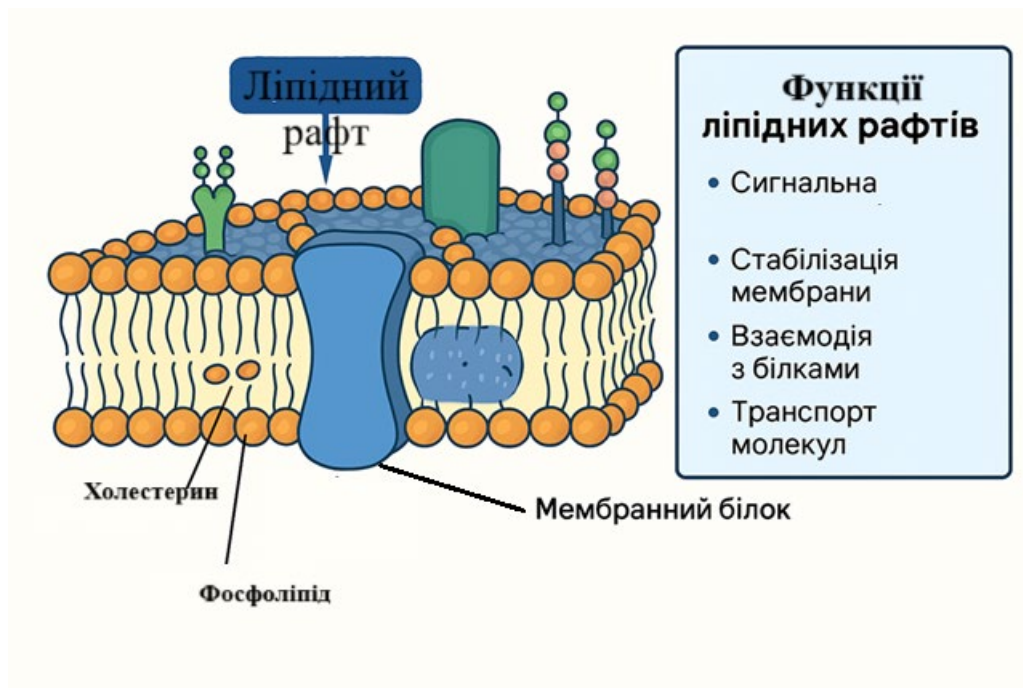


Рис. 6. Схематичне зображення рафтів

Ліпідні рафти функціонують як сигнальні платформи, концентруючи сигнальні молекули та забезпечуючи ефективну передачу сигналів через мембрану. Завдяки своєму унікальному складу, вони здатні взаємодіяти з різними сигнальними білками, зокрема з рецепторами, кіназами та адаптерними білками.

Ліпідні рафти відіграють важливу роль у мембранному транспорті, зокрема в процесах ендоцитозу та екзоцитозу. Вони беруть участь в утворенні спеціалізованих везикул, що забезпечують перенесення білків, ліпідів та інших молекул у клітину та з клітини.

Ліпідні рафти відіграють ключову роль у захисних механізмах клітини проти патогенів. Вони здатні концентрувати мембранні рецептори, які розпізнають патогенні молекули, та активувати сигнальні шляхи, пов'язані з імунною відповіддю [27], де їхня активність та взаємодія з адаптерними білками значно посилюється

Водночас, деякі бактерії та віруси (наприклад, ВІЛ-1, грип, віруси герпесу) використовують ліпідні рафти як "точки входу" в клітину. Вони експлуатують ці мікродомени для прикріплення, злиття з мембраною або

проникнення за допомогою ендоцитозу, що підкреслює важливість ліпідних рафтів у взаємодії патоген — клітина-хазяїн [28]

Активація сигнальних шляхів може супроводжуватися суттєвими змінами у складі та структурі ліпідних рафтів. Наприклад, зв'язування ліганду з рецептором у рафті може спричинити агрегацію цих мікродоменів, зміну білково-ліпідної взаємодії або навіть дисоціацію рафтових структур.

Ліпідні рафти також беруть участь у міжклітинній взаємодії, зокрема в утворенні адгезивних контактів. Наприклад, кадгерини — трансмембранні білки, які забезпечують міжклітинну адгезію в епітеліальних тканинах — локалізуються в межах ліпідних рафтів. Там вони формують функціональні комплекси з катенінами, що сприяє стабільному з'єднанню клітин і передачі механічних сигналів

Ліпідні рафти відіграють вирішальну роль у формуванні імунологічного синапсу, що забезпечує ефективну передачу сигналу й ініціацію імунної відповіді [29]. У порівнянні з основною плазматичною мембраною, ліпідні рафти мають більш щільну, упорядковану структуру, збагачену насиченими сфінголіпідами та холестеринном. Це робить їх менш текучими та більш в'язкими, що забезпечує селективну інтеграцію певних білків.

Динаміка рафтів забезпечується латеральною мобільністю ліпідів і білків у плазматичній мембрані, а також здатністю до агрегації та дисоціації залежно від функціональних потреб клітини [36,37]

Вплив зовнішніх фізико-хімічних чинників:

- Температура. Підвищення температури може дестабілізувати впорядковану структуру рафтів, призводячи до їх розпаду або зменшення площі. Натомість зниження температури стабілізує рідино-впорядковану фазу, сприяючи агрегації мікродоменів
- рН середовища. Зміни кислотності можуть впливати на заряд мембранних білків і ліпідів, змінюючи їхню взаємодію. За певних умов це може викликати перерозподіл білків або навіть структурну перебудову рафтів

- Йонні взаємодії . Концентрація йонів (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+}) може змінювати електростатичні взаємодії між білками та ліпідами, впливаючи на цілісність і розмір рафтів.

Вплив внутрішньоклітинних сигналів

- Активація рецепторів. Ліганд-залежне зв'язування з рецепторами, особливо рецепторами тирозинкіназ (RTK) або GPCR, може ініціювати перебудову рафтів, зокрема шляхом рекрутування адаптерних білків, кіназ та ферментів до цих мікродоменив
- Фосфорилування білків. Посттрансляційна модифікація білків, зокрема тирозинове або серин/треонінове фосфорилування, змінює їхню локалізацію, афінність до ліпідів і взаємодію з іншими білками. Це може призводити до реорганізації молекул у межах рафту
- Реорганізація актинового цитоскелету також впливає на формування або стабільність рафтів, особливо під час формування імунологічного синапсу або ендоцитозу.[30-35]

Завдяки здатності перебудовуватись і адаптуватись, ліпідні рафти виконують унікальну роль у підтриманні клітинного гомеостазу та забезпечують цілісність складних сигнальних мереж. Розміри ліпідних рафтів варіюють у широкому діапазоні — від приблизно 10 до 300 нм — залежно від типу клітини, фізіологічного стану, середовища, а також методу дослідження [38-42, 58]. Важливу роль відіграє й тимчасовість існування деяких доменів, що ускладнює їх точну фіксацію. Через це дослідники оперують термінами "нанодомени" для малих нестабільних кластерів і "макродомени" для стабільних, агрегованих структур.

Відомо, що деякі маркерні білки можуть локалізуватись у рафтах і слугувати індикаторами їх розміру. На основі цих підходів, площа, зайнята ліпідними рафтами, може досягати до 50% поверхні плазматичної мембрани [42], якщо враховувати всі стійкі мікродомени.

1.3. Використання ліпосом як модельних мембран і систем доставки ліків

Ліпосоми являють собою сферично закриті везикули, що складаються з одного або кількох фосфоліпідних подвійних шарів, які спонтанно утворюються у водному середовищі. Ці структури, як правило, діаметром від 50 до 500 нм, були вперше виявлені Бенгамом [61] і його колегами в 1960-х роках і з того часу, стали найбільш дослідженими носіями наноліків у системах цільової доставки.

Структура ліпосом, Рис.7 відображає архітектуру клітинних мембран, що містить амфіфільні фосфоліпіди з гідрофільними головними групами, орієнтованими на водні фази, і гідрофобними хвостами, що утворюють двошарову внутрішню частину [65, 71].

Ця структурна організація надає ліпосомам важливу характеристику — здатність інкапсулювати як гідрофільні, так і гідрофобні терапевтичні агенти. Ліпофільні препарати можуть бути захоплені фосфоліпідними подвійними шарами або адсорбовані на поверхні ліпосом, тоді як гідрофільні сполуки можуть бути інкапсульовані у внутрішньому водному шарі везикул. Ця універсальність дозволяє ліпосомам служити носіями для різноманітних терапевтичних корисних навантажень, включаючи низькомолекулярні ліки, пептиди, білки та нуклеїнові кислоти.

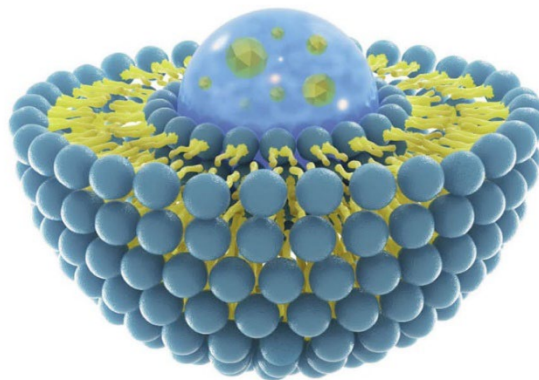


Рис.7 Модельна ліпосома

Окрім здатності переносити ліки, ліпосоми мають кілька переваг, які роблять їх ідеальними засобами доставки ліків. Вони демонструють високу біосумісність і здатність до біологічного розкладання завдяки своєму фосфоліпідному складу, який точно імітує природні клітинні мембрани [71-73]. Крім того, вони демонструють низьку токсичність та імуногенність, забезпечуючи тривале вивільнення ліків і покращені терапевтичні показники порівняно з традиційними препаратами.

Цей біоміметичний підхід дозволяє досліджувати функцію мембрани в експериментально контрольованих умовах. Фармацевтична промисловість використовує ліпосомальні препарати (Рис.8) для різноманітних застосувань, включаючи доставку протиракових, протигрибкових, протизапальних препаратів і терапевтичних генів.

Значний внесок ліпосом в охорону здоров'я підтверджується кількома успішними клінічними продуктами, включаючи Doxil, Ambisome і DepoDur. Ці препарати демонструють, як ліпосомальна інкапсуляція може значно підвищити ефективність ліків, [84] одночасно зменшуючи побічні ефекти, особливо для високотоксичних терапевтичних засобів, таких як хіміотерапевтичні засоби.

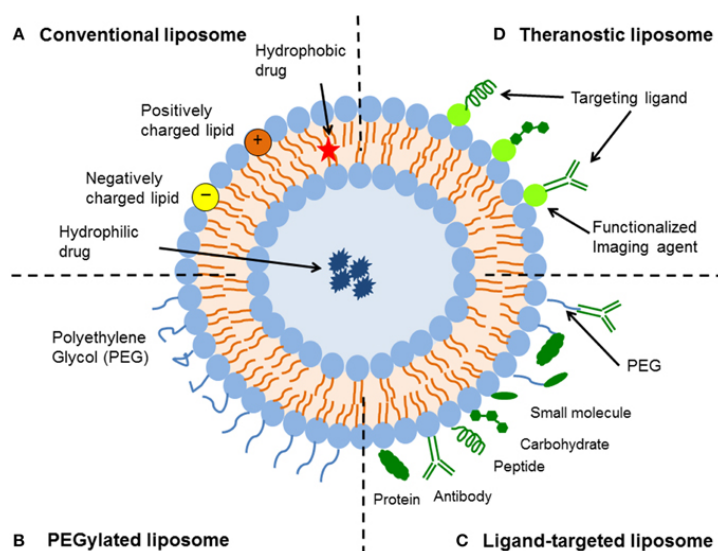


Рис.8. Функціоналізована ліпосома [84]

Ліпосоми дозволяють моделювати поведінку мембран при фазових переходах, вплив холестерину, йонів, білків та лігандів.

Молекулярна динаміка (MD) та флуоресцентна спектроскопія дозволяють оцінити впорядкованість, текучість та гідратацію бішару в ліпосомах. Крім того, використання методів FTIR і Raman дає змогу виявляти специфічні зміни в структури ліпідів, що відбуваються під час фазових переходів. [88,89]

Застосування ліпосом є особливо цінним у фармакології, де вони слугують моделлю для тестування взаємодії ліків з мембранами. Також ліпосоми використовують як носії для доставки лікарських речовин, зокрема протиракових препаратів, що ще більше посилює їхнє значення як інструменту мембранної біофізики [84-89].

Таким чином, ліпосоми — це універсальна модельна система, яка не лише відтворює фізичні властивості клітинних мембран, але й надає гнучкість для їх дослідження в контрольованих умовах.

Поверхневий заряд ліпосом визначає їхню взаємодію з клітинними поверхнями. Вони здатні інкапсулювати як гідрофільні (всередині ядра), так і гідрофобні (у бішарі) речовини, що робить їх універсальними носіями. Функціоналізація поверхні дозволяє спрямовану доставку до конкретних клітин.

Класичні методи виготовлення включають ін'єкцію етанолу, ультразвукову обробку та метод гідратації тонкої плівки [63].

Ліпосоми забезпечують контрольоване вивільнення лікарських речовин, знижуючи побічні ефекти та токсичність. Активне націлення досягається шляхом модифікації поверхні специфічними лігандами. Ліпосоми здатні переносити великі молекули (ДНК, мРНК), що відкриває перспективи для генної терапії. Вони також використовуються для терапевтичної візуалізації у МРТ та рентгені [91,92].

Застосування в медицині:

- Онкотерапія: ліпосомальні форми хіміопрепаратів знижують системну токсичність і підвищують специфічність.
- Генна терапія: інкапсуляція нуклеїнових кислот для доставки в клітини без імунної відповіді.
- Лікування запальних та інфекційних хвороб: спрямована доставка до запаленої тканини, зменшення побічних ефектів.

Крім фармацевтичного застосування, ліпосоми служать ідеальними спрощеними моделями клітинних мембран для вивчення біологічних процесів. Ці моделі дають можливість зрозуміти механізми мембранного транспорту, іонні канали, проникнення ліків, утворення везикул, злиття мембран і функції мембранних білків. Як контрольовані експериментальні системи, ліпосоми дозволяють досліджувати специфічні клітинні процеси та функції макромолекул за певних умов. Відносно простий склад ліпосом, порівняно зі складними біологічними мембранами робить їх ідеальними для виділення та вивчення окремих мембранних явищ. Дослідники можуть систематично змінювати ліпідний склад, модифікації поверхні та умови навколишнього середовища, щоб спостерігати, як ці фактори впливають на поведінку мембрани [84-93].

У випадку розробки модельної системи ліпосом з використанням фосфоліпідів DOPC і DOPE, моделювання показали, що збирання ліпідів здійснюється через короткочасні взаємодії, включаючи електростатичні сили та сили Ван-дер-Ваальса [66]. Аналіз загальної енергії підтверджує стабільність еліптичної структури ліпосом наприкінці процесу моделювання. [15, 76, 78] Таке моделювання дає інформацію про фундаментальні принципи формування та функціонування мембран, допомагаючи подолати розрив між моделями ліпосом *in vitro* та складними біологічними системами.

1.4. Використання наноматеріалів для дослідження мембран

У сучасних біофізичних дослідженнях наноматеріали відіграють важливу роль як інструменти зондування і модифікації клітинних мембран. Їхня взаємодія з ліпідними бішарами принципово відрізняється від дії малих молекул, оскільки включає не лише хімічні, а й фізичні механізми впливу. Наночастинки можуть адсорбуватися на поверхні мембрани або інтегруватися в її товщу, створюючи локальні електростатичні поля, змінюючи кривину та жорсткість бішару. В цих областях багаторазово зростає інтенсивність комбінаційного розсіювання молекул – явище поверхнево-підсиленої раманівської спектроскопії (SERS).

Також, останнім часом, активно почали використовуватись дихалькогеніди перехідних металів в контексті дослідження біомембран. Одне з перспективних застосувань – використання 2D-наноматеріалів як зондів для спектроскопії мембран. Наприклад, створено гібридні наногетероструктури WS_2 –AuNP, що поєднують сильний плазмонний резонанс золота та хімічне підсилення від напівпровідникового WS_2 ; такі платформи показали здатність надчутливо реєструвати раманівські сигнали біомолекул[74-78]. WS_2 може слугувати і як матриця для флуоресцентної мікроскопії та трекінгу: його нанолістки мають флуоресценцію у видимому діапазоні і, прикріплені до мембран, дозволяють візуалізувати динаміку мембрани на наносекундних масштабах (завдяки короткому часу життя збудження).

Використання наноматеріалів у біофізичних дослідженнях відкриває можливості для керованої модифікації структури й функцій клітинних мембран. На відміну від класичних малих молекул, наночастинки взаємодіють із мембраною не лише на хімічному, а й на фізичному рівні, визначаючи локальні електричні поля, кривину й механічну стійкість бішару. Ліпосоми, як модельні мембрани, особливо чутливі до таких впливів і дозволяють реєструвати зміни морфології, спектральних характеристик і проникності у присутності наночастинок.

1.4.1. Структура 2D-дихалькогенідів перехідних металів

Дихалькогеніди перехідних металів (TMDCs, Transition Metal Dichalcogenides) — це клас шаруватих матеріалів із загальною хімічною формулою MX_2 , (Рис.9.) де М — перехідний метал (Mo, W, Ti, Nb тощо), а X — халькоген (S, Se, Te).

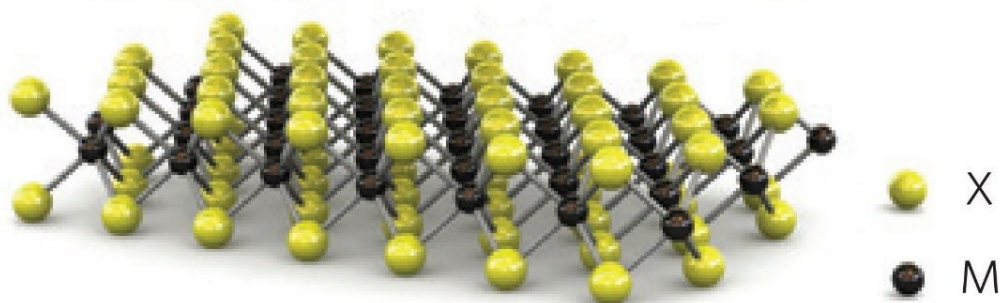


Рис. 9. Структура моношару TMDCs

До найбільш вивчених представників TMDC належать молібден(IV) сульфід (MoS_2) та вольфрам(IV) сульфід (WS_2), які привертають увагу завдяки своїм унікальним електронним, оптичним, магнітним та механічним властивостям у двовимірному стані.

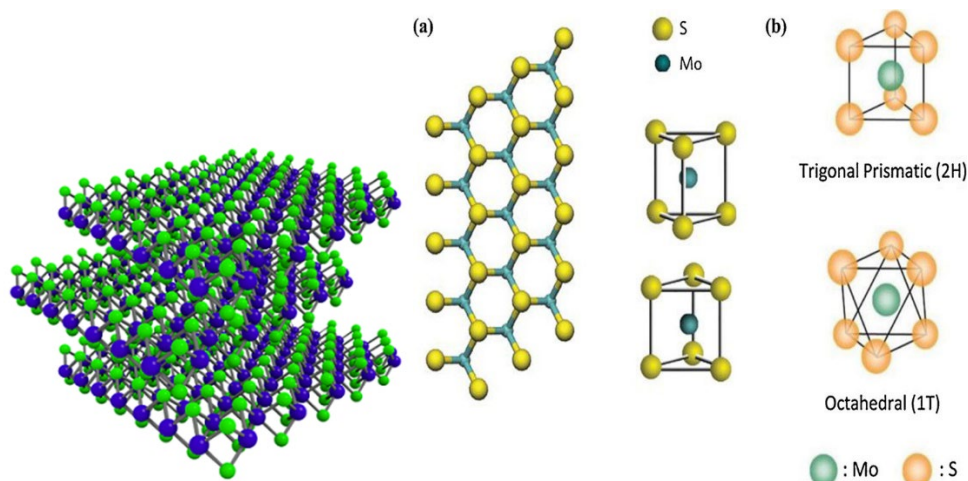


Рис.10. Структура моношарів та комірок дисульфиду молібдену (MoS_2)

У своїй кристалічній формі. Рис.10, TMDC складаються з сандвічоподібних шарів, у яких атоми металу М розташовані між двома

шарами атомів халькогену X, утворюючи тришарову структуру X–M–X. Окремі такі шари з'єднані між собою слабкими ван-дер-ваальсовими силами, що забезпечує можливість механічного або хімічного розшарування до моношарових або кількашарових фрагментів.

Особливу увагу привертає здатність MoS₂ та WS₂ підвищувати стабільність і ефективність лікарських препаратів, сприяти формуванню ліпосом та забезпечувати таргетоване ураження ракових клітин. Одним із найбільш перспективних напрямів використання наночастинок MoS₂ та WS₂ є розробка новітніх систем доставки терапевтичних агентів. Ці наноматеріали демонструють здатність, уникати кліренсу імунною системою, що подовжує їхній час циркуляції в організмі, підвищувати накопичення лікарських засобів у пухлинах завдяки ефекту EPR (Enhanced Permeability and Retention) [74, 75, 107-109]. Окрім онкології, наноструктури MoS₂ і WS₂ виявили себе як ефективні антибактеріальні агенти, здатні руйнувати бактеріальні клітинні стінки через механічне пошкодження та оксидативний стрес, інгібувати ріст як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій.

Наночастинки MoS₂ та WS₂ ефективно поглинають ІЧ-випромінювання і перетворюють його в локалізоване тепло, що дозволяє здійснювати селективне теплове руйнування пухлинних клітин із мінімальним пошкодженням здорових тканин.

Особливу увагу привертає дослідження електричних властивостей MoS₂ у вигляді моно- та кількашарових кристалів, що дозволяє реалізувати контрольований транспорт носіїв заряду як вздовж шару, так і перпендикулярно до нього.

Оскільки TMDC мають малу жорсткість на згин, навіть незначна деформація або коругування шару (до 10%) може призводити до формування локального електричного поля, яке змінює електронну густину і впливає на спектроскопічні сигнали [74- 78, 110, 114, 120]

Таким чином, 2D-TMD матеріали виступають перспективними наноплатформами для дослідження мембран, оскільки дозволяють вивчати:

- зміни локальних електричних полів у системі «наночастинка—мембрана»;
- вплив кривини та поверхневих дефектів на перебудови ліпідного бішару;
- можливість специфічного хімічного зв'язування наночастинок із компонентами мембран.

Водночас залишаються відкритими питання:

1. Механізми проникнення MoS_2 та WS_2 крізь мембрану — пасивна адсорбція чи активне включення.
2. Роль розмірів та морфології наночастинок
3. Залежність структурних перебудов мембран від середовища та стану ліпідів.

1.5. Підсумки Розділу 1

Ліпіди відіграють фундаментальну роль в організації клітинної мембрани. Ліпідні та білкові компоненти мембрани не утримуються разом за допомогою ковалентних взаємодій. Вони являють собою високо мобільні індивідуальні молекули в динамічній рівновазі, які зазнають перехідних взаємодій і організовані в тривимірну супрамолекулярну структуру біологічної мембрани. Завдяки варіаціям у гідрофобних ацильних ланцюгах ліпідів та гідрофільних полярних головних групах, кожен з різних типів ліпідів має широкий спектр структурних варіантів, які в цілому визначають плинність мембрани, бічний тиск, проникність та симетричний або асиметричний поверхневий заряд. Хоча багато відомо про фізико-хімічні властивості окремих видів ліпідів, значно менше відомо про поведінку навіть

простих сумішей ліпідів у пробірці. Важко екстраполювати цю інформацію на біологічні мембрани, що містять білки та складні суміші ліпідів. Ще менш зрозумілим є те, як ці різноманітні фізичні та хімічні властивості перетворюються на біологічну функцію.

Підсумовуючи огляд, підкреслимо ключові пункти:

1. Клітинна мембрана є ключовою органелою клітини, що має бар'єрні, сигнальні та транспортні функції. Її структурна організація визначається балансом водневих і електростатичних взаємодій.

2. Для дослідження мембран використовують спектроскопічні, мікроскопічні методи та моделювання. Невирішеними залишаються питання механізмів структурних перебудов, ролі мікродоменів та впливу наноматеріалів на мембранні процеси.

3. Ліпосоми як модельні системи, відтворюють основні властивості клітинних мембран і дозволяють контрольовано вивчати і моделювати процеси у мембрані без впливу внутрішньоклітинних процесів. Також вони можуть служити носіями для контрольованої доставки ліків та діагностичних засобів.

4. Дисульфіди молібдену (MoS_2) та вольфраму (WS_2), поєднують унікальні електронні, оптичні та поверхневі властивості, зумовлені їхньою шаруватою структурою, стехіометрією і анізотропією. Це робить їх перспективними для дослідження механізмів взаємодії наноматеріалів із біологічними системами.

5. Дослідження модельних та реальних мембран, їх взаємодій із наноматеріалами, дозволить розрізнити фізичні ефекти та складні клітинно-специфічні реакції.

6. Важливим аспектом досліджень є встановлення взаємозв'язку між структурними перебудовами мембран, спектральними та морфологічними характеристиками модельних систем і мембран реальних клітин.

РОЗДІЛ 2: МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Метод інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (FTIR)

Сучасні спектроскопічні методи надають унікальні можливості для дослідження структури та динаміки клітинних мембран. Три ключові методи - інфрачервона, раманівська та люмінесцентна спектроскопія - доповнюють одна одну, дозволяючи отримати комплексну інформацію про молекулярні взаємодії, мембранні білки, динаміку процесів в мембрані [65].

Інфрачервона спектроскопія дозволяє дослідити поглинання ІЧ-випромінювання, пов'язаного з коливальними переходами молекулярних зв'язків. Зокрема ключові характеристики для мембран

- CH_2 -групи ($2850\text{--}2920\text{ см}^{-1}$) – валентні CH_2 коливання
- C=O зв'язки (1735 см^{-1}) – валентні коливання
- PO_2^- зв'язки ($1220\text{--}1240\text{ см}^{-1}$) - асиметричні валентні коливання
- PO_2^- зв'язки ($1100\text{--}1000\text{ см}^{-1}$) - симетричні валентні коливання

Це дозволяє отримати інформацію про структуру ліпідного шару, дослідження впорядкованості, аналіз білково-ліпідних взаємодій

ІЧ-Фур'є-спектроскопія (FTIR) є методом, в якому спектральна інформація отримується шляхом математичного перетворення інтерферограми — сигналу, зафіксованого в часі або як функція зміщення дзеркала в інтерферометрі. На відміну від традиційних дисперсійних спектрометрів, FTIR-спектрометри належать до багатоканальних приладів: вони забезпечують одночасний збір даних в широкому діапазоні довжин хвиль, що значно підвищує швидкість і чутливість вимірювань [65, 71, 77, 138].

Основним компонентом FTIR-спектрометра, Рис.11 є інтерферометр Майкельсона. Інфрачервоне випромінювання від джерела, як правило глобара (SiC), спрямовується на напівпрозору світлоподільну пластинку, виготовлену з KBr , покриту тонким шаром Ge . Це забезпечує поділ світлового потоку на два промені: один відбивається до нерухомого дзеркала, інший проходить крізь

пластинку до рухомого дзеркала. Після відбиття обидва промені повертаються, знову об'єднуються на світлоподільнику, і спрямовуються на детектор.



Рис.11 FTIR спектрометри Tensor 27 (Bruker) та Bruker INVENIO-R з Bio-ATR приставкою

Оскільки довжина оптичного шляху одного з променів змінюється внаслідок руху дзеркала, на виході виникає інтерференційний сигнал, або інтерферограма. У випадку монохроматичного випромінювання інтенсивність сигналу змінюється з періодом, що визначається довжиною хвилі. У разі поліхроматичного джерела інтерферограма є суперпозицією гармонік, кожна з яких відповідає окремій довжині хвилі. За допомогою швидкого перетворення Фур'є (FFT) ця інтерферограма трансформується у спектр поглинання або пропускання зразка [65, 71, 137].

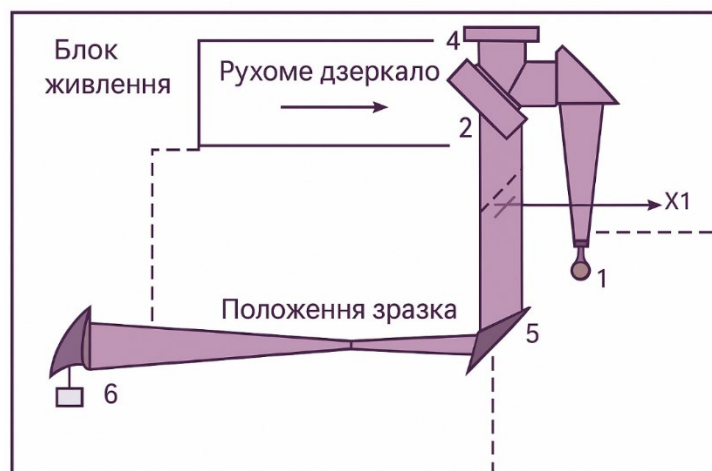


Рис.12 Принципова оптична схема спектрометра

Наприклад, у спектрометрі Tensor 27 та INVENIO (Bruker, Німеччина) (Рис.11,12) Інфрачервоне випромінювання від джерела 1 (глобар SiC з водяним охолодженням) спрямовується на напівпрозору світлоподільну пластинку 2 (KBr з шаром Ge), де поділяється на два пучки. Один з них відбивається до нерухомого дзеркала 4, інший — до рухомого. Після відбиття обидва пучки знову об'єднуються, утворюючи інтерференційну картину, яка фіксується детектором 6. Така конструкція дозволяє проводити точні та відтворювані вимірювання навіть для зразків з низькою інтенсивністю сигналу або складним спектральним профілем.

В сучасних FTIR-спектрометрах для точного контролю переміщення дзеркала в інтерферометрі та визначення різниці ходу променів застосовується допоміжне джерело монохроматичного випромінювання, найчастіше — гелій-неоновий (He-Ne) лазер. Його стабільне та вузькосмугове випромінювання дозволяє точно відстежувати інтерференційну картину, створювану при русі дзеркала. Запис інтерферограми основного ІЧ-випромінювання ведеться дискретно — по точках, що відповідають мінімумам лазерної інтерферограми, завдяки чому досягається висока роздільна здатність за хвильовим числом [65, 71, 137]

Відстань між сусідніми мінімумами лазерної інтерферограми (Δx) визначається довжиною хвилі випромінювання лазера. Оскільки положення кожної точки інтерферограми основного сигналу чітко прив'язується до лазерного еталона, метрологічна точність у визначенні хвильового числа ($\Delta \nu$) відповідає просторовому розділенню Δx . У типових FTIR-спектрометрах вона досягає величини порядку 0.01 см^{-1} , що є значною перевагою цього методу. Цей ефект високої точності у визначенні спектральних позицій відомий як *Connes advantage* (виграш Конна) [143]

Щодо розташування зразка в оптичній схемі FTIR-спектрометра, існують два основних підходи: встановлення зразка в одному з плеч інтерферометра або на виході, після об'єднання пучків. У більшості комерційних приладів реалізується друга схема — зразок розташовується після

інтерферометра, де пучки вже змішані, що дозволяє уникнути спотворень інтерференційної картини та спрощує конструкцію приладу.

Для отримання спектру пропускання FTIR-спектрометри використовують послідовну схему вимірювання, що включає три основні етапи:

Фонове вимірювання: реєстрація інтерферограми у відсутності зразка. З отриманої інтерферограми методом швидкого перетворення Фур'є (FFT) розраховується спектр фону $R(\nu)$, який відображає спектральні характеристики джерела та оптики.

Спектр зразка: аналогічна процедура проводиться зі зразком, розміщеним у кюветі або в пучку. У результаті отримаємо спектр $S(\nu)$, який характеризується зниженням інтенсивності в областях, де відбувається поглинання випромінювання зразком.

Обчислення спектру пропускання: спектр пропускання $T(\nu)$ визначається як відношення спектра зразка до спектра фону:

$$T(\nu) = \frac{S(\nu)}{R(\nu)}$$

Цей підхід дозволяє усунути вплив інструментальних факторів та забезпечити високу точність і відтворюваність у спектральному аналізі

Фур'є-спектроскопія ґрунтується на математичному зв'язку між інтерферограмою — функцією інтенсивності світлового сигналу як залежності від оптичної різниці ходу δ — і спектром випромінювання як функцією хвильового числа σ (або частоти). Цей зв'язок описується через пряме та обернене перетворення Фур'є. Іншими словами, виміряна інтерферограма є фур'є-образом реального спектра, і навпаки, спектр може бути відновлений з інтерферограми за допомогою зворотного перетворення

Основна теорема, яка лежить в основі Фур'є-інтерферометрії, стверджує, що електричне поле $E(\delta)$ в інтерферометрі, як функція зміщення дзеркала, є фур'є-перетворенням електричного поля у частотній області $E(\sigma)$. Якщо сигнал є дійсним і лінійним (тобто дотримано принципу суперпозиції),

то вся інформація про спектр випромінювання закладена в інтерференційній картині

У випадку ідеального інтерферометра та в одновимірному наближенні, основне рівняння Фур'є-спектроскопії має вигляд:

$$B(\sigma) = \int_{-\infty}^{\infty} [I(\delta) - \frac{1}{2}I(0)]e^{-2\pi\sigma\delta}d\delta$$

де:

- $B(\sigma)$ — спектральна щільність потоку при хвильовому числі σ , [28]
- $I(\delta)$ — інтерферограма, виміряна як функція оптичної різниці ходу δ
- $I(0)$ — інтенсивність сигналу при нульовій різниці ходу (центр інтерферограми).

Віднімання половини значення $I(0)$ компенсує постійну складову сигналу, забезпечуючи симетрію та коректність обчислення спектра. Це перетворення дозволяє виділити частотні компоненти, що утворюють континуальний спектр. Щоб відтворити повний спектр у заданому діапазоні частот, обчислення проводять для кожного значення σ , тобто виконують перетворення Фур'є для всього масиву інтерферограми [173] .

Оскільки інтерферограма завжди дискретизується (через використання лазерного еталона або цифрових перетворювачів), спектральний розрахунок виконується за допомогою швидкого перетворення Фур'є (FFT) — чисельного алгоритму, який дає можливість ефективно розрахувати спектр із заданої кількості точок даних. Цей фундаментальний підхід дозволяє одночасно реєструвати широкий спектральний діапазон з високою роздільною здатністю та точністю. На практиці це забезпечує високу швидкість збору даних, високу чутливість до слабких сигналів і низький рівень шуму, що робить FTIR-спектроскопію одним із найпотужніших методів аналізу органічних, біологічних і неорганічних зразків.

Для отримання спектру випромінювання, у заданому діапазоні хвильових чисел σ , необхідно обчислити спектральні компоненти для кожної точки цього інтервалу. Основне рівняння Фур'є-спектроскопії, що містить

інтеграл від нескінченних меж, описує неперервну функцію спектра. Проте в реальних умовах інтерферограма формується як набір дискретних значень інтенсивності, зібраних на рівновіддалених позиціях оптичної різниці ходу δ . Таким чином, спектр розраховується за допомогою дискретного перетворення Фур'є (DFT)

$$B(k) = \sum_{j=0}^{N-1} A(j\Delta\delta, L) \cdot I(j\Delta\delta) \cdot e^{-2\pi i j k / N}$$

де:

- $I(j\Delta\delta)$ — дискретизована інтерферограма;
- $\Delta\delta$ — крок дискретизації;
- $A(j\Delta\delta, L)$ — аподизаційна функція, яка згладжує кінцеві межі інтервалу $[-L, L]$
- N — кількість точок у записаній інтерферограмі;
- k — індекс хвильового числа у спектральній області.

Обчислення цього перетворення класичними методами потребує великої кількості операцій, що ускладнює їхнє використання при великому обсязі даних. Тому майже всі сучасні FTIR-системи застосовують алгоритм швидкого перетворення Фур'є (Fast Fourier Transform, FFT), запропонований Кулі й Тьюкі у 1965 році. Цей алгоритм істотно підвищує ефективність обчислень, зменшуючи кількість операцій до $O(N \log_2 N)$, за умови, що N — ціла ступінь двійки (тобто $N=2^n$)

Оскільки як інтерферограма, так і спектр є дійсними величинами (тобто не мають уявної складової), у правильно зібраних і оброблених даних уявна частина перетворення повинна дорівнювати нулю. Поява синусної компоненти (уявної частини спектра) може вказувати на фазові похибки — артефакти, спричинені неточним позиціонуванням дзеркала в момент нульової різниці ходу, механічною нестабільністю або недосконалою юстировкою інтерферометра. Ці похибки проявляються як викривлення контурів

спектральних ліній або їх асиметрія, що особливо критично при аналізі вузьких смуг поглинання [71, 137].

Аподизація застосовується для пом'якшення ефектів обрізання інтерферограми, які виникають через обмеження її довжини. У реальному експерименті неможливо записати всю нескінченну інтерферограму, тому її обрізають на певному відрізку $[-L, +L]$. Це обрізання є математичним добутком інтерферограми на прямокутне вікно, що в частотній області призводить до згортання спектра з функцією типу $\text{sinc}(x)$, яка створює побічні максимуми (side lobes), тобто паразитні осциляції — так званий ефект Гіббса. Для запобігання цьому застосовують аподизаційні функції — згладжувальні вікна, які поступово зменшують амплітуду інтерферограми на її краях. Це дозволяє мінімізувати побічні ефекти у спектрі, хоча й призводить до незначного уширення головних пік-сигналів (зменшення спектральної роздільності).

Функція аподизації згладжує різке обмеження даних, зменшуючи бічні максимуми та шум у спектрі, але водночас викликає помірне уширення головних ліній. Вибір конкретного типу аподизації (наприклад, функції Хеннінга, Блекмана–Гарріса або Триангулярної) залежить від пріоритету між роздільною здатністю та чистотою спектра. Тому вона повинна бути адаптована відповідно до задачі — наприклад, детекції широких смуг або розділення близько розташованих піків

FTIR спектроскопія має низку критичних переваг над традиційними дисперсійними методами спектрального аналізу, такими як прилади з призмою чи дифракційною ґраткою. Висока точність, енергетична ефективність, мультиплексна реєстрація та швидкість збору даних роблять FTIR спектрометри незамінними в багатьох галузях — від біофізики до аналітичної хімії.

У дисперсійних спектрометрах геометрія приладу обмежує інтенсивність сигналу: світло проходить через вузьку щілину, що визначає як тілесний кут прийому, так і ефективну апертуру. Натомість у FTIR-

спектрометрах роль щілини виконує велика апертура детектора, а інтерферометр не вимагає обмеження світлового потоку. Цей ефект, відомий як вигреш Жакіно (Jacquinot Advantage), дозволяє пропускати через інтерферометр у десятки або навіть сотні разів більше енергії — зазвичай у 100–200 разів більше, ніж через аналогічний дисперсійний прилад. Це забезпечує кращу чутливість, особливо при роботі з джерелами низької інтенсивності або малими зразками [144]

Мультиплексна перевага: вигреш Фелжета (Fellgett Advantage)

Ще однією визначальною перевагою FTIR-спектроскопії є мультиплексний ефект, або Fellgett Advantage. У цьому підході весь спектральний діапазон реєструється одночасно — кожна частотна компонента $\Delta\sigma$ сигналу присутня в кожному моменті часу під час збору інтерферограми. Натомість у дисперсійних системах кожен канал (довжина хвилі або смуга частот) фіксується окремо, і весь діапазон покривається за час T/M , де M — кількість спектральних каналів [145].

Завдяки цьому FTIR-спектрометри забезпечують значно вищий сигнал/шум. Зокрема, при однаковому часі збору даних FTIR забезпечує вигреш у відношенні сигнал/шум приблизно в 100–1000 разів, що є особливо важливим у слабопоглинаючих зразках або при виявленні слідів речовин.

Висока швидкість збору даних

Час вимірювання в FTIR-спектроскопії визначається, головним чином, швидкістю руху дзеркала в інтерферометрі та максимальною оптичною різницею ходу. Завдяки цьому можлива надзвичайно швидка реєстрація спектрів — один спектр у широкому діапазоні може бути отриманий за частки секунди. Ця властивість є критичною для кінетичних досліджень, виявлення нестабільних проміжних продуктів або для автоматизованих аналітичних систем.

Обробка ІЧ-спектрів: деконволюція смуг та параметричне моделювання спектральних контурів

Після реєстрації FTIR-спектри було переведено у формат поглинання (absorbance), що є стандартною процедурою для подальшої кількісної та якісної обробки. Перш ніж здійснювати спектральний аналіз, проводилась базова корекція (baseline correction) та згладжування спектра (smoothing), залежно від співвідношення сигнал/шум. Ці попередні етапи спрямовані на усунення фонового нахилу, артефактів та покращення інтерпретованості спектра

Складність спектрального контуру та потреба у деконволюції

Спектр поглинання біологічних макромолекул, зазвичай має складний вигляд, утворюючи сумарну огинаючу, що є результатом накладання великої кількості частково перекритих піків, кожен із яких відповідає певному коливальному режиму. Щоб виділити та охарактеризувати окремі спектральні смуги, необхідно провести деконволюцію контурів, тобто розкласти загальний спектр на індивідуальні компоненти з визначенням їх спектральних параметрів: положення (центр), амплітуда, напівширина та форма

Математичне моделювання: функція Фойгта

У цьому дослідженні апроксимацію спектральних смуг виконано за допомогою функції Фойгта — згортки Лоренцового та Гаусового контурів, яка дозволяє враховувати як доплерівське розширення (гаусівська складова), так і природну або інструментальну ширину (лоренцова складова):

$$f(\nu) = a_0 \text{Voigt}(\nu, a_1, a_2, a_3)$$

де:

- a_0 — амплітуда смуги,
- a_1 — центральне хвильове число,
- a_2 — напівширина,
- a_3 — параметр форми, що визначає внесок Гауса і Лоренца.

Метод оптимізації: алгоритм Левенберга-Марквардта

Оптимізацію параметрів моделі виконували методом найменших квадратів, реалізованим через алгоритм Левенберга–Марквардта — ітераційний метод, що поєднує переваги градієнтного спуску та методу

Ньютона. Цільова функція (міра відхилення між експериментальними та змодельованими даними) записується як:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N [y_{exp}(i) - y_{fit}(i)]^2$$

- χ^2 — функція відхилення,
- N — кількість точок у спектрі,
- y_{exp} — експериментальні значення,
- y_{fit} — модельовані значення.

Гradient цієї функції розраховується на кожному кроці і використовується для оновлення параметрів. Завдяки високій ефективності, алгоритм швидко сходиться до оптимального набору параметрів, але існує ризик локального мінімуму, що може призводити до некоректної інтерпретації спектра [146, 147]

Невизначеність розв'язку та роль початкових умов

Завдання розкладу спектрального сигналу є недостатньо визначеним: існує багато можливих комбінацій компонент, які можуть апроксимувати спектр з однаковою точністю. Результати моделювання залежать від:

- кількості передбачуваних компонент;
- початкових значень параметрів;
- обмежень, накладених на форму або положення смуг.

Щоб уникнути помилок, у даному дослідженні попередню оцінку числа та розташування компонент проводили з використанням другої похідної спектра, яка дозволяє виявити «плечі», перегини та локальні мінімальні точки, що вказують на приховані піки.

2.2. Спектроскопія комбінаційного розсіювання

Спектроскопія комбінаційного розсіювання або спектроскопія Раманівського розсіювання, - є високочутливим методом коливальної спектроскопії, який ґрунтується на аналізі непружного розсіювання світла

(ефекті Рамана), що виникає при взаємодії монохроматичного лазерного випромінювання з молекулярними коливаннями, обертаннями або іншими низькочастотними модами молекул. На відміну від інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії, яка чутлива до змін дипольних моментів, вимірюючи зміни в поляризованості молекули, можна досліджувати такі об'єкти, як водні розчини, без суттєвого впливу води на спектр розсіювання [148].

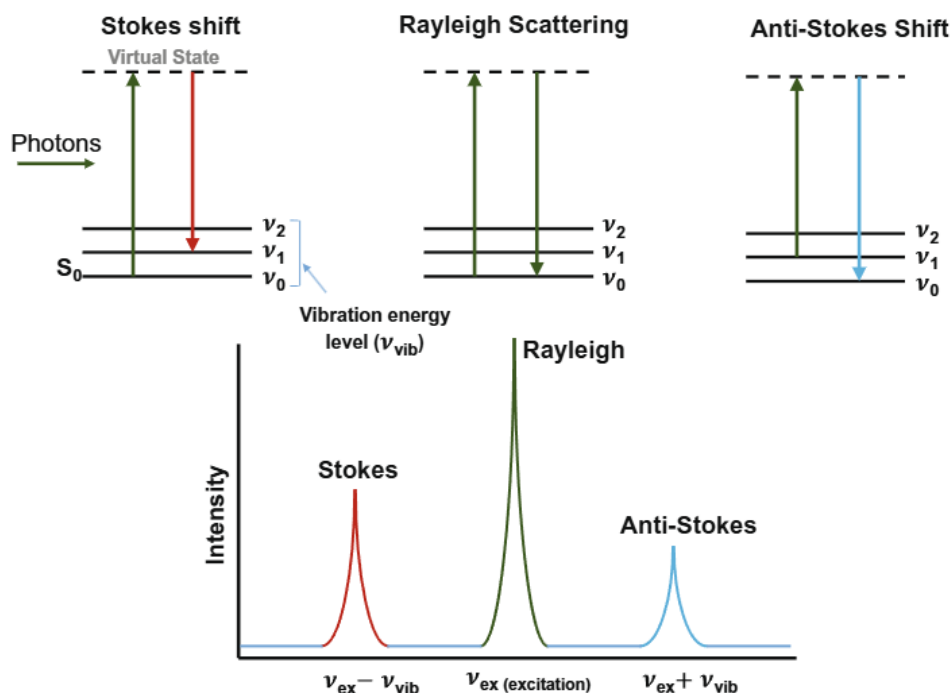


Рис.13. Релеєвська та Раманівське розсіювання [141]

На схемі Рис.13, відображено енергетичні переходи для трьох типів розсіювання:

- Релеєвське розсіювання (лінії переходів зелені): повернення на той самий енергетичний рівень;
- Стоксове Раманівське розсіювання (лінії переходів червоний): розсіювання з передачею енергії молекулі;
- Антистоксове Раманівське розсіювання (лінії переходів сині): розсіювання з поглинанням енергії від молекули.

Світлорозсіювання є ключовим фізичним процесом, що лежить в основі Раманівської спектроскопії. У загальному випадку взаємодія фотону з

молекулою може призводити до двох принципово різних результатів — пружного або непружного розсіювання.

У разі пружного розсіювання фотон не змінює свою енергію при взаємодії з молекулою: частота і довжина хвилі розсіяного випромінювання залишаються такими ж, як і вхідного. Це відповідає класичному закону Релея, згідно з яким відбувається розсіювання без втрати енергії або імпульсу:

$$E_{\text{розсіяне}} = E_{\text{падаюче}}$$

В спектроскопії комбінаційного розсіювання цей тип фіксується як інтенсивний центральний пік, але він не містить аналітичної інформації про молекулярні коливання [149] і зазвичай відфільтровується при обробці спектра.

Непружне (Раманівське) розсіювання. У рідкісних випадках (~ 1 фотон із 10^6) взаємодія фотона з молекулою призводить до зміни енергії — явище, яке називають непружним розсіюванням, або ефектом Рамана. При цьому енергія фотона або частково передається молекулі, або навпаки — зростає за рахунок внутрішньої енергії молекули.

Розрізняють два типи такого розсіювання:

Стоксове Раманівське розсіювання (Stokes Raman Scattering)

Цей механізм спостерігається, коли молекула перебуває у своєму основному (нульовому) коливальному стані. Поглинаючи фотон, вона переходить у віртуальний стан, але повертається з нього не в початковий рівень, а в вищий коливальний стан. В результаті:

- Частина енергії фотона передається молекулі,

А розсіяне випромінювання має меншу енергію, тобто довшу довжину хвилі, ніж збуджуюче:

$$E_{\text{розсіяне}} < E_{\text{падаюче}}$$

Антистоксове Раманівське розсіювання (Anti-Stokes Raman Scattering). Якщо молекула вже знаходиться у збудженому коливальному стані (що можливо за рахунок теплових флуктуацій або попереднього збудження), то

фотон може поглинути частину цієї енергії. У результаті розсіяний фотон отримує енергію, його частота стає вищою, а довжина хвилі — коротшою, ніж у збуджуючого випромінювання:

$$E_{\text{розсіяне}} > E_{\text{падаюче}}$$

Антистоксові піки, хоча й значно менш інтенсивні, ніж стоксові, використовуються для термографії, аналізу динаміки популяції збуджених станів, і є ключовими в когерентних методах Раманівської спектроскопії (наприклад, CARS).

В нашому дослідженні основна увага була приділена застосуванню Раманівської спектроскопії для вивчення структури та динаміки клітинних і модельних мембран. Цей підхід дозволяє отримати інформацію про:

1. Ліпідну взаємодію і упаковку – включаючи аналіз ступеня впорядкованості вуглеводневих ланцюгів, фазових переходів (наприклад, гель–рідкокристалічний) та специфічної взаємодії між ліпідами
2. Мембранну організацію та динаміку – дослідження латеральної гетерогенності, утворення мікродоменів, фазового розділення на локальну структуру мембрани \

Завдяки своїй високій просторовій та спектральній роздільній здатності, особливо у варіантах конфокальної Раманівської мікроскопії, метод дозволяє:

- виконувати неруйнівний аналіз біологічних зразків без міток чи барвників;
- виявляти структурну чутливість до ступеня впорядкованості ліпідного шару, що корелює з фазовим станом
- проводити вимірювання в режимі реального часу, оцінюючи морфологічні та механічні зміни мембран під впливом температури, наночастинок або зовнішнього поля .

Спектральні маркери та кількісна інтерпретація

Раманівський спектр мембран включає характеристичні коливальні моди, які слугують спектральними маркерами структури [150]. Наприклад:

- смуги $\sim 2850\text{--}2890\text{ см}^{-1}$ симетричні/асиметричні, індикатори ліпідної впорядкованості;
- смуга $\sim 1655\text{ см}^{-1}$ коливання $\text{C}=\text{C}$ у ненасичених ліпідах;
- область $\sim 1300\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ — взаємодії фосфатних та груп, важливі для аналізу голівок фосфоліпідів і взаємодії з іонами/білками

Кількісний аналіз спектра проводиться шляхом розкладу контурів на компоненти (як і в FTIR), із застосуванням функцій Гауса, Лоренца або Voigt-профілю, а також розрахунку співвідношень інтенсивності для оцінки рівня впорядкованості та динаміки ліпідного шару. [125,126]. Об'єднання цих підходів забезпечує комплексне уявлення про структурно-функціональні властивості мембран, дозволяючи вивчати їхню реакцію на зовнішні чинники, такі як температура, рН, іонний склад, а також вплив наночастинок (наприклад, MoS_2 , WS_2)

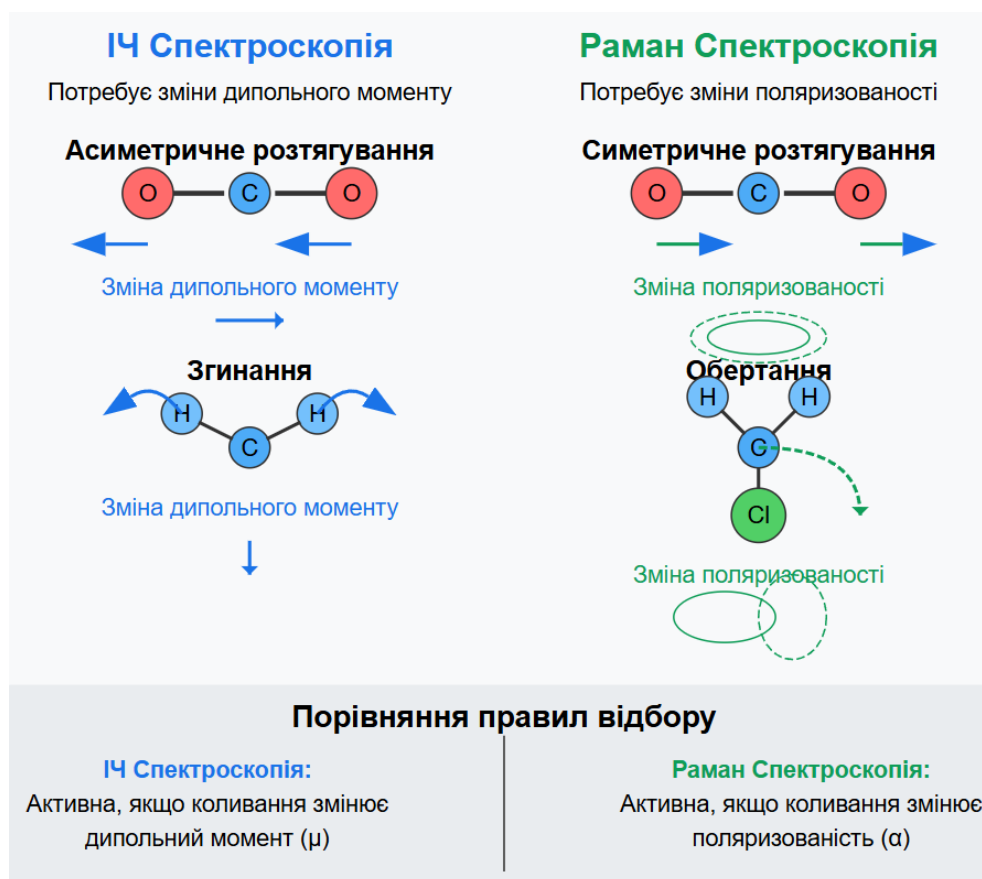


Рис.14. Ілюстрація ІЧ і Раманівської спектроскопії та правил відбору

В ІЧ-спектроскопії коливальні рухи виявляються, коли молекула поглинає інфрачервоне випромінювання, викликаючи зміни її дипольного моменту. Різні режими коливань поглинають ІЧ-випромінювання на певних довжинах хвиль, що призводить до характерних спектрів, унікальних для кожної молекули.

У спектроскопії комбінаційного розсіювання коливальні рухи досліджуються на основі непружного розсіювання світла, Рис14. Це відбувається, коли світло взаємодіє з молекулою, викликаючи зміни в її поляризованості та призводить до зміщення довжини хвилі розсіяного світла. Обидва методи широко використовуються для аналізу молекулярної структури, ідентифікації сполук і вивчення хімічних зв'язків.

Оскільки ефект Рамана виникає внаслідок взаємодії електромагнітного поля лазера з електронною оболонкою молекули, що призводить до індукованого дипольного моменту. Ключовим елементом цього процесу є поляризованість молекули — здатність електронної хмари деформуватись під впливом електричного поля.

Індукований диполь описується як:

$$\mu_{\text{індукований}} = \alpha \cdot E(t)$$

де:

- $\mu_{\text{індукований}}$ — індукований дипольний момент,
- α — тензор поляризованості молекули,
- $E(t)$ — електричне поле лазерного випромінювання.

Для електричного поля лазерного випромінювання:

$$E(t) = E_0 \cdot \cos(\omega_L t)$$

тоді:

$$\mu_{\text{індукований}} = \alpha \cdot E_0 \cdot \cos(\omega_L t)$$

Припустимо, що молекула виконує гармонічні коливання з частотою ω_{vib} , і зміщення координати ядер Q змінюється як:

$$Q(t) = Q_0 \cdot \cos(\omega_{\text{vib}} t)$$

Поляризованість змінюється як функція $Q(t)$, тому її можна розкласти в ряд Тейлора:

$$\alpha(Q) = \alpha_0 + \frac{d\alpha}{dQ} Q(t)$$

Підставляючи цей вираз у рівняння для дипольного моменту, отримаємо: [241]

$$\mu(t) = [\alpha_0 + \frac{d\alpha}{dQ} Q_0 \cos(\omega_{vib}t)] \cdot E_0 \cdot \cos(\omega_L t)$$

Використовуючи тригонометричну тотожність:

$$\cos A \cdot \cos B = \frac{1}{2} [\cos(A - B) + \cos(A + B)]$$

отримуємо три складові в індукованому диполі:

$$\begin{aligned} \mu(t) = & \alpha_0 \cdot E_0 \cdot \cos(\omega_L t) \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dQ} Q_0 \cdot E_0 \right) [\cos((\omega_L - \omega_{vib})t) + \cos((\omega_L + \omega_{vib})t)] \cdot \end{aligned}$$

Цей результат інтерпретується наступним чином:

- Перша складова — коливання з тією ж частотою, що й збуджуюче світло (Релеєвське розсіювання).
- Друга складова — розсіювання зі зниженням частоти ($\omega_L - \omega_{vib}$ — Стоксове Раманівське розсіювання).
- Третя складова — розсіювання з підвищенням частоти ($\omega_L + \omega_{vib}$ — Антистоксове Раманівське розсіювання).

Таким чином, індукований диполь викликає випромінювання у трьох частотних компонентах, які й спостерігаються в Раманівському спектрі [127]

Фізичне значення та спектроскопічна інтерпретація:

- Релеєвська -компонента є найінтенсивнішою, але неінформативною для вивчення коливальних характеристик.
- Стоксова-компонента є основним джерелом інформації: вона відображає поглинання енергії молекулою і відповідає всім дозволеним переходам.

- Антистоксова-компонента є менш інтенсивною, оскільки для її виникнення молекула має бути попередньо збуджена (що рідко при кімнатній температурі). Проте вона використовується для температурної діагностики та когерентної спектроскопії.

Ключовою умовою виникнення Раман-активної смуги є те, що коливання повинні викликати зміну поляризованості молекули:

$$\frac{d\alpha}{dQ} \neq 0$$

Якщо ця похідна дорівнює нулю, то таке коливання буде неактивним в раманівському спектрі [15,152]. Цей критерій аналогічний правилу добутку дипольних моментів для ІЧ-активності, але зосереджений на зміні електронної оболонки.

2.3. Люмінесцентна спектроскопія

Люмінесцентна спектроскопія — це експериментальний метод дослідження, що базується на вивченні випромінювання, яке виникає після поглинання фотонів речовиною. Вона використовується для аналізу молекулярної структури, динаміки електронних збуджень, молекулярної взаємодії, квантових процесів енергообміну. Методи люмінесцентної спектроскопії охоплюють як спектральні, так і часові вимірювання, і активно застосовуються в біофізиці, нанотехнологіях, матеріалознавстві, хімічному аналізі та медицині.

Механізми люмінесценції: основні електронні переходи [153]

При поглинанні фотону молекула переходить з основного електронного стану S_0 у збуджений стан S_1 , S_n (де $n > 1$). Цей процес відбувається за надзвичайно короткий час ($\sim 10^{-15}$ с).

Молекула швидко релаксує з вищого збудженого стану S_n до першого збудженого синглетного рівня S_1 без випромінювання, втрачаючи енергію через коливальні переходи.

. Флуоресценція (Fluorescence) -це випромінювання фотона при поверненні збудженого електрона з $S_1 \rightarrow S_0$. Процес відбувається в часовому діапазоні 1–10 нс, є спін-дозволенним і супроводжується стоксовим зсувом (довжина хвилі флуоресценції більша за довжину хвилі збудження).

Молекула може переходити з синглетного збудженого стану S_1 у триплетний T_1 , змінюючи спін (спін-заборонений процес, але дозволений за рахунок спін-орбітальної взаємодії).

Фосфоресценція (Phosphorescence) -це випромінювання при переході $T_1 \rightarrow S_1$ яке відбувається повільно (від мікросекунд до секунд). Такий тип люмінесценції характерний для молекул із високою спін-орбітальною взаємодією або у твердих матрицях.

Час життя флуоресценції τ описує середній час, протягом якого молекула перебуває у збудженому стані перед випромінюванням фотона:

$$\tau = \frac{1}{k_f} + \frac{1}{k_{nr}}$$

де:

- k_f — швидкість випромінювального переходу;
- k_{nr} — сумарна швидкість безвипромінювальних процесів (гасіння, передачі енергії).

В експерименті τ визначають шляхом побудови кривої затухання $I(t)$, яку описують експоненціальною (або мультиекспоненціальною) функцією:

$$I(t) = \sum_i A_i e^{-t/\tau_i}$$

Це дозволяє розділити процеси, що відбуваються паралельно або в різних середовищах (наприклад, білки в складному розчині, наночастинки з кількома доменами тощо) [154].

Квантовий вихід (Φ) розраховується або порівняльним методом з еталоном (з відомим Φ), або абсолютним методом із використанням інтегруючої сфери.

За наявності донора й акцептора флуоресценції можливо вивчати енергетичний перенос, наприклад, через FRET (Förster Resonance Energy Transfer):

$$E = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$$

де τ_{DA} — час життя донора в присутності акцептора, τ_D — у відсутності.

Чисельне моделювання дозволяє відтворити і проаналізувати експериментальні спектри, а також передбачити поведінку системи у складних умовах [155].

Gaussian broadening застосовується для моделювання лінійних спектрів (включаючи стоксове зміщення);

Voigt-профілі — для відображення одночасно однорідної і неоднорідної ширини ліній;

Метод Монте Карло (Monte Carlo) — для статистичного моделювання флуктуацій, гасіння, переносу енергії.

Моделювання на основі рівнянь кінетики дозволяє розрахувати насичення рівнів збудження, конкуренцію між випромінювальними та безвипромінювальними процесами, динаміку:

$$\frac{dN_1}{dt} = -k_f N_1 - k_{nr} N_1 + P(t)$$

де N_1 — концентрація молекул у збудженому стані, $P(t)$ — функція збудження.

. Два ключові параметри, які характеризують фотофізичну поведінку молекули — це квантовий вихід флуоресценції (Φ) та час життя збудженого стану (τ). Обидва параметри дозволяють не лише ідентифікувати флуорофори, а й оцінити ефективність енергетичних переходів, вплив навколишнього середовища, взаємодії з іншими молекулами або наноматеріалами.

Квантовий вихід флуоресценції (Φ) — це відношення кількості фотонів, випромінених у результаті флуоресценції, до кількості фотонів, поглинутих молекулою:

$$\Phi = \frac{N_{\text{випромінен}}}{N_{\text{поглинуто}}}$$

Цей параметр варіює від 0 (немає флуоресценції) до 1 (100% випромінювання). Він є ключовим для оцінки ефективності фотонного зворотного переходу

Існує два основних методи визначення квантового виходу:

Порівняння з еталонним зразком: використовують стандарт з відомим квантовим виходом (наприклад, Rhodamine 6G або Quinine sulfate). Інтенсивності флуоресценції та коефіцієнти поглинання порівнюються зразок-еталон за однакових умов.

Метод інтегруючої сфери: забезпечує абсолютне вимірювання Φ без необхідності калібрування еталоном. Весь спектр збудження та емісії реєструється всередині сферичної порожнини з високодифузійними відбивними стінками. Цей метод усуває помилки через фокусування, розсіювання або відбиття, особливо важливі для твердих зразків або оптично щільних розчинів

Час життя флуоресценції (τ) визначає середній інтервал часу, протягом якого молекула перебуває у збудженому стані перед випромінюванням фотона

Таким чином, дані про τ та Φ дозволяють розрахувати випромінювальні та безвипромінювальні шляхи релаксації, що особливо важливо для аналізу фотостабільності, гасіння та енергетичного переносу [156].



Рис.15. Спектрометр FS5 /

Спектрометр FS5, Рис.15, є універсальним приладом для вимірювання спектрів флуоресценції, поглинання та часових характеристик випромінювання. Його модульна конструкція дозволяє інтегрувати декілька детекторів, фільтраційних систем, джерел збудження, що робить його надзвичайно гнучким інструментом як у фундаментальних дослідженнях, так і в аналітичній практиці.

Прилад оснащується широкоспектральним джерелом збудження, часто на основі ксенонової лампи (Xe, 150 Вт), з можливістю підключення лазерів або імпульсних діодів для вимірювань часу життя флуоресценції. Джерело має високу інтенсивність в діапазоні 200–1000 нм, що дозволяє вивчати як органічні флуорофори, так і наноматеріали, квантові точки чи протеїни з різним максимумом поглинання.

Світло проходить через монохроматор з голографічною решіткою, що забезпечує вузьку смугу пропускання (1–10 нм) та зменшене паразитне розсіювання. Опція подвійного монохроматора доступна для задач, де потрібне особливо низьке фонове освітлення (наприклад, вимірювання слабофлуоресцентних зразків).

Оптична геометрія приладу побудована за 90° конфігурацією з вертикально орієнтованим тримачем зразка, що мінімізує ефект внутрішнього фільтра та підсилює реєстрацію флуоресцентного сигналу від плівок, товстих

кристалів або концентрованих розчинів. Така конструкція забезпечує низький рівень відбитого збуджуючого світла; можливість інтеграції різних фільтрів (edge, band-pass, long-pass) у кількох точках оптичного шляху; гнучкість у використанні твердої, рідкої чи гелеподібної форми зразків. Крім того, внутрішні поверхні оптичної камери мають спеціальне просвітлююче покриття, яке поглинає до 99% розсіяного світла, що істотно підвищує сигнал/шум навіть при роботі з флуорофорами низької квантової ефективності [138].

Спектрометр підтримує одночасне підключення двох детекторів, що дозволяє працювати у паралельному спектральному та часовому режимах. Стандартний PMT (фотопомножувач) забезпечує високу чутливість у діапазоні 250–850 нм, але можливе додаткове встановлення:

- NIR-детектора (InGaAs) — для вимірювання ближнього ІЧ-випромінювання до 1650 нм;
- TCSPC-модуля (time-correlated single photon counting) — для флуоресцентної часової спектроскопії з пікосекундною точністю;
- CCD-матриці або емісійного спектрометра — для швидкого сканування широкого спектра.

Таке поєднання дозволяє проводити не лише спектральну, але й кінетичну, мультиканальну та фазову флуоресцентну спектроскопію.

Однією з можливостей спектрометра є реалізація часових вимірювань флуоресценції. Для цього використовується метод підрахунку одиничних фотонів з кореляцією в часі — Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC). Цей метод базується на квантовій природі флуоресцентного випромінювання та дозволяє зареєструвати момент надходження кожного фотона з точністю до сотень фемтосекунд, формуючи точну часову гістограму імпульсного затухання.

У режимі TCSPC флуорофор збуджується коротким (піко- або наносекундним) лазерним імпульсом, а час реєстрації кожного фотона

вимірюється відносно моменту збудження. Зі зростанням кількості зареєстрованих імпульсів формується точна крива затухання.

2.4. Методи оптичної мікроскопії

Оптична мікроскопія залишається одним із основних інструментів дослідження в біофізиці, матеріалознавстві, нанотехнологіях та мікробіології. В останні десятиліття класична мікроскопія трансформувалась у складну міждисциплінарну платформу, яка поєднує традиційні методи з інноваційними оптичними, спектроскопічними та цифровими підходами. Сучасна оптична мікроскопія дозволяє отримувати зображення з субмікронною точністю, вивчати молекулярні взаємодії в живих клітинах, досліджувати дифузію та динаміку білків, доменів і наноструктур в реальному часі.

Класична оптична мікроскопія базується на заломленні та дифракції світла, яке проходить через або відбивається від зразка. Обмеження просторової роздільної здатності [91] у класичній системі описується критерієм Аббе:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{\lambda}{2NA}$$

де:

- d — мінімальна відстань між двома об'єктами, що можуть бути розділені; [172]
- λ — довжина хвилі світла;
- NA — числова апертура об'єктива.

Згідно з цим критерієм, максимальна роздільна здатність класичних оптичних систем становить ~200–250 нм для видимого світла. Проте сучасні методи, див.Рис.16, дозволяють значно перевищити ці обмеження за рахунок оптичних та обчислювальних рішень.

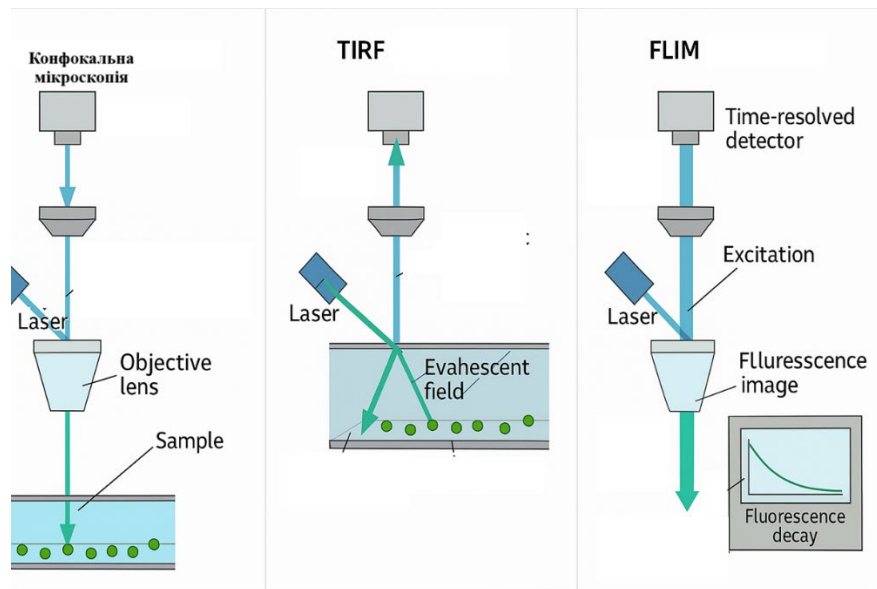


Рис. 16. Ілюстрація методів Конфокальної TIRF та FLIM мікроскопії

Конфокальна мікроскопія використовує лазерне сканування зразка у фокусованому об'ємі, яке проходить через об'єктив і фокусується в точку на зразку. Після взаємодії з флуорофорами флуоресцентне світло повертається тією ж оптичною траєкторією та проходить через апертуру, що усуває позафокусне світло. Це дозволяє отримувати зображення з високим просторовим розділенням і проводити тривимірне секціонування зразків, з високим контрастом; будувати 3D-реконструкції об'ємних структур; проводити флуоресцентні вимірювання з просторовим розділенням. [156-159].

Гранична роздільна здатність у площині об'єктива визначається за критерієм Аббе:

$$d = 0.61 \cdot \lambda / NA$$

де λ — довжина хвилі випромінювання, NA — числова апертура. У конфокальній системі з апертурою (пінхол) розділення зростає:

$$d_{\perp} \approx 0.40 \cdot \lambda / NA, \quad dz \approx 1.4 \cdot n \cdot \lambda / NA^2$$

де $d_{\perp}$ — поперечна, dz — осьова роздільна здатність, n — показник заломлення іммерсії.

Наприклад, якщо використовувати об'єктив 100×/1.40 Oil, $n=1.518$, $\lambda=488$

нм

$$d\perp, \text{ конф.} \approx 0.40 \cdot 488 / 1.40 \approx 139 \text{ нм}$$

$$dz, \text{ конф.} \approx (1.4 \cdot 1.518 \cdot 488) / (1.40^2) \approx 530 \text{ нм}$$

Щоб коректно відтворити просторові частоти, крок сканування має задовольняти правило Найквіста:

$$\Delta x \approx \Delta y \leq d\perp/2 \approx 70 \text{ нм} \quad \Delta z \leq dz/2 \approx 260 \text{ нм}$$

Таким чином, конфокальна мікроскопія дозволяє зменшити поперечне розділення до ~ 140 нм та виконувати оптичне секціонування з товщиною зрізу ~ 0.5 мкм, що суттєво перевищує можливості класичної оптики.

Метод мікроскопії когерентного антистоксівського раманівського розсіювання (CARS) є методом візуалізації з високою роздільною здатністю, який базується на нелінійному оптичному процесі. Цей метод дозволяє отримувати зображення, що відображають хімічний склад зразка, без необхідності використання флуоресцентних міток. В основі CARS лежить чотирехвильова зміна частот, де три вхідні фотони — два фотони накачування (pump) з частотою ω_p та один фотон Стокса (Stokes) з частотою ω_s — взаємодіють з молекулярними коливаннями зразка.

Для ініціації процесу необхідно, щоб різниця частот $\omega_p - \omega_s$ співпадала з частотою одного з коливальних переходів молекули зразка. У момент такого резонансу відбувається ефективне збудження коливань, що призводить до генерації четвертої хвилі — антистоксівського сигналу (anti-Stokes) з частотою $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$. Загальний принцип полягає у послідовному збудженні молекул накачуючими та стоксівськими імпульсами, що формують когерентну коливальну поляризацію. Ця поляризація згодом взаємодіє з другим імпульсом накачування, що спричиняє когерентне розсіювання та генерацію антистоксівського сигналу. Експериментальна установка для CARS-мікроскопії зазвичай включає систему двох синхронізованих лазерів, що генерують імпульси накачування та Стокса, а також скануючу оптичну систему для формування зображень. Отриманий антистоксівський сигнал, який є когерентним, направленим та значно інтенсивнішим за звичайне раманівське розсіювання, детектується з високою чутливістю. Сила сигналу пропорційна

концентрації певних хімічних груп, що робить цей метод ідеально придатним для візуалізації ліпідів, протеїнів та інших компонентів біологічних зразків.

Таким чином, CARS-мікроскопія надає унікальну можливість вивчати динамічні процеси у живих клітинах та тканинах з високою просторовою та тимчасовою роздільною здатністю, зберігаючи при цьому зразок у його нативному стані.

TIRF Microscopy (Total Internal Reflection Fluorescence) . Метод TIRF базується на аналізі в зоні контакту між скляною поверхнею та водним зразком, що виникає при повному внутрішньому відбитті лазера. Це поле збуджує лише флуорофори на глибині до ~100–200 нм від межі скляної поверхні та зразка, дозволяючи візуалізувати поверхневі процеси — наприклад, динаміку мембранних білків або адгезію клітин.

FLIM Microscopy (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) . FLIM будує зображення не лише за інтенсивністю флуоресценції, а й за її часом життя. Після збудження імпульсним лазером час надходження кожного фотона фіксується детектором з високою часовою роздільною здатністю (наприклад, TCSPC). В результаті формується карта затухання флуоресценції, що відображає мікрооточення флуорофора, полярність середовища або взаємодії білків (наприклад, у FRET-аналізі).

Флуоресцентна мікроскопія з надвисокою роздільною здатністю (Super-resolution fluorescence microscopy). Серед основних даного методу:

STED (Stimulated Emission Depletion): використовує другий лазер для пригнічення флуоресценції на периферії фокусної плями, досягаючи роздільної здатності <50 нм.

PALM/STORM (Photoactivated Localization Microscopy / Stochastic Optical Reconstruction Microscopy): базується на локалізації окремих флуорофорів у часі з точністю до 20–30 нм.

Ці методи дозволяють досліджувати організацію білкових кластерів, ліпідних рафтів, везикул, наночастинок, а також динаміку мембран в режимі живої клітини [159-164].

Оптичні мікроскопи часто інтегруються зі спектроскопією комбінаційного розсіювання, ІЧ-детекторами, що дозволяє, отримувати просторово-спектральні карти (hyperspectral maps); аналізувати склад речовини, фазові домени, наночастинки; проводити спектральну сегментацію клітин або мембранних структур без флуоресцентного маркування.

2.5. Скануюча електронна мікроскопія та енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія

Скануюча електронна мікроскопія (SEM, Scanning electron microscopy) є високочутливим методом дослідження мікро- та нанорозмірних об'єктів, що забезпечує формування зображень поверхневих структур з просторовою роздільною здатністю до одиниць нанометрів. Принцип її роботи ґрунтується на взаємодії сфокусованого пучка електронів високої енергії з поверхнею зразка, внаслідок чого відбуваються складні процеси пружного та непружного розсіювання. Ці взаємодії, супроводжуються генерацією різних типів випромінювань і електронних сигналів, які, після реєстрації відповідними детекторами, перетворюються на дво- або тривимірні зображення, що відтворюють морфологію, топографію та , елементний склад зразка [100].

У типовій конфігурації SEM електрони генеруються термоелектронними катодами (наприклад, LaB₆) або джерелами з польовою емісією (Field Emission Gun, FEG). У термоелектронних системах , емісія електронів відбувається внаслідок нагрівання катода до температури, за якої його електрони долають роботу виходу, тоді як у FEG-гарматах застосовується автоемісія, квантово-механічний тунельний ефект у сильному електричному полі, що забезпечує високу яскравість і монохроматичність пучка. Первинні електрони прискорюються у вакуумному стовпі мікроскопа до енергій у діапазоні від 0,1 до 30 кеВ та фокусуються системою електромагнітних конденсорних лінз у цільний зонд діаметром 1–10 нм. Сканування здійснюється шляхом керованого розгортання пучка по растру за допомогою

відхиляючих котушок, що забезпечує послідовне опромінення елементів поверхні зразка.

При проникненні в матеріал первинні електрони зазнають численних зіткнень з електронами та ядрами атомів. **Непружні взаємодії** призводять до втрати енергії первинного електрона, збудження або іонізації атомів, а також до утворення вторинних електронів і характеристичного рентгенівського випромінювання. **Пружні зіткнення** з ядрами змінюють траєкторію руху електронів і формують потік зворотно розсіяних електронів. Внаслідок цих процесів у зразку утворюється так звана "область взаємодії", розмір і форма якої визначаються енергією пучка, атомним складом та густиною матеріалу.

Вторинні електрони (SE) утворюються переважно внаслідок непружних зіткнень первинних електронів з електронами зовнішніх оболонок атомів. Середня енергія SE рідко перевищує 50 eV, що зумовлює їхню малу довжину пробігу (1–10 нм) і, відповідно, високу поверхневу чутливість. Завдяки цьому SE-сигнал відтворює мікрорельєф зразка з нанометричною деталізацією. Інтенсивність сигналу істотно залежить від локального кута нахилу поверхні та геометрії освітлення, що робить його оптимальним для дослідження наноструктурованих об'єктів, мембранних утворень, ліофілізованих біоматеріалів та наночастинок.

Зворотно розсіяні електрони (BSE) формуються при пружних зіткненнях первинних електронів з ядрами атомів зразка. Ймовірність такого відбиття зростає пропорційно квадрату атомного номера (Z^2), тому інтенсивність BSE-сигналу безпосередньо корелює з хімічним складом матеріалу. Цей ефект, відомий як Z-контраст, дозволяє візуалізувати фазову неоднорідність, виділяти домішкові включення та розрізняти області з різним атомним складом — від органічних сполук до неорганічних фаз. На відміну від SE, BSE можуть виходити з глибших шарів (до кількох сотень нанометрів), що забезпечує об'ємніший аналіз зразка.

Взаємодія електронного пучка з матеріалом може бути наочно описана за допомогою енергетичних діаграм, які відображають розподіл енергій

електронів і фотонів, що виникають у процесі зіткнень. Первинний електрон, маючи енергію E_0 , при непружних зіткненнях передає частину енергії електронам внутрішніх та зовнішніх оболонок атомів. Якщо енергія, передана електрону зовнішньої оболонки, перевищує його енергію зв'язку (E_b), відбувається його викид у вигляді вторинного електрона (SE). Для електронів внутрішніх оболонок (K, L, M рівнів) іонізація супроводжується переходами вищих електронів на вакантні рівні, що призводить до емісії характеристичних рентгенівських фотонів або до ефекту Оже. У випадку пружного розсіювання зміна напрямку руху електрона майже не впливає на його кінетичну енергію, тому зворотно розсіяні електрони (BSE) на енергетичній діаграмі розташовуються близько до початкової енергії E_0 . Навпаки, SE формують інтенсивну смугу в низькоенергетичній області (<50 eV), тоді як рентгенівське випромінювання має енергії, характерні для конкретних елементів, і розташовується в області десятків eV до кількох десятків keV. [103,120]

Енерго-дисперсійна рентгенівська спектроскопія (EDS/EDX)

EDS є методом мікроаналізу, який дозволяє визначати елементний склад матеріалу за спектром характеристичного рентгенівського випромінювання. При достатній енергії електронного пучка відбувається іонізація внутрішніх електронних рівнів атомів. Заповнення вакансій електронами з вищих оболонок супроводжується випромінюванням фотонів з енергіями, що строго відповідають різниці рівнів та є унікальними для кожного елемента.

Сигнал реєструється напівпровідниковим детектором, який перетворює енергію фотона в електричний імпульс, пропорційний його енергії. Це дозволяє побудувати енергетичний спектр, у якому піки відповідають характеристичним лініям (K, L, M серії) елементів. Сучасні SDD-детектори забезпечують енергетичну роздільну здатність $\sim 125\text{--}140$ eV, що дає змогу розрізняти близькі за енергією піки та проводити кількісний аналіз. Просторове розділення EDS визначається розміром області збудження

рентгенівського випромінювання і зазвичай становить близько 1 мкм при 20 кеВ. Метод чутливий до елементів із $Z > 5$; для легких елементів ефективність зменшується через самопоглинання низькоенергетичних ліній та фонові шуми. Поєднання EDS із SE/BSE-візуалізацією в CEM дозволяє одночасно отримувати морфологічні зображення та розподіл елементів у точковому, лінійному чи площинному режимах, що особливо важливо для аналізу гетерогенних та наноструктурованих матеріалів [164,165].

Сучасні CEM-системи, залежно від завдань дослідження, дозволяють гнучко налаштовувати параметри пучка — прискорюючу напругу, розмір та конфігурацію зонда, робочу відстань, тиск у камері, а також обирати оптимальний тип детектора (SE, BSE, in-lens, axial тощо)



Рис.17. Принципова схема скануючого електронного мікроскопа (CEM)

Для аналізу біологічних об'єктів переважно використовуються низькі енергії (1–5 кеВ), що зменшує проникну здатність електронів і мінімізує

пошкодження чутливих структур. Топографічні дослідження виконуються у SE-режимі, тоді як фазове та елементне картування — у BSE та EDS-режимах відповідно.

Фокуруюча система СЕМ, Рис.17, включає кілька електромагнітних лінз, основними з яких є дві конденсорні та об'єктивна. На відміну від TEM, де об'єктивна лінза виконує роль проекційної оптики, в СЕМ вона зменшує поперечний розмір електронного зонда у нанометричний діапазон. Перша та друга конденсорні лінзи зменшують діаметр пучка, контролюючи його струм та щільність, тоді як об'єктивна лінза остаточно фокусує електрони у точку взаємодії на поверхні зразка. Для термостійких джерел ступінь зменшення перетину може досягати $\sim 10\,000\times$, тоді як у джерелах польової емісії — $10\text{--}100\times$, що пов'язано з початковою яскравістю пучка.

Сканування здійснюється системою електромагнітних відхиляючих котушок, інтегрованих в об'єктивний вузол. Вони послідовно змінюють напрямок зонда у двох взаємно перпендикулярних площинах: спочатку виконується лінійне розгортання вздовж однієї осі, після чого зонд зміщується на один рядок у напрямку другої осі, утворюючи растрову сітку. Кожна координата сканування синхронізована з позицією відповідного пікселя на екрані, забезпечуючи пряме відображення морфології зразка у реальному часі.

Система апертур обмежує розбіжність пучка та відсікає електрони, що відхилилися від оптичної осі, підвищуючи як роздільну здатність, так і контраст зображення. Геометрія апертури впливає на глибину різкості: менший її діаметр підвищує деталізацію, але зменшує інтенсивність сигналу та глибину фокусування.

Збільшення у СЕМ визначається не силою об'єктивної лінзи, а співвідношенням між розміром області сканування на зразку та розміром зображення на екрані. Оскільки розмір растру може варіюватися у широких межах, можливий діапазон масштабування сягає від кількох разів до понад $10^8\times$. Ефективне збільшення, однак, обмежене фізичним діаметром електронного зонда та характеристиками системи детектування. Наприклад,

при розмірі зонда 10 нм реалістично досягти збільшення до 20 000× із збереженням нанометричної деталізації, тоді як у сучасних установках з джерелами польової емісії досягається роздільна здатність до 0,5 нм, що дозволяє візуалізувати атомарно впорядковані структури.

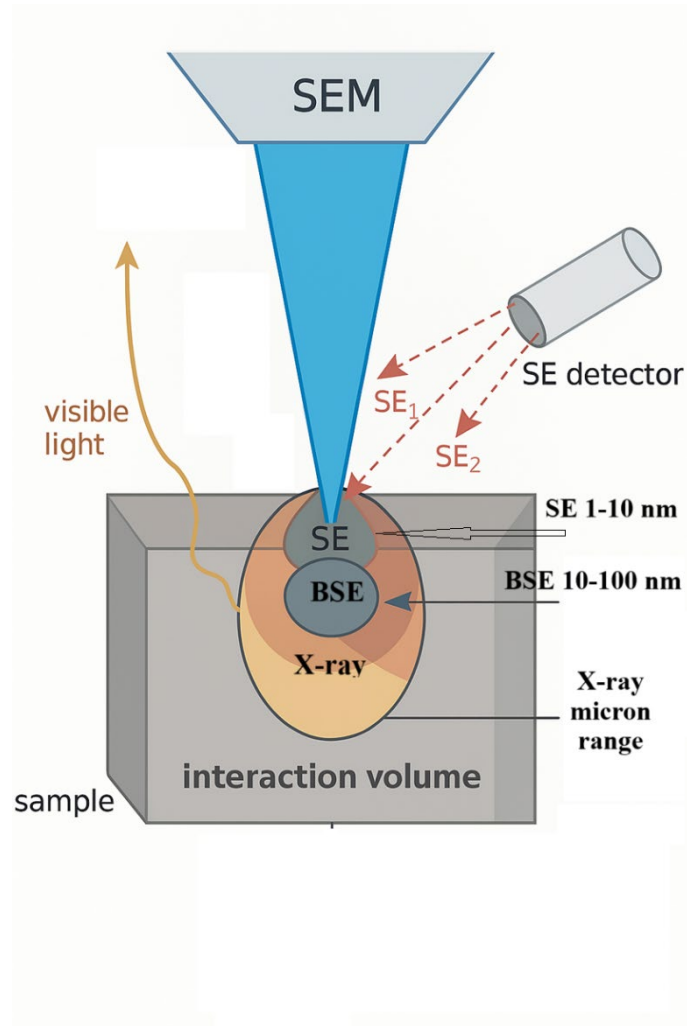


Рис.18. Ілюстрація взаємодій пучка електронів зі зразком в СЕМ

В деяких випадках пучок електронів в мікроскопі, , рис.18, також генерує катодолюмінесценцію — світлове випромінювання, пов’язане з рекомбінацією зарядів.

Робота проводиться зазвичай у високому вакуумі, проте існують спеціальні рішення на базі СЕМ (ЕСЕМ) для роботи з біологічними або нестабільними зразками. [100, 103]

Зразки для СЕМ повинні бути електропровідними, або покриті тонким шаром металу (~5–20 нм), наприклад:

- Золото (Au) — універсальне покриття з високою провідністю;
- Платина (Pt), паладій (Pd) — для надвисокої роздільності;
- Вуглець (C) — для EDS-аналізу без перекриття сигналів.

Електрони проникають в матеріал досліджуваного зразка, утворюючи "грушоподібну" зону взаємодії. Її розміри залежать від енергії пучка E_0 атомного числа Z , густини матеріалу ρ та атомної маси A .

Для розрахунку найчастіше використовується емпірична формула Канінгема для глибини проникнення:

$$R = \frac{0.0276 \cdot A \cdot E_0^{1.65}}{Z^{0.89} \cdot \rho}$$

де:

R — середня глибина проникнення електронів (в мікронах),

E_0 — енергія пучка (в кеВ),

Наприклад, для кремнію (Si): $Z=14$, $A=28.09$, $\rho=2.33$ г/см³ при $E_0=20$ кеВ :

$R \approx 2.2$ μм

Апертура в об'єктивній системі визначає кут сходження електронного пучка до зразка. Зменшення її діаметра призводить до зменшення цього кута, що збільшує глибину різкості — діапазон відстаней по осі Z , у межах якого об'єкт залишається різким. Однак менший отвір апертури також знижує кількість електронів, що досягають зразка, зменшуючи інтенсивність сигналу та збільшуючи відношення сигнал/шум. З іншого боку, надто велика апертура збільшує аберації, що погіршує деталізацію при великих збільшеннях.

Робоча відстань (WD, Working Distance) — це відстань від вихідної площини об'єктивної лінзи до поверхні зразка. Збільшення WD призводить до зменшення кута сходження пучка, а отже — до збільшення глибини різкості. Це зручно при спостереженні об'ємних або нерівних зразків. Проте при більшій WD зростає вплив дифракції та аберацій, що призводить до зменшення максимальної роздільної здатності. Для досягнення атомарної

деталізації зазвичай працюють при малих WD (кілька міліметрів), жертвуючи глибиною різкості заради кращої чіткості в одній фокальній площині. Вибір енергії первинних електронів впливає як на фізику взаємодії зразка з пучком, так і на якість зображення. При високих енергіях (15–30 кеВ) зменшується дифракційний розмір зонда, що потенційно підвищує роздільну здатність, але збільшується глибина проникнення електронів, що розмиває поверхневу інформацію та зменшує контраст тонких структур. При низьких напругах (1–5 кеВ) зона взаємодії стає більш поверхневою, підвищується SE-контраст і зменшується зарядження непровідних зразків, але при цьому дифракційні ефекти і вплив хроматичних аберацій можуть обмежувати роздільну здатність.

Максимізація глибини різкості, досягається комбінацією малої апертури та великої WD, тоді як досягнення максимальної роздільної здатності потребує малої WD, оптимальної апертури (не надто малої для уникнення дифракції) та вибору прискорювальної напруги, яка мінімізує зону взаємодії без надмірного зростання шумів. Параметри СЕМ, Рис.19, налаштовуються залежно від пріоритету: об'ємне зображення з глибоким фокусом або плоске, але з максимальною деталізацією на одній площині.



Рис.19. Процес налаштування розмірних сіток в системі СЕМ з польовою емісією, та встановлення EDS детектора, у виконанні автора.

Енергетична втрата первинного електрона визначається через зупиняючу силу середовища: [152]

$$\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{total}} = \left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{ion}} + \left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{radiation}}$$

Для електронів до 100 кеВ переважає іонізаційна компонента, яка описується формулою Бете:

$$\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{ion}} \approx \frac{4\pi e^4 ZN}{m_e v^2} \ln \left(\frac{2m_e v^2}{I} \right)$$

де:

- e — заряд електрона;

- N — число атомів на одиницю об'єму;
- v — швидкість електрона;
- I — середній потенціал іонізації ($\approx 10\text{--}15$ еВ для більшості матеріалів).

Наприклад для вольфраму **W** ($A=183.84$, $Z=74$, $\rho=19.25$, значення $R \approx 0.53$ μm а для зразка Al (алюміній), $Z=13$, $A=26.98$, $\rho=2.7$ г/см³, при $E_0=15$ кеВ $R \approx 1.50$ μm

$$R = \frac{0.0276 \cdot 183,84 \cdot 15^{1.67}}{74^{0.89} \cdot 19,25} \approx 0,53 \mu\text{m}$$

Таким чином, вибір прискорювальної напруги та матеріалу безпосередньо впливає на глибину аналізу та контраст зображення в СЕМ. Хоча зона взаємодії може простягатися до мікрометрів у глибину, лише SE-сигнал відображає виключно поверхневу інформацію. [167-169]

Це обмеження є важливим для високоточних досліджень топографії, особливо у наноструктурованих і біологічних матеріалах.

Розглянуті методи є оптимальними для вирішення поставлених в роботі задач і відповідають меті роботи.

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ДВОВИМІРНИХ НАНОСТРУКТУР ДИХАЛЬКОГЕНІДІВ ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ WS₂ ТА MoS₂.

Дихалькогеніди перехідних металів зокрема дисульфіди молібдену (MoS₂) та вольфраму (WS₂), мають унікальне поєднання електронних, оптичних, магнітних та механічних властивостей, які характеризуються змінністю зонної структури, залежно від кількості шарів, великою питомою поверхнею, а також стабільністю у різних середовищах. Такі характеристики роблять їх перспективними для використання в оптоелектроніці, наноелектроніці, сенсоріці та біомедицині.

Важливим аспектом досліджень є встановлення зв'язку між структурними особливостями та електронними і спектральними характеристиками цих матеріалів. Дефекти кристалічної ґратки, вакансії сірки, а також вигини і неоднорідності в шарах, можуть істотно змінювати електронні характеристики та поляризаційні властивості. Це відкриває шлях до вивчення таких явищ як флексоелектрика та пов'язані з нею механізми перерозподілу зарядів.

Детальне дослідження, електричних, магнітних та спектральних характеристик MoS₂ і WS₂ можуть бути використані для прогнозування їх поведінки в складних системах та для оптимізації властивостей матеріалів у прикладних завданнях. Зокрема, для нових елементів енергонезалежної пам'яті, сенсорів тиску, нанотранзисторів, а також для перспективних біомедичних застосувань — від маркерів до нанотранспортерів лікарських засобів.

3.1. Скануюча електронна мікроскопія та енерго-дисперсійний аналіз наноматеріалів WS₂ та MoS₂

Скануюча електронна мікроскопія є важливим інструментом для даного дослідження, насамперед завдяки своїй здатності надати детальне розуміння

їхньої морфології та мікроструктури як на мікро-, так і нанорівнях. СЕМ дозволяє безпосередньо візуалізувати широкий спектр наноструктур, утворених WS_2 і MoS_2 , включаючи наночастинки, нанодропи, нанотрубки, нанолисти та більш складні архітектури.

Дуже важливим аспектом характеристикації наноматеріалів WS_2 та MoS_2 є визначення розміру та форми складових частинок. Для таких задач можна використовувати автоматизоване програмне забезпечення для аналізу зображень частинок з метою встановлення зв'язків між структурою та властивостями, а також для забезпечення відтворюваності та масштабованості синтезу наноматеріалів

Для дослідження було використано зразки, виготовлені з двовимірних частинок дисульфиду молібдену (2D MoS_2), комерційно доступних від компанії Sigma-Aldrich (назва продукту: Molybdenum (IV) sulfide—powder, середній розмір частинок <2 мкм, чистота 98%). Дисперсія частинок MoS_2 була осаджена на провідну підкладку та досліджена методом скануючої електронної мікроскопії (СЕМ), що проводилась з використанням мікроскопа MIRA3 TESCAN з граничною роздільною здатністю до 1 нм.

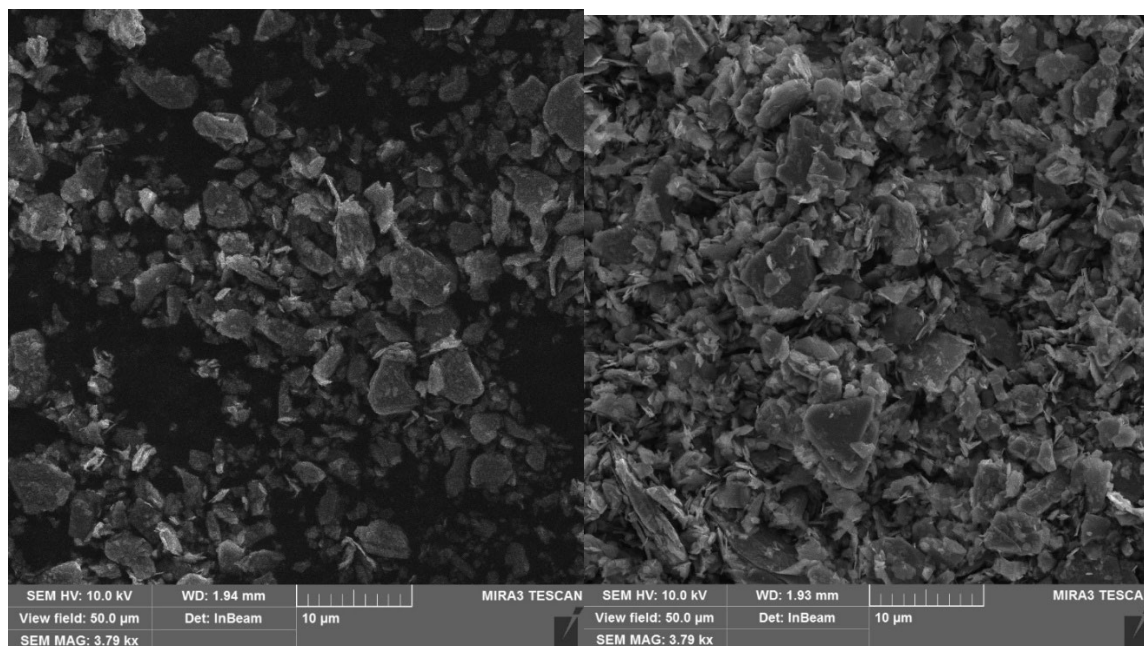


Рис.20. СЕМ зображення наночастинок MoS_2

Зображення (Рис.20) отримані вбудованим в колону детектором вторинних електронів (InBeam SE). В даному режимі забезпечується мінімальна робоча відстань, для максимальної роздільної здатності. Детектор InBeam SE сцинтиляційного типу розміщений довкола полюсного наконечника, електронної гармати. Напруга прискорення (SEM HV): 10.0 кВ, робоча відстань (WD): ~1.93–1.94 мм, збільшення 3.79 тис. крат, поле зору: 50.0 мкм, масштабна шкала: 10 мкм

Перше зображення демонструє менш ущільнену структуру з видимими міжзерновими зазорами. Частинки мають неоднорідну форму з вираженими ламелярними краями та численними кристалічними фрагментами. Поверхня частинок здебільшого плоска, лускоподібна, що характерно для шаруватих матеріалів типу 2H-MoS₂. Видно мікронні й субмікронні фрагменти, деякі з яких мають розколоті краї, характерні для термічно- або механічно-обробленого MoS₂.

Друге зображення демонструє більш ущільнену структуру порівняно з першим зображенням — частинки щільно упаковані, зі зменшеними міжзерновими порами. Спостерігається більша кількість тонких шаруватих включень, що мають вигляд деламінованих, або частково ексфолійованих фрагментів. Багато частинок мають тонколистовий вигляд, з паралельними шарами, що частково відкриті до поверхні.

Обидва зразки демонструють типову морфологію для 2D-дихалькогенідів: лускоподібні частинки, плоскі краї, орієнтація шарів. Наявність зубчастих країв, кутових зломів і викривлень може бути джерелом вакансій сірки.

Представлені на Рис.21 зображення наночастинок MoS₂, отримані за високого збільшення (94.8 тис.× і 190 тис.×), дозволяють провести деталізований морфологічний аналіз поверхні та внутрішньої структури індивідуальних фрагментів матеріалу. Зображення чітко демонструють тонкошарову, характерну для дихалькогенідів перехідних металів структуру, що складається з великих, лускоподібних частинок, які в свою чергу

складаються з декількох зчеплених кристалічних листів MoS_2 . Частинки мають витягнуту геометрію, гладку поверхню та значну кількість «зон розшарування» або часткової ексfolіації — ознак, які свідчать про низьку енергію міжшарової взаємодії (Ван-дер-Ваальсові сили) та наявність потенційних шляхів для їх подальшого розділення на моношари або кількешарові нанопластилини.

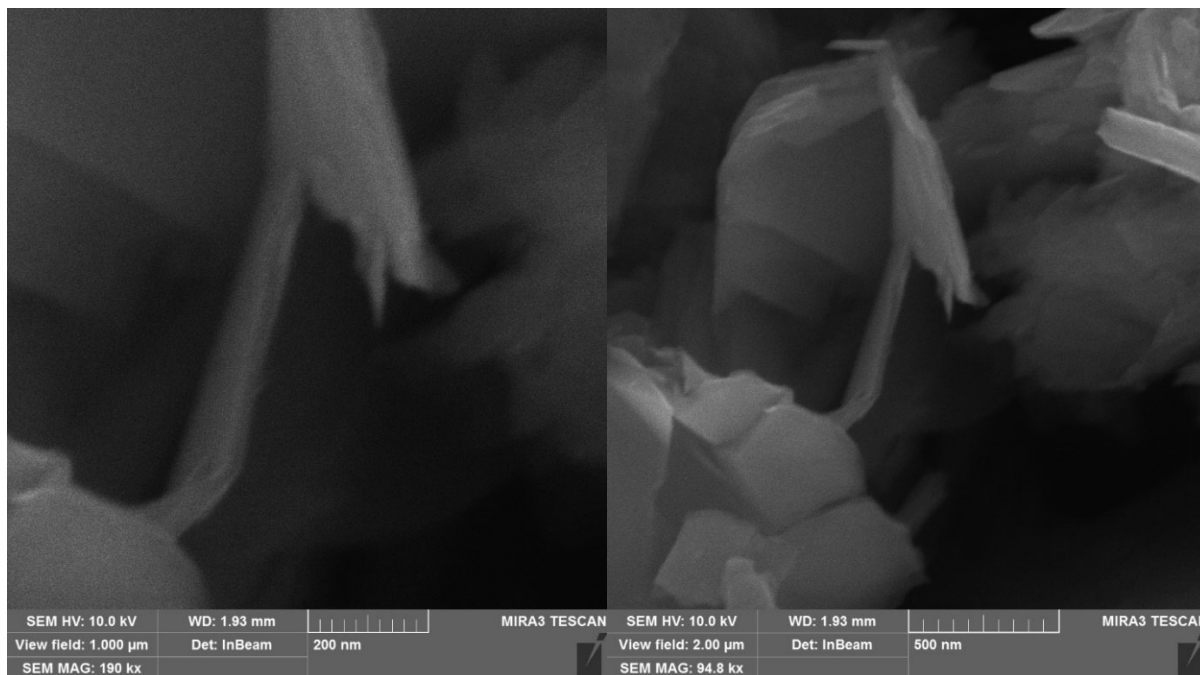


Рис.21. СЕМ зображення наночастинок MoS_2

На деяких ділянках зображень видно тонкі згини та виступи на краях листів з типовими для MoS_2 наноструктур дефектами — це може бути джерелом неоднорідного електронного заряду, локальних магнітних моментів або каталізаторних центрів. Місцями спостерігаються вигнуті або «скручені» краї, які, згідно з літературними даними, пов'язані з внутрішніми напруженнями, що виникають під час термічної або механохімічної обробки порошку. Видима товщина листів свідчить про наявність багатшарових фрагментів з товщиною в межах кількох десятків нанометрів, що узгоджується з частковою ексfolіацією або подрібненням кристалітів. Характерна матова текстура частинок, помітна на другому зображенні, може бути пов'язана з

відсутністю аморфного забруднення на поверхні та є ознакою високої чистоти зразка. З урахуванням розмірів полів зору (1–2 мкм), ці зображення демонструють характерні властивості диспергованого MoS₂, який знаходиться на етапі переходу від первинного агломерату до індивідуально структурованих нанолістків.

Наведене на Рис.22 зображення наночастинок MoS₂, отримане на збільшенні 12.6 тис. за умов напруги 10.0 кВ та робочої відстані 1.94 мм, дозволяє провести детальний аналіз морфології матеріалу на мікрометричному рівні. Частинки мають добре виражену пластинчасту структуру з чітко окресленими краями і варіативними розмірами, що коливаються в межах від 1 до 5 мкм. Спостерігається агрегована укладка частинок, які формують щільну кристалічну масу з окремими включеннями розщеплених пластин, що утворюють локальні розриви у міжшаровому зв'язку.

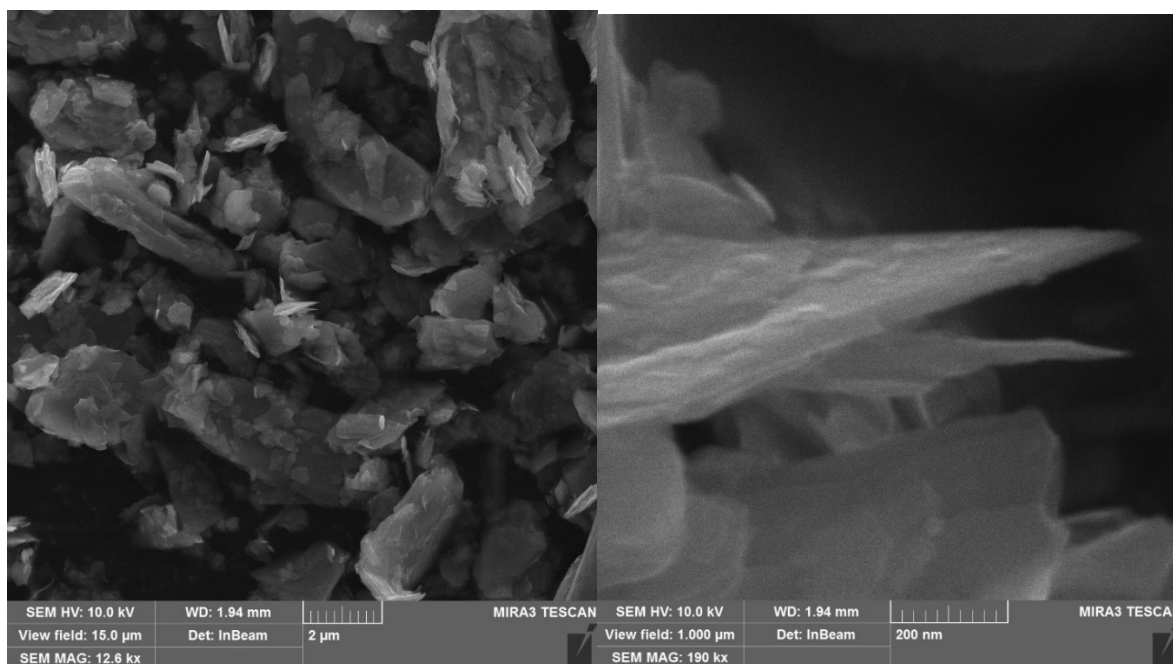


Рис.22. СЕМ зображення наночастинок MoS₂

На поверхні частинок помітна характерна «щіткоподібна» субструктура у вигляді коротких витягнутих ламел або пелюсткоподібних виступів, що розташовані перпендикулярно до основної площини пластини. Їх поява може

бути пов'язана із зародженням зон фрагментації в кристалічних межах або із залишковими міжшаровими напруженнями, що утворились внаслідок неоднорідного відпалу чи градієнтного охолодження. Така морфологія створює потенційні активні центри, які здатні підсилювати електромагнітну взаємодію з зовнішніми полями, особливо у контексті інфрачервоного або раманівського зондування. У порівнянні з попередніми зображеннями MoS_2 , тут частинки мають меншу деформацію країв та більш монолітний вигляд, що свідчить про меншу кількість поверхневих дефектів, або про кращу кристалографічну впорядкованість у вибірковій зоні. Відсутність аморфної фази підтверджує високу ступінь чистоти зразка. Комплексно ця морфологія свідчить про добре збережену шарувату структуру матеріалу з частково активованими зонами розщеплення.

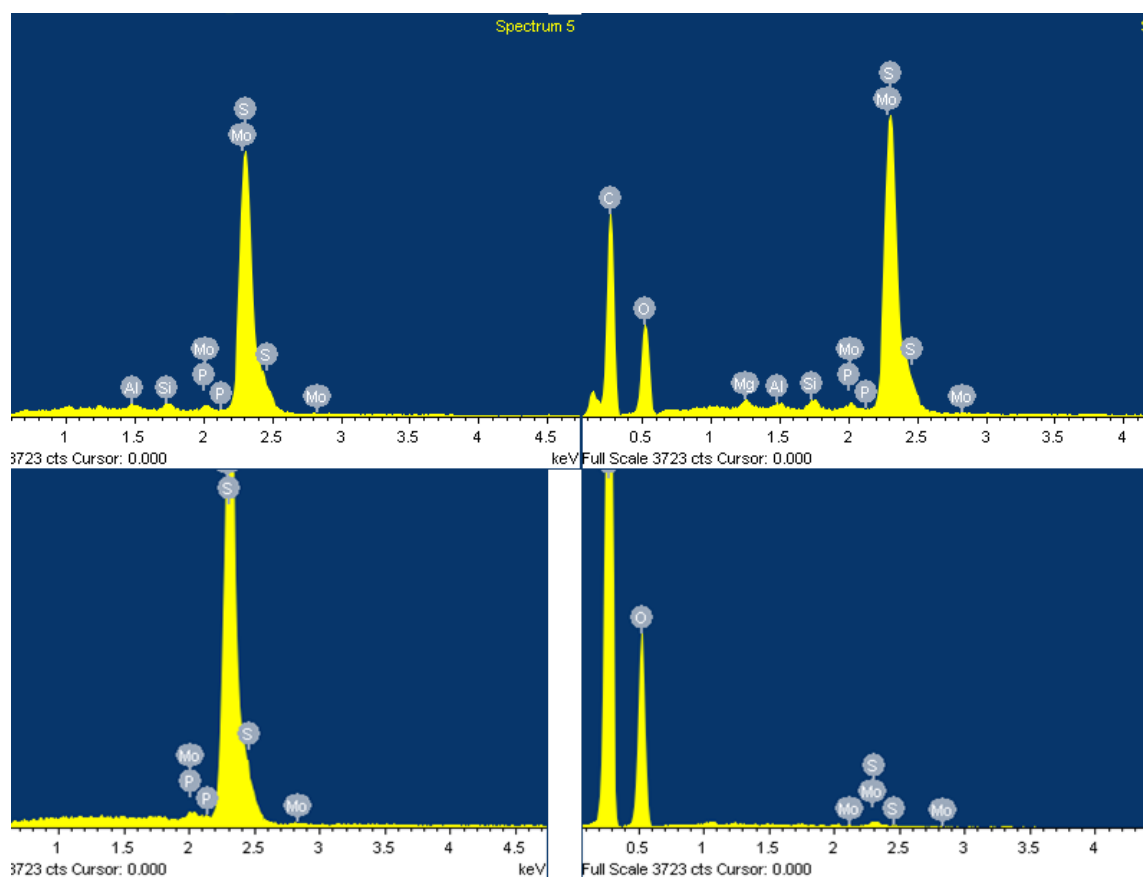


Рис.23. Спектри вимірювань EDS для MoS_2

Результати EDS-вимірювань Рис.23 свідчать про присутність у спектрах високого вмісту вуглецю (C) — до 77.8 ат% у деяких випадках. Оскільки аналіз

проводився на електропровідній вуглецевій підкладці, вміст С слід розглядати як неінформативну компоненту, що не відображає реального хімічного складу наночастинок. В зразках, нанесених на вуглецеву стрічку, сигнал від С часто переважає через сильне поверхнєве розсіювання вторинних електронів.

У зв'язку з цим, для адекватного оцінювання співвідношення Мо : S, доцільно перенормувати дані на суму атомних відсотків лише по елементах, що входять до складу MoS₂ (тобто Мо і S), виключаючи С.

Середнє значення співвідношення S:Мо по чотирьох спектрах:

- $(1.80 + 1.65 + 1.78 + 1.56) / 4 = 1.70 \pm 0.1$

Середнє відношення S : Мо $\approx 1.70 : 1$, тоді як для ідеального MoS₂ воно становить 2.00 : 1. Це свідчить про стійкий дефіцит сірки, що становить приблизно 15% відносно ідеального складу.

Такий дефіцит сірки добре узгоджується з публікаціями, які вказують на те, що навіть часткове зменшення кількості S на 10–20% призводить до виникнення незаповнених d-орбіталей Mo⁴⁺; утворення локальних магнітних моментів; перехід до металевої 1T-фази (особливо при температурному впливі, або напруженні); збільшення електропровідності за рахунок переносу заряду.

У спектрах присутній значний вміст кисню (O) — до 27.45 атомних відсотків, що вказує на окислення Мо до MoO₃ або наявність адсорбованої води/кисню на поверхні частинок. Поява інших елементів, таких як Fe, Si, Al, Mg хоча й у невеликих концентраціях, вказує на домішки мінерального походження; можливе забруднення під час підготовки зразка (наприклад, із використанням агатової ступки чи алюмінієвих частин обладнання). Такі включення не характерні для чистого MoS₂, але узгоджуються з результатами, представленими в літературі для комерційних технічних порошків, які зазвичай мають 15–20% оксидних/мінеральних домішок

В цілому, зразки наночастинок MoS₂ характеризується значним ступенем хімічної гетерогенності, що проявляється у розкиді значень Мо і S, а також появі супутніх елементів у різних спектрах. Така неоднорідність є функціонально значущою, адже прямо впливає на електричні, магнітні й

оптичні властивості матеріалу. Порівняння з літературою підтверджує, що подібний ступінь варіативності складу є типовим для нанорозмірних TMDC-порошків, особливо у вигляді агрегатів.

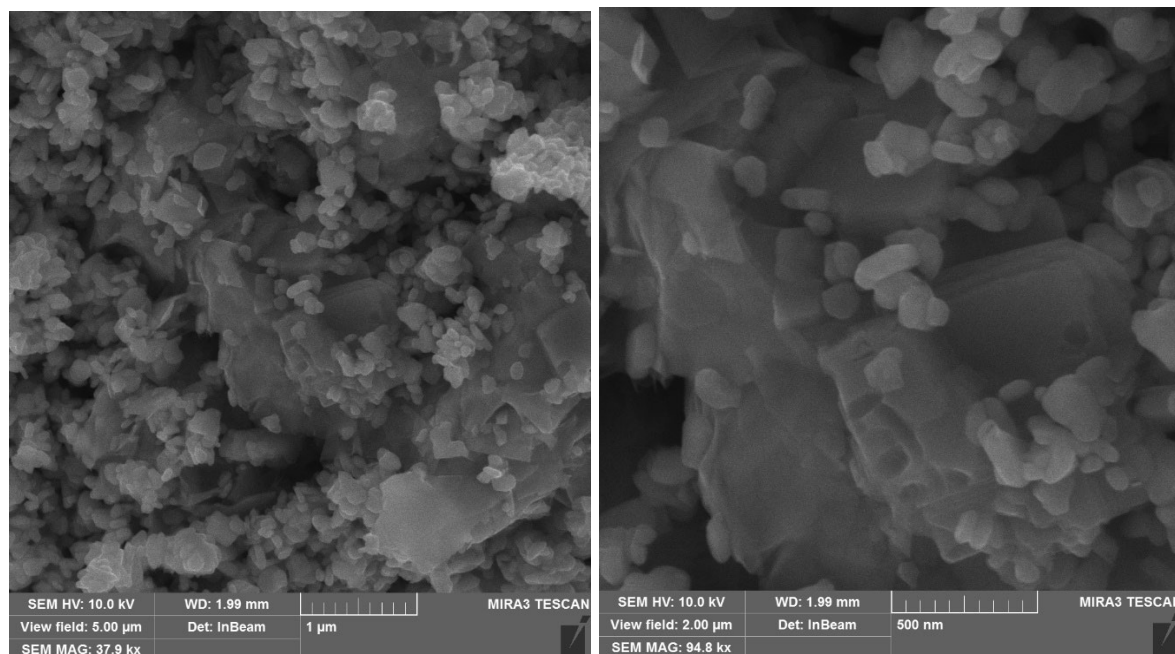


Рис.24. СЕМ зображення наночастинок WS₂

Наведені на Рис.24 зображення наночастинок WS₂, отримані за високого збільшення (37.9 тис.× та 94.8 тис.×) в умовах напруги 10.0 кВ і робочої відстані 1.99 мм, демонструють характерну для цього дихалькогеніду морфологічну структуру, але з вираженими відмінностями від спостереженого раніше MoS₂. На обох зображеннях чітко видно великі, ламелярні пластинчасті частинки, які утворюють основу, та щільно розподілені наночастинок округлої форми, що вкривають поверхню більших агрегатів.

На зображеннях чітко видно складну ієрархічну структуру WS₂-порошку, що включає великі, кристалічні фрагменти неправильної форми, оточені великою кількістю дрібних округлих або ізометричних наночастинок. Основні частинки мають лускоподібну морфологію з діаметром від 0.3 до 1.5 мкм, із сплюсненими або трохи викривленими поверхнями, що відображає шарувату кристалографічну природу WS₂ з орієнтацією вздовж площини (001).

Пластини не мають чітко оголених країв або фрактур, що свідчить про помірний ступінь ексfolіації або навіть збереження багатошарових доменів. На деяких з них можна розрізнити ступінчасті рівні, які, ймовірно, відповідають межам між окремими сульфідними шарами в кристалі.

Наночастинки мають високу сферичність та однорідність розмірів у межах 20–60 нм, що може бути агломерації WS_x або субоксидів, які часто утворюються на поверхні при окисленні WS_2 в повітрі або під час обробки в розчинах. Водночас видно, що краї цих частинок не мають яскраво виражених зигзагоподібних або розірваних країв, характерних для дефектного MoS_2 , що вказує на більшу структурну стабільність WS_2 . Високий ступінь поверхневої зернистості також сприяє збільшенню питомої площі поверхні, що позитивно впливає на каталіз та адсорбційні властивості.

Таким чином, представлені зображення демонструють морфологічну структуру з ознаками багаторівневої організації та хімічної неоднорідності: стабільне шарувате ядро WS_2 з перетворенням поверхні у наногранульовану фазу. Враховуючи СЕМ-картину разом із EDS-даними з попередніх аналізів, можна зробити висновок про часткову дестабілізацію структури поверхні з утворенням активних центрів, що потенційно впливають на спектроскопічну й електричну поведінку наночастинок WS_2 .

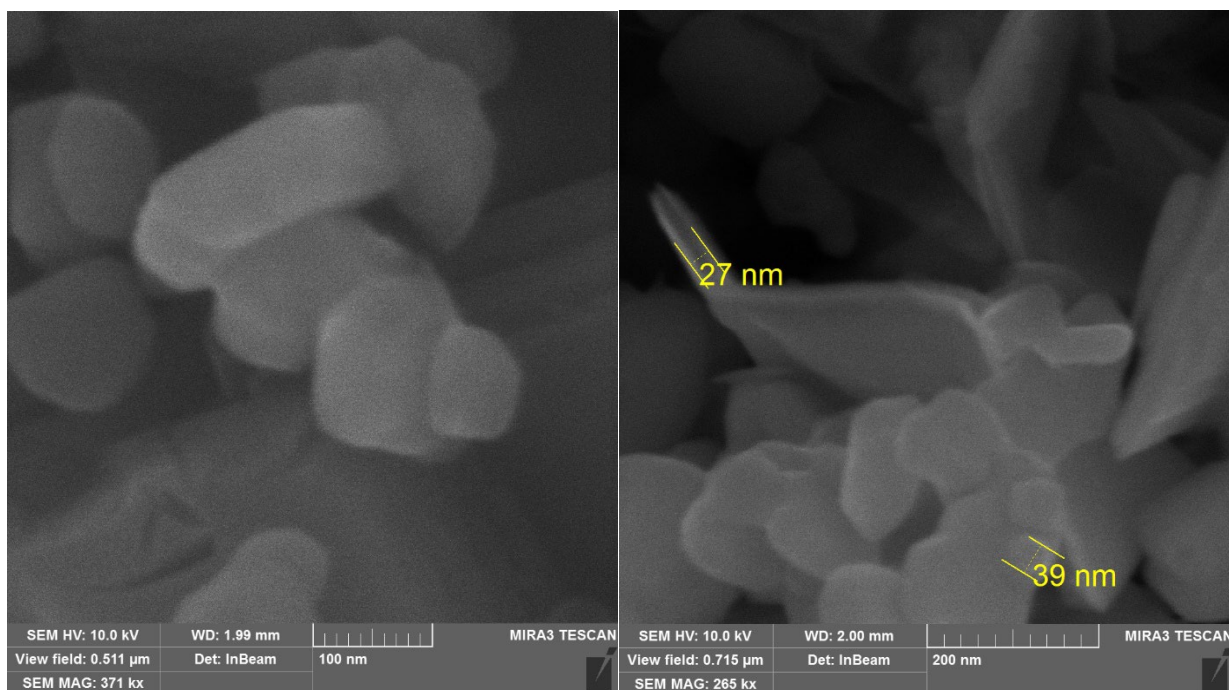


Рис.25. СЕМ зображення наночастинок WS_2

Наведені на Рис.25 зображення наночастинок WS_2 , отримані за високих збільшень 265 тис. $\times$ та 371 тис. $\times$ із полем зору 0.715 мкм (друге зображення) та 0.511 мкм (ліве зображення), демонструють високороздільну наноморфологію частинок, що істотно доповнює попередні спостереження на мікрорівні.

На першому зображенні (Збільшення: 371 000 $\times$) чітко візуалізуються окремі наночастинок, що мають переважно овальну форму, з розмірами в межах 60–100 нм. Їхні поверхні виглядають згладженими, але з геометрично структурованими межами, що, ймовірно, пов'язано з орієнтованим ростом кристалів за напрямками найменшої поверхневої енергії.

Найбільший інтерес становить праве зображення (збільшення: 265 000 $\times$), де нанесено прямі розмірні маркери на типових нанопластинах. Зокрема, зафіксовано, товщину одного з фрагментів — ~ 27 нм, товщину другого — ~ 39 нм. Ці значення однозначно вказують на багат шарову природу нанопластин WS_2 , оскільки товщина одного моношару 2H-WS_2 становить приблизно 0.62–0.65 нм. Таким чином, частинки товщиною 27 нм і 39 нм можуть відповідати

приблизно 40–60 шарам, тобто вони залишаються в межах ультратонких кристалів, але ще не доходять до рівня моно- або кількшарових матеріалів.

Поверхня нанопластин є відносно гладкою і однорідною, без значних тріщин чи пор, що вказує на відсутність надмірного механічного руйнування або хімічної деградації. Проте по краях частин видно деякі сколи та мікроступи, що можуть бути результатом поверхневого зростання або початкової стадії фрагментації.

Крім пластинчастих частинок, видно менші ізометричні або злегка видовжені наногранули діаметром 20–40 нм, які щільно оточують більші елементи. Їхня рівномірна присутність свідчить про поверхневу кристалізацію WS_xO_y або W–O фаз, що узгоджується з EDS-даними з попереднього аналізу (O ~13%, дефіцит S ~13–14%). Такі форми розглядають як результат гетерогенної нуклеації в окислювальному середовищі, здатної створювати активні зони з нерівномірним зарядом.

Підсумовуючи, зазначені СЕМ-зображення надають пряме підтвердження того, що зразок WS_2 являє собою двофазну наноструктуру:

Основна — багатшарові нанопластини товщиною 20–40 нм, з відносно гладкою поверхнею та помірною дисперсією;

Поверхнева — дрібні ізометричні наногранули, розміщені нерівномірно на основі, з імовірною окисною природою.

Таким чином, спостережена морфологія підтверджує, що WS_2 у цьому випадку має контрольовану наноструктуру з дефектно-активованою поверхнею, що зберігає кристалічну цілісність.

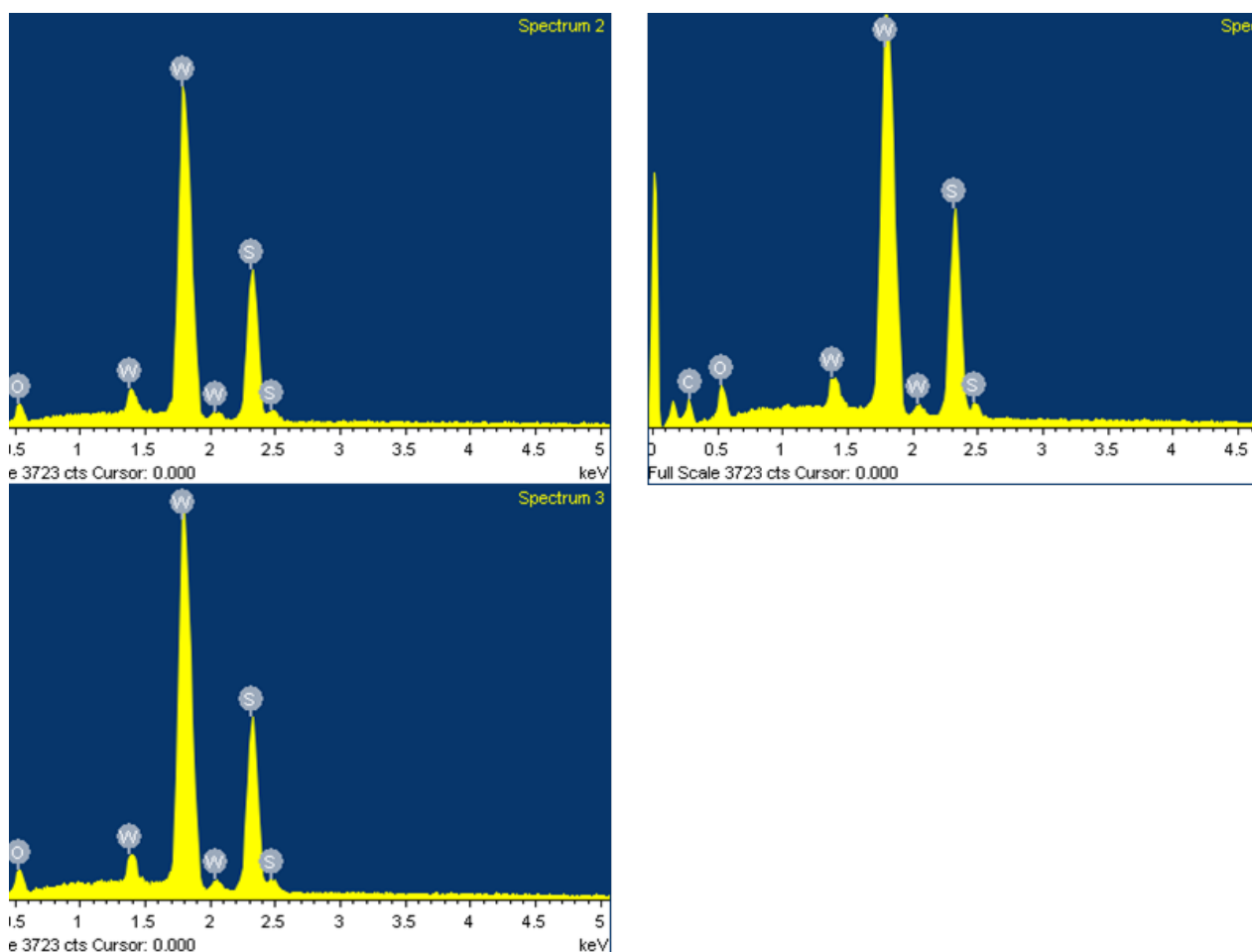


Рис.26. Спектри EDS вимірювання наночастинок WS₂

Основна формула WS₂ передбачає стехіометричне співвідношення W : S = 1 : 2, що в атомному вираженні дорівнює 33.3% W : 66.6% S.

У наданому EDS-аналізі Рис.26 та Табл.1. (таблиця з атомними відсотками) по трьох спектрах маємо такі значення:

Спектр	O (%)	S (%)	W (%)
1	14.59	52.80	32.62
2	11.55	53.42	35.02
3	12.76	52.21	35.03
Середнє	12.96	52.81	34.22

Табл.1. Результати вимірювання спектрів EDS для наночастинок WS₂

Співвідношення S:W у середньому $\approx 1.54 : 1$, що свідчить про дефіцит сірки близько 23% від ідеальної стехіометрії. Такий дефіцит є істотним і вказує на розвинену дефектну структуру WS_2 , зокрема вакансії сірки.

Наявність O в середньому ~ 13 ат.% підтверджує поверхнєве окислення частинок — утворення W–O зв'язків (частково аморфні фази WO_3 або WS_xO_y), що було також підтверджено FTIR-даними.

Такі значення узгоджуються зі структурною формулою, але також показують стійку присутність кисню, попри умови аналізу у вакуумі, невелику варіацію S, що підтверджується малим стандартним відхиленням (0.63 ат.%), відносну гомогенність вмісту W, з відхиленням лише ~ 1.4 ат.%.

Лінії поглинання вуглецю походять від вуглецевої адгезійної плівки, на які фіксувались зразки для СЕМ аналізу. Також, варто враховувати, що вміст кисню, може бути переоцінено через включення елементів з підкладки.

EDS-результати для наночастинок WS_2 свідчать про відхилення від ідеальної формули через дефіцит сірки та поверхнєве окислення

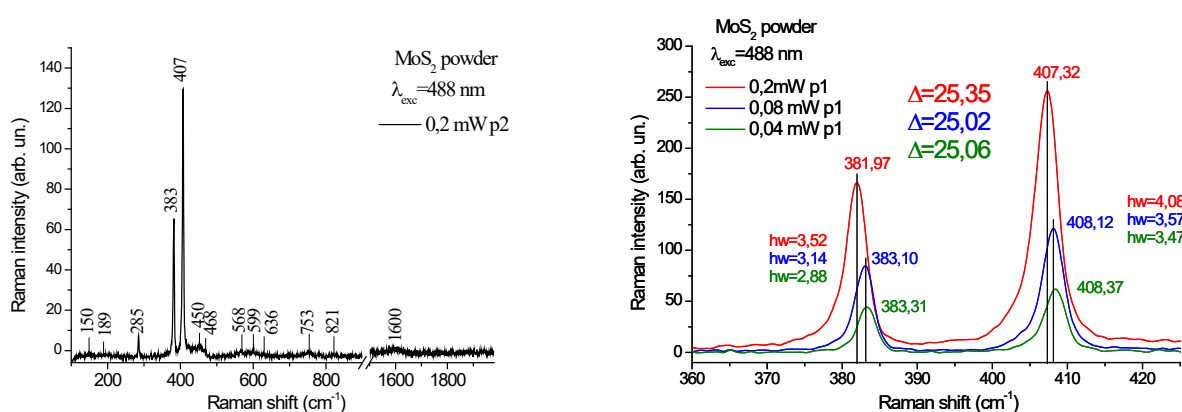


Рис.27. Раманівські спектри зразків MoS_2

Раманівська спектроскопія зразків Рис.27 показала, що досліджувані частинки MoS_2 в основному складаються з чотирьох до шести S–Mo–S шарів. Це підтверджується порівнянням спектрів з результатами, наведеними у попередніх дослідженнях, де основні піки E^2g^1 та A_{1g} для таких товщин

проявляються з відповідним зсувом у частоті. Така кількість шарів відповідає інтермедіарному стану між моно- та багат шаровими структурами, що є ключовим фактором у контролі електричних і оптичних властивостей MoS_2 .

3.2 Електричні та магнітні властивості MoS_2 та WS_2

Для зразків MoS_2 були проведені електричні вимірювання, що здійснювались у відділі фізики твердого тіла О. Пилипчуком та відділі магнетизму Ф.Бондаруком на тих же зразках наночастинок, що і всі інші виміри в цій роботі і тут наводяться для розуміння фізичної природи і властивостей наночастинок. Електричні властивості досліджено за допомогою спеціально побудовано електричної схеми, яка дозволяла проводити аналіз стаціонарних та нестаціонарних (перехідних) процесів електропереносу [5]. Важливим результатом експерименту є наявність перехідних процесів у електричному транспорті у зразках ущільнених наночастинок MoS_2 , що можуть бути пов'язані з механізмом міграційної (міжшарової) поляризації. Цей тип поляризації зазвичай проявляється за достатньо високих температур і низьких частот та зумовлений переміщенням слабо зв'язаних іонів на відстані, порівняні з розмірами зразка. В нашому випадку зразки формувалися шляхом механічного стискання дрібнодисперсного порошку, який характеризується широким розподілом частинок за розмірами. Також важливою особливістю є наявність значного дефіциту сірки, зв'язаний кисень, а також велика кількість внутрішніх меж поділу, що сприяють формуванню заряджених дефектів різної природи. Така неоднорідна структура ускладнює аналітичне моделювання динаміки переносу заряду та визначає обраний нами підхід до аналізу експериментальних результатів. Аналіз кривих спаду напруги на зразку у режимі без навантаження показав, що в усьому дослідженому температурному діапазоні та для всіх значень одновісного стискання поведінку не можна описати простою експоненційною функцією. Натомість спостережувані закономірності добре узгоджуються з так званим

"розтягнутим" експоненціальним законом, який широко застосовується при аналізі властивостей неупорядкованих матеріалів, зокрема для опису спаду фотопровідності в напівпровідниках з флуктуаціями складу або легування:

$$U = U_0 \exp \left[-\frac{(t - t_0)^\beta}{\tau} \right], \beta < 1$$

де t_0 — момент початку спаду, τ — характерний час релаксації, а β — параметр, що визначає "розтягнутість" експоненти. При $\beta=1$ закон переходить у звичайну експоненту, а значення $\beta<1$ вказують на широкий спектр релаксаційних часів, типовий для систем із сильною структурною або енергетичною неоднорідністю.

Дослідження електричного переносу заряду в зразках, сформованих із дрібнодисперсного порошку частинок MoS_2 різної форми та розмірів виявило що у таких системах спостерігаються довготривалі перехідні процеси у провідності. Після прикладання напруги до зразка фіксується повільне встановлення залишкового струму в колі, а після її вимкнення — тривалий спад напруги на зразку в режимі холостого ходу. Тривалість цих процесів сягає десятків або навіть сотень секунд, що свідчить про наявність внутрішньої поляризаційної релаксації. Часові залежності струму та напруги добре описуються функцією розтягнутої експоненти, що є типовим для неекспоненціальних механізмів релаксації.

Виявлену поведінку можна інтерпретувати в межах моделі "міграційної поляризації", що застосовується до неоднорідних діелектриків. Це обґрунтовано наявністю дефектів, домішок, процесів окиснення, а також хаотичним характером розподілу частинок за формою, розміром і зарядовим станом у шарі MoS_2 .

Теоретичні та експериментальні дослідження [5,6] показали, що у двовимірних дихалькогенідах перехідних металів, зокрема MoS_2 і WS_2 , феромагнетизм може бути індукований як шляхом легування магнітними елементами, так і внаслідок структурних дефектів або маніпуляцій з краєвими ефектами. Зокрема, феромагнітний порядок у MoS_2 може виникати не лише

при легуванні, а й унаслідок протонного опромінення або термічного відпалу. Крім того, феромагнітна впорядкованість була зафіксована й у об'ємних зразках MoS_2 , що пояснюється наявністю зигзагоподібних граней в області міжзернових меж.

Такі фактори, як напруження підкладки або додаткове легування, також можуть модифікувати феромагнітний порядок у моношарах MoS_2 .

Порівняння експериментальних результатів із теоретичними моделями свідчить, що прояви феромагнетизму як у чистих, так і в легованих зразках MoS_2 або WS_2 , як правило, асоціюються з дефектами кристалічної ґратки, краєвими ефектами тощо [6].

Хоча у більшості досліджень немодифіковані (природні, non-annealed) зразки MoS_2 демонструють діамагнітний сигнал, у нашому випадку спостерігалася феромагнітна поведінка навіть у вихідних наночастинках. Це вказує на ймовірну роль поверхневих або краєвих ефектів, а також локальних дефектів у формуванні спонтанного магнітного моменту.

Оцінка магнітного моменту на формульну одиницю (f.u.) показала:

- для відпаленого MoS_2 — $0.0017 \mu\text{B}/\text{f.u.}$,
 - для невідпаленого зразка — $0.00036 \mu\text{B}/\text{f.u.}$
- (де μB — магнетон Бора, *f.u.* — формульна одиниця речовини).

Це додатково підтверджує, що дефекти кристалічної ґратки, вакансії сірки та крайові стани можуть бути причиною виникнення феромагнетизму в зразках MoS_2 . У разі WS_2 зразки виявляють діамагнітну поведінку, що є типовим для цього матеріалу. Проте, у низькотемпературному діапазоні (100 К) спостерігається додатковий парамагнітний внесок

Таким чином, бачимо що наночастинки MoS_2 демонструють феромагнітну поведінку за рахунок дефектів, краєвих ефектів і можливої фази 1T; наночастинки WS_2 залишаються діамагнетиками, хоча й проявляють слабкий парамагнетизм при низьких температурах

Із вищенаведеного, можна зробити висновок, що феромагнітна поведінка MoS_2 пояснюється локальними структурними перебудовами у прикраєвих

зонах багат шарових частинок, нестехіометрією, вакансіями сірки та незначними домішками. [6].

Аналіз методом СЕМ показав, що наночастинки MoS_2 мають виражену ламелярну структуру з тенденцією до розшарування та високим ступенем мікроскопічної фрагментації, в той час як WS_2 характеризується більш компактною морфологією з наногранулами на поверхні агрегованих пластинчастих кристалів. Дослідження дозволили встановити, що типові товщини пластин MoS_2 та WS_2 складають 20–40 нм, що відповідає 30–60 шарам. Наявність поверхневих наночастинок на WS_2 у формі сферичних наногранул з розмірами 30–80 нм дозволяє припустити формування вторинної оксидної або дефектної фази типу WS_xO_y , що підтверджено також EDS.

EDS-аналіз наноструктур MoS_2 засвідчив наявність стабільного дефіциту сірки (в межах 15–25%), що порушує ідеальну стехіометрію ($\text{S}:\text{Mo} \approx 1.70:1$ замість 2:1) і свідчить про присутність S-вакансій. Водночас, у зразках WS_2 виявлено дещо нижчий, але систематичний дефіцит сірки ($\text{S}:\text{W} \approx 1.54:1$), а також стабільний вміст кисню на рівні 12–14 ат.%, що вказує на окиснення частинок і формування W–O зв'язків на поверхні. Отримані дані підтверджують високий ступінь хімічної гетерогенності обох систем, особливо MoS_2 , із просторовими коливаннями елементного складу, що досягають $\pm 10\%$ у межах одного зразка. Такі варіації мають ключовий вплив на фізичні властивості матеріалів, зокрема на електропровідність, магнітний порядок і спектральну активність.

3.3. Висновки до Розділу 3

1. Охарактеризовано наночастинки MoS_2 і WS_2 методами СЕМ та EDS. В обох зразках спостерігається дефіцит сірки (до 12%). WS_2 окислений - до 4,7% кисню

2. Наночастинки MoS_2 мають виражену ламелярну структуру з тенденцією до розшарування та високим ступенем мікроскопічної

фрагментації, в той час як WS_2 характеризується більш компактною морфологією.

3. MoS_2 проявляє властивості феромагнетика і резистивного перемикача, тоді як WS_2 демонструє діамagnetну стабільність, структурну цілісність і високу поверхневу реактивність. Феромагнітна поведінка MoS_2 , зумовлена локальною структурною реорганізацією кількох шарів MoS_2 на краях частинок, нестехіометричністю зразків, вакансіями та незначними домішками заліза

РОЗДІЛ 4. СПЕКТРОСКОПІЧНІ І МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ МОДЕЛЬНИХ МЕМБРАН ТА ЇХ ВЗАЄМОДІЇ З НАНОЧАСТИНКАМИ MoS_2 ТА WS_2

4.1. Характеризація модельних мембран- ліпосом

Ліпосоми є універсальною та широко застосовуваною моделлю у дослідженнях біофізичних, хімічних та біомедичних властивостей клітинних мембран. Їх структура, гнучкість у складі та простота функціоналізації роблять їх особливо корисними у міждисциплінарних дослідженнях на межі біології, хімії, нанотехнологій і медицини. В даній роботі, ліпосоми виступають ключовим елементом для вивчення механізмів структурних перебудов під впливом 2D наночастинок, що дозволяє глибше зрозуміти принципи формування стабільних біо-неорганічних наногібридів.

Структура ліпосом базується на здатності фосфоліпідів до самозбірки у водному середовищі, що зумовлюється амфіфільною природою цих молекул. Гідрофільна головка та два гідрофобні хвости сприяють утворенню замкнених двошарових везикул, у яких внутрішній водний об'єм оточений подвійною ліпідною мембраною [84-86]. Така модель імітує ключові структурні та функціональні характеристики біологічних мембран, зокрема бар'єрну

функцію, динамічну текучість та можливість для специфічної взаємодії з білками, іонами чи наноструктурами.

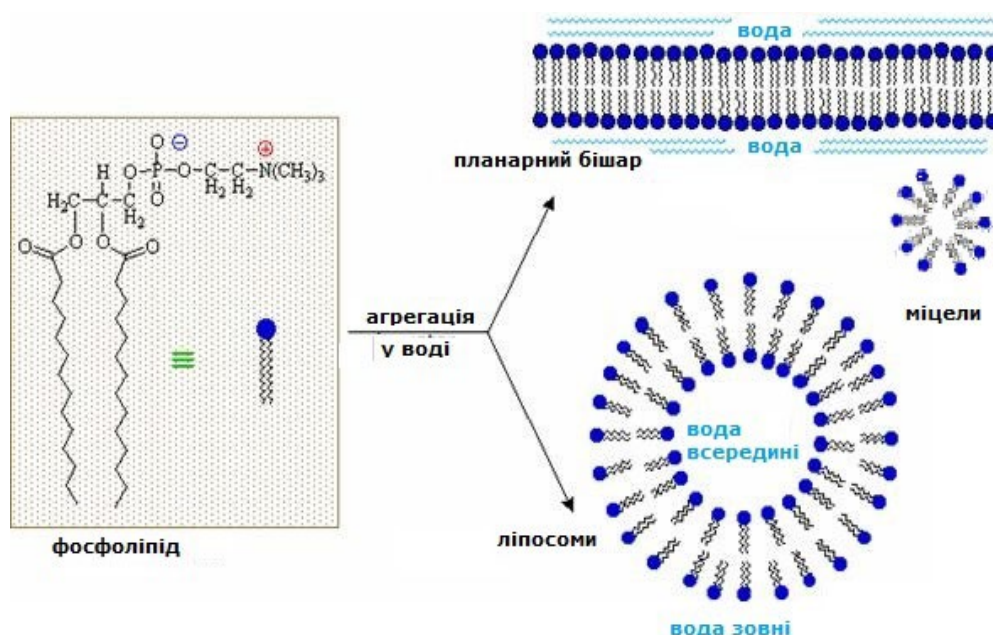


Рис.28. Структура модельних ліпосом

У представлених дослідженнях як базовий ліпід використовувався (DOPC) — нейтральний фосфоліпід, що характеризується низькою температурою фазового переходу ($\sim 20^\circ\text{C}$), високою стабільністю та відмінною біосумісністю. Завдяки наявності двох ненасичених олеїнових кислот у складі гідрофобних ланцюгів, DOPC сприяє формуванню рідкокристалічного стану мембрани, при кімнатній температурі, що забезпечує флюїдність і пластичність мембранної структури. Це дозволяє імітувати фізіологічні умови та взаємодії, властиві живим клітинам.

В окремих випадках до складу ліпосом, рис.28, додатково включали холестерол для утворення ліпідних рафтів – структур з більш компактною упаковкою та збагачених холестеролом. Залучення таких добавок дозволяє моделювати різні типи біологічних мембран і вивчати специфіку впливу наночастинок на структурно відмінні фосфоліпідні системи.

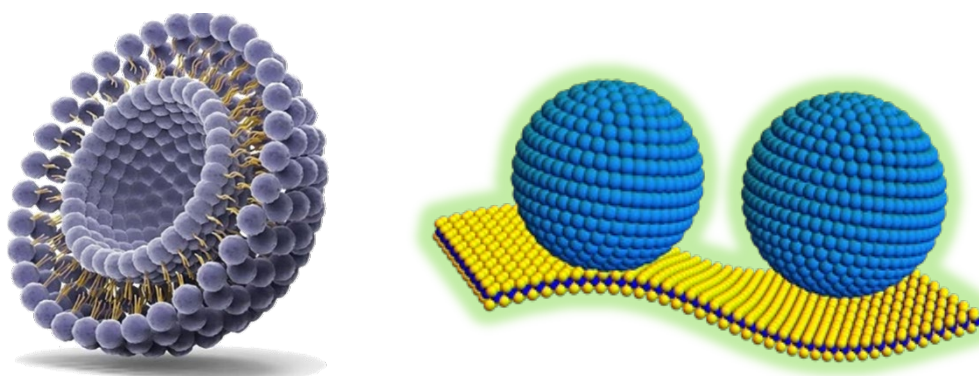


Рис.29. Візуалізація структури ліпосом та їх взаємодій [4]

У системах, що розглядалися, ліпосоми, рис.29, виконували роль модельного середовища для аналізу внутрішньої (включення) та зовнішньої (адсорбції) локалізації наночастинок MoS_2 і WS_2 , з метою виявлення структурних і спектроскопічних змін, які вони викликають. Це дозволяє не лише вивчати фундаментальні механізми взаємодії неорганічних наноструктур із біомембранами, але й оцінити потенціал таких систем у ролі гібридних нанобіоматеріалів для сенсорики, таргетної доставки лікарських засобів та фототермальної терапії

4.1.1. Створення модельних ліпосом

Процес приготування модельних ліпосом здійснювався за протоколом, заснованим на послідовному виконанні процедур осадження фосфоліпідів, гідратації та фізичної деструкції ліпідних агрегатів із метою формування стабільних везикул малого діаметру. В якості основного компоненту використовувався DOPC, придбаний у компанії *Avanti Polar Lipids* (850375-18:1 (*Δ9-Cis*) PC) і використаний без додаткового очищення. Відомо, що DOPC має два ненасичені олеїнові залишки в позиціях sn-1 і sn-2 та нульовий загальний заряд, що робить його оптимальним для формування стабільної двошарової мембрани в умовах фізіологічного pH.

На першому етапі готували стоковий 4 мМ розчин DOPC у хлороформі, який потім розділяли на потрібну кількість проб. Для утворення сухої ліпідної

плівки хлороформ випаровували струменем газоподібного азоту протягом кількох хвилин до повного зникнення розчинника. Після цього залишену на дні пробірки тонку рівномірну плівку ресуспендували, додаючи 0,5 мл дистильованої води з рН 5,5, попередньо підготовленої для забезпечення стабільності гідратації. Процес відшаровування ліпідів з плівки та подальшого формування везикул проводили за допомогою трьох циклів "заморожування-розморожування". Для цього зразки заморожували у рідкому азоті (температура $\sim -196^\circ\text{C}$) на 30–60 секунд, після чого повільно залишали при кімнатній температурі впродовж 5–7 хвилин до повного розморожування. Цикл повторювали тричі [2-4].

Після розморожування, зразки піддавали ультразвуковій обробці на приладі типу UZDN-A (22 кГц, 30 Вт) протягом 1–2 хвилин. Дія ультразвуку розщеплювала більші мультиламелярні структури, сприяючи утворенню ліпосом малого діаметру (SUVs). За оптичними та DLS спостереженнями, кінцевий діаметр ліпосом варіювався в межах 200–250 нм у контрольних умовах. Після утворення ліпосом суспензія мала опалесцентний, матовий вигляд, що слугувало візуальним індикатором успішної самоорганізації ліпідів.

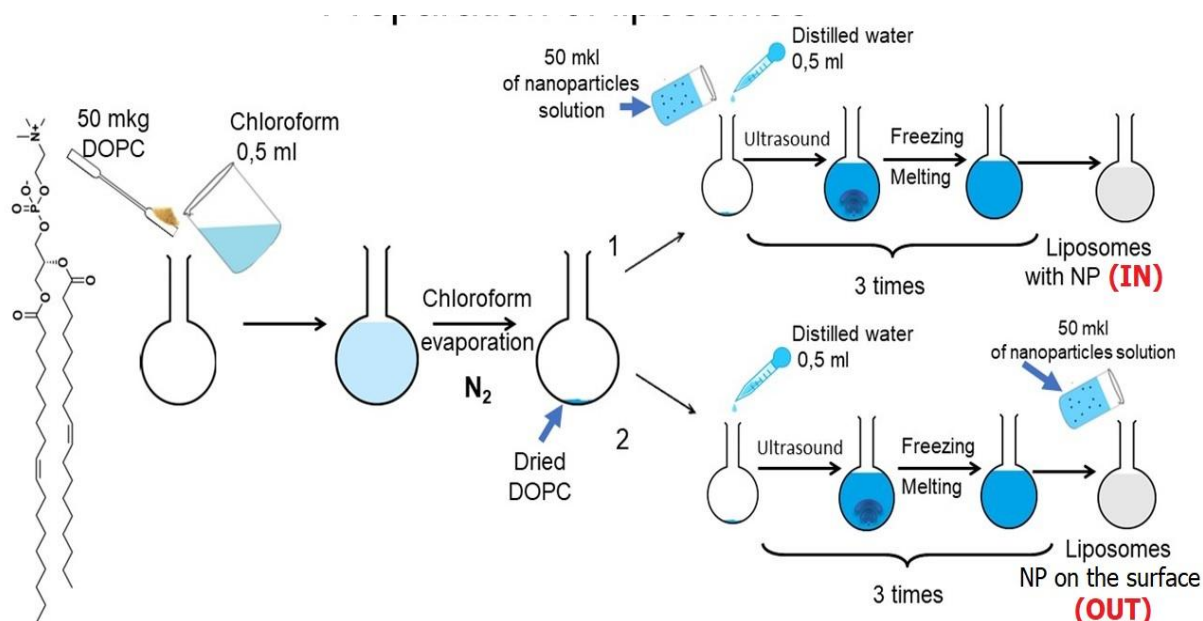


Рис. 30. Схема отримання двох типів зразків «ліпосома–наночастинка»: внутрішнє (IN) та зовнішнє (OUT) розміщення наночастинок

Для подальших експериментів [3] була застосована розроблена у відділі методика отримання ліпосом разом з наночастинками (Рис.30). Було виготовлено два типи ліпосомних систем:

ліпосоми з наночастинками всередині (IN) — шляхом додавання суспензії наночастинок WS_2 або MoS_2 безпосередньо до ліпідного розчину перед етапом гідратації, з подальшим виконанням усієї процедури утворення ліпосом (freeze-thaw cycles, ультразвук);

ліпосоми з наночастинками на поверхні (ON) — шляхом додавання 10 мкл водної суспензії наночастинок на кожні 100 мкл готового ліпосомного розчину, що забезпечувало адсорбцію частинок на зовнішню поверхню сформованих везикул.

Суспензії наночастинок готували окремо, розчиняючи 1 мкг WS_2 або MoS_2 (у вигляді порошку) у 1 мл дистильованої води, після чого обробляли ультразвуком протягом 30 хвилин, центрифугували (7000 об/хв, 15 хвилин) для видалення великих агрегатів, і повторно диспергували.

Перед використанням у спектроскопічному та мікроскопічному аналізі зразки ліпосом з наночастинками інкубували протягом 30 хвилин при 25 °C, після чого наносили на відповідні підкладки (кремнієва пластина для SEM/IR, кристал ATR для FTIR, полімерна кювета для DLS) залежно від методу дослідження. У випадку SEM зразки додатково сушили в ламінарній шафі при кімнатній температурі, після чого покривали провідним золотим шаром товщиною ~20 нм, нанесеним методом магнетронного напилення.

4.1.2. Аналіз модельних ліпосом методом динамічного розсіювання світла

Розміри порожніх ліпосом (без включення наноструктур), а також ліпосом, що містили наночастинки MoS_2 , були визначені за допомогою методу DLS на приладі Litesizer DLS 700 виробництва Anton Paar (Австрія). Вимірювання проводили в режимі MAPS (multi-angle particle sizing) — багатокутного визначення розмірів частинок.

Зразки ліпосом готували наступним чином: у одноразові полімерні кювети наливали 1 мл суспензії, після чого зразки термостатували при 25 °С протягом 5 хв у температурній камері приладу для стабілізації.

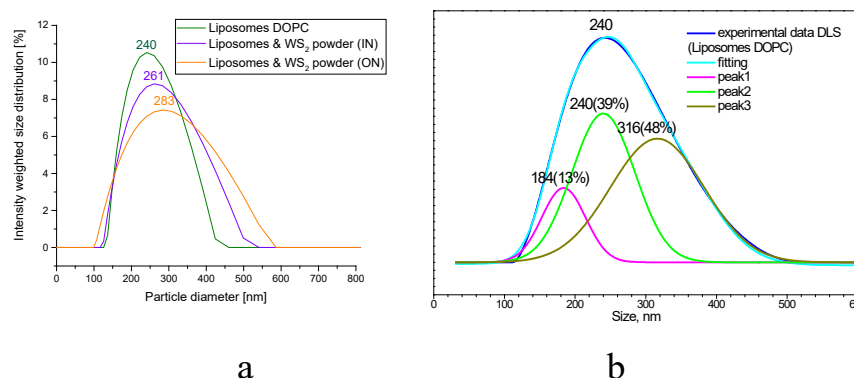


Рис. 31. Розподіл діаметрів ліпосом: а) з наночастинками WS_2 , б) фракційний розподіл вихідних ліпосом,

Згідно з результатами DLS-вимірювань [2], вихідні (порожні) ліпосоми на основі DOPC характеризуються однорідним розмірним розподілом з максимумом при 240 нм. Після модифікації ліпосом наночастинками WS_2 спостерігаються суттєві зміни у характері розподілу, що залежить як від морфології наночастинок, так і від способу їх введення (всередину або на поверхню ліпосом).

У випадку включення наночастинками WS_2 всередину ліпосом (Рис.31), максимум розподілу зсувається до 261 нм, що вказує на збільшення середнього діаметру на ~9% у порівнянні з порожніми ліпосомами. При зовнішньому покритті ліпосом наночастинками WS_2 , середній діаметр зростає до 283 нм, що є ще більш суттєвим зміщенням (рис. 31.а). Це свідчить про те, що зовнішня адсорбція наночастинок викликає більш виражене потовщення мембрани або агрегацію. Розподіл у цьому випадку залишається відносно симетричним, без появи великих фракцій понад 500 нм.

Розкладання розподілу розмірів на окремі компоненти виконане за допомогою програмного забезпечення PeakFit v4.12, демонструє наявність декількох розмірних фракцій, які відхиляються від нормального розподілу.

Для вихідних ліпосом (рис. 31.б) розподіл складається з трьох піків:

180 нм (13%) – дрібні везикули,
 240 нм (39%) – основна фракція стабільних ліпосом,
 316 нм (48%) – можлива наявність мультиламелярних структур або агломератів.

Результати DLS підтверджують, що локалізація наночастинок WS_2 суттєво впливає на геометричні характеристики ліпосом. Зовнішнє прикріплення веде до помітного зростання діаметра, тоді як внутрішнє включення може як зменшувати розмір, так і формувати нові фракції.

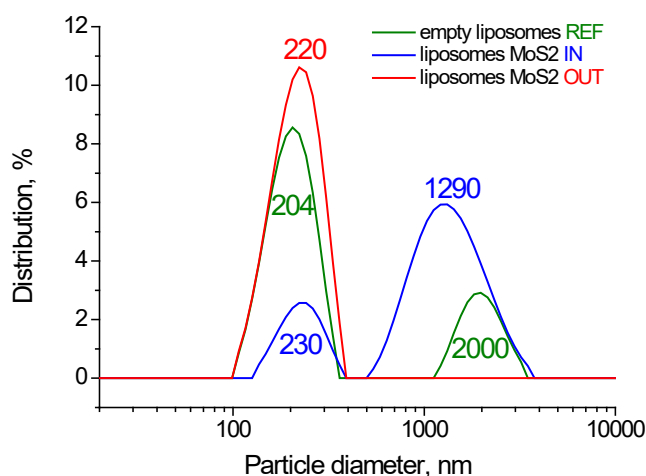


Рис. 32. Розподіл діаметрів частинок ліпосом: порожніх (контроль, зелена крива), ліпосом з наночастинками MoS_2 усередині (синя крива), та ліпосом з наночастинками MoS_2 на поверхні (червона крива).

Відповідно до результатів, порожні (контрольні) ліпосоми мають розміри в діапазоні від 100 до 350 нм, з максимумом розподілу при 230 нм. Також спостерігаються великі структури з діаметром до 2000 нм, що можуть бути сформовані внаслідок злиття кількох везикул або часткової агрегації.

При включенні наночастинок MoS_2 у ліпосоми на етапі їх формування (синя крива), відбувається суттєве зміщення розподілу діаметрів у бік більших значень. З'являється новий максимум при 1290 нм, що свідчить про переважання великих ліпосом (500–3000 нм). Це зростання розмірів (~7–12%) може бути пов'язане з внутрішнім напруженням у мембрані внаслідок включення наночастинок або змін у процесі самозбірки.

У випадку, коли наночастинки MoS₂ додавались до вже сформованих ліпосом (рис.32 для MoS₂ OUT, червона крива), спостерігається чіткий, симетричний максимум при 220 нм і відсутність великих частинок. Це свідчить про те, що наночастинки адсорбуються лише на поверхні ліпосом і не викликають їх злиття або значного збільшення об'єму. Відсутність агрегатів розміром понад 1000 нм можна пояснити осіданням важких частинок на дно пробірки під час підготовки зразків, що запобігає їх потраплянню у зону вимірювання.

Таким чином, аналіз DLS продемонстрував суттєві зміни у розмірному розподілі ліпосом залежно від способу включення наночастинок MoS₂, що підтверджує різний механізм їх взаємодії з мембраною – включення спричиняє зростання розмірів, тоді як поверхнева адсорбція менше ніж включення, змінює розмір основної фракції і не виключає осідання частинок більше 2 мкм.

4.2. Спектроскопічні дослідження систем з модельними мембранами

Завдяки своїй здатності детектувати коливальні моди різних функціональних груп, ІЧ-спектроскопія (FTIR) дозволяє з високою точністю оцінювати зміни у структурі ліпідного шару, гідратації, впорядкованості ланцюгів, та наявності міжмолекулярних взаємодій. FTIR-аналіз використовувався для порівняння спектральних маркерів вихідних ліпосом та ліпосом, модифікованих наночастинок WS₂ та MoS₂ — як у разі їх внутрішнього включення, так і поверхневої адсорбції.

Спектри були зареєстровані з використанням приставки порушеного повного внутрішнього відбивання (ATR) на FTIR-спектрометрі Bruker Tensor 27 в діапазоні 3800–400 см⁻¹. Для вимірювання використовували 5–10 мкл ліпосомної суспензії, яку наносили на алмазну призму ATR-приставки. Кожен спектр реєструвався як усереднення 32 сканів з точністю по хвильовому числу до 0.01 см⁻¹ та поглинання — 0.1%. Обробку спектрів здійснювали за

допомогою програмного забезпечення OPUS 8.2 (Bruker) без нормалізації, для збереження розподілу інтенсивностей, щоб коректно оцінити імовірні ефекти підсилення.

Спектроскопія комбінаційного розсіювання є ефективним інструментом для дослідження структурних особливостей фосфоліпідних мембран, особливо чутливим до стану гідрофобного ядра — аліфатичних ланцюгів фосфоліпідів — та характеру їх взаємодії з зовнішніми агентами, зокрема наночастинками. Аналіз методом спектроскопії комбінаційного розсіювання використовувався для оцінки впливу наночастинок MoS_2 і WS_2 на ліпосомальні структури, як у випадку внутрішнього включення частинок, так і при їхній поверхневій адсорбції.

Спектри були зареєстровані у геометрії зворотного розсіювання при кімнатній температурі за допомогою А. Ніколенка при використанні потрібного монохроматора — спектрометра Horiba Jobin-Yvon T64000, оснащеного твердотільним лазером Spectra Physics EXLSR-532-150-CDRH з довжиною хвилі 532 нм. Параметри експерименту були оптимізовані для забезпечення максимальної чутливості до коливальних мод ліпосом при мінімізації флуоресцентного фону, зокрема шляхом регулювання потужності лазерного променя та експозиції.

4.2.1. Дослідження систем з модельними мембранами методом ІЧ-Фур'є спектроскопії

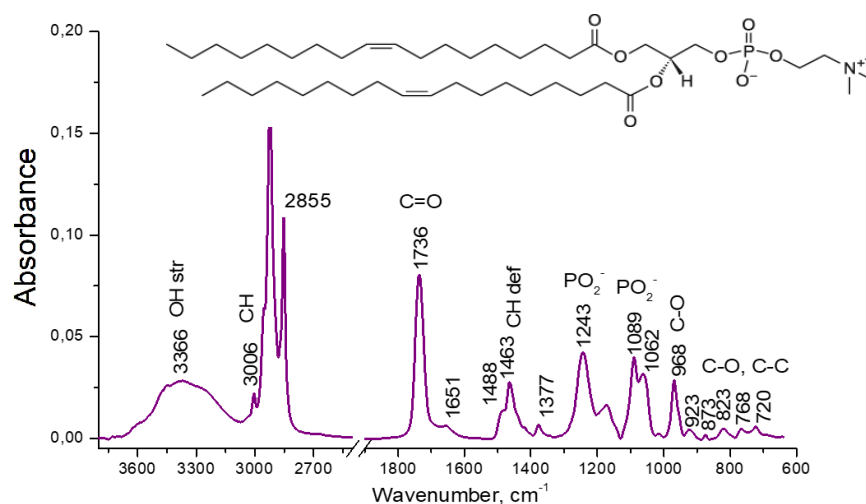


Рис. 33. Структурна формула та ІЧ спектр фосфоліпиду DOPC осадженого з розчину у хлороформі

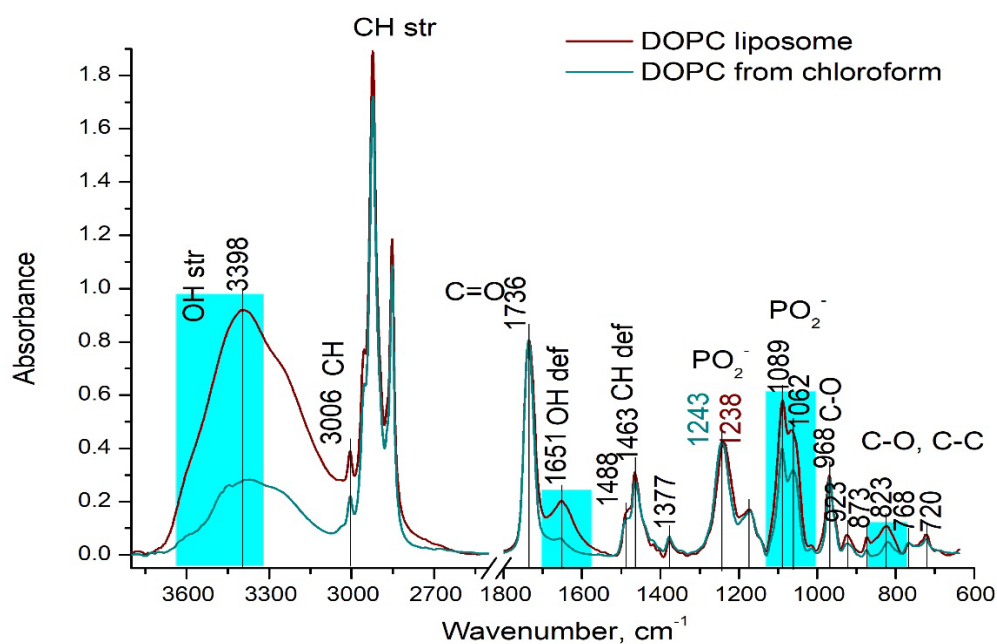


Рис.34. Спектри FTIR сформованих ліпосом (коричнева крива) та фосфоліпиду DOPC в хлороформі (зелена крива),

У спектрах вихідних ліпосом, рис.33, рис.34, приготованих із DOPC, чітко ідентифікувались наступні смуги:

- O–H ($3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$) – валентні коливання гідроксильних груп, що формують водневі зв'язки; інтенсивність цієї смуги значно зростає після формування ліпосом, у порівнянні з ліпідом у порошковій формі.

- C–H асиметричні та симетричні коливання груп --CH_2 (2923 та 2853 cm^{-1}) – показник впорядкованості гідрофобних хвостів; висока інтенсивність і вузькість цих смуг свідчать про щільне пакування ліпідів.

- C=O (1737 cm^{-1}) – коливання карбонільної групи в гліцерині; положення та форма смуги змінюються при утворенні водневих зв'язків.

- PO_2^- асиметричні та симетричні коливання (1241 і 1090 cm^{-1}) – характерні для фосфатної головки DOPC; інтенсивність цих смуг корелює з рівнем гідратації та взаємодією з іонами або наночастинками.

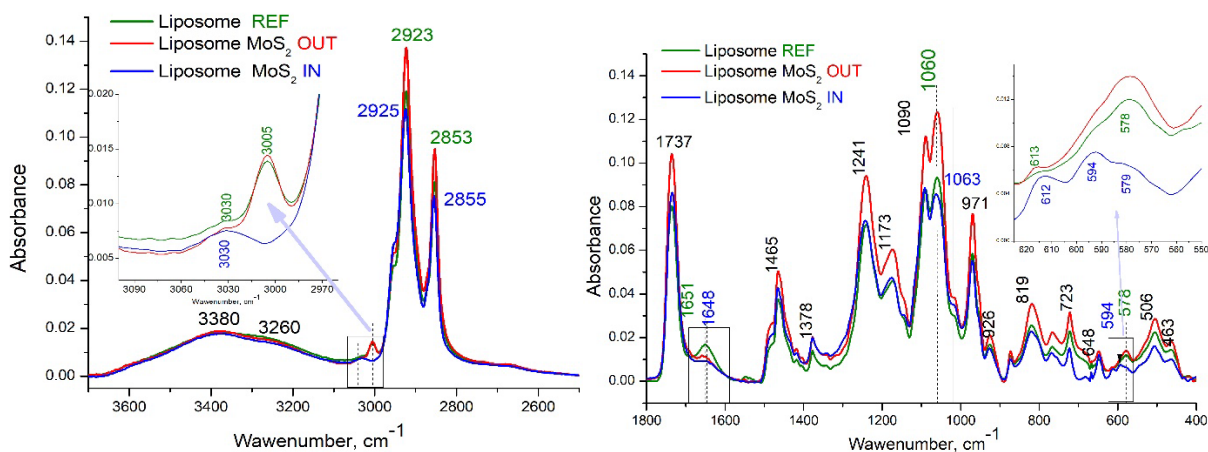


Рис.35. ATR-FTIR спектри ліпосом з наночастинками MoS_2 включеними всередині (синя крива) та доданими ззовні після формування ліпосом (червона крива)

На представлених спектрах, Рис.35, показано інфрачервоне поглинання модельних ліпосом (REF, зелена крива), модифікованих наночастинками MoS_2 , які були або включені всередину ліпосом під час формування (синя крива — наночастинки MoS_2 всередині позначення - IN), або адсорбовані на поверхні вже сформованих везикул (червона крива — наночастинки MoS_2 ззовні, позначення - OUT).

У високочастотній області ($2800\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$) спостерігаються характерні зміни в інтенсивності смуг:

- Смути CH_2 -коливань (2923 і 2853 cm^{-1}) у зразках OUT посилюються, що свідчить про взаємодію з зовнішнім шаром мембрани;
- Для зразків із включеннями фіксується зменшення інтенсивності в зоні O--H (3380 cm^{-1}) та зміщення/зникнення смуги 3005 cm^{-1} , та появу смуги близько 3300 cm^{-1} , що вказує на суттєві перебудови в групі $-\text{N}+(\text{CH}_3)$ можливо пов'язану з переносом заряду в ліпідній голівці при входженні наночастинки в ліпосому.

У середній та низькочастотній області ($400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$):

- Смути PO_2^- (1241 , 1090 cm^{-1}) та C=O (1737 cm^{-1}) демонструють значне підсилення у випадку поверхневого розміщення MoS_2 , що вказує на поверхневу адсорбцію наночастинок;
- У зразках із включеннями помітні зміни в ділянці 1648 cm^{-1} (деформація OH) та поява зсувів у області $600\text{--}500\text{ cm}^{-1}$, характерних для Mo--O або деформованої структури ліпиду; також в цій області можуть бути торсійні коливання групи $-\text{N}+(\text{CH}_3)_3$.
- Збільшення інтенсивності смуги 1060 cm^{-1} (C--O--C) у OUT також може вказувати на локальне підсилення поля (ефект SEIRA).

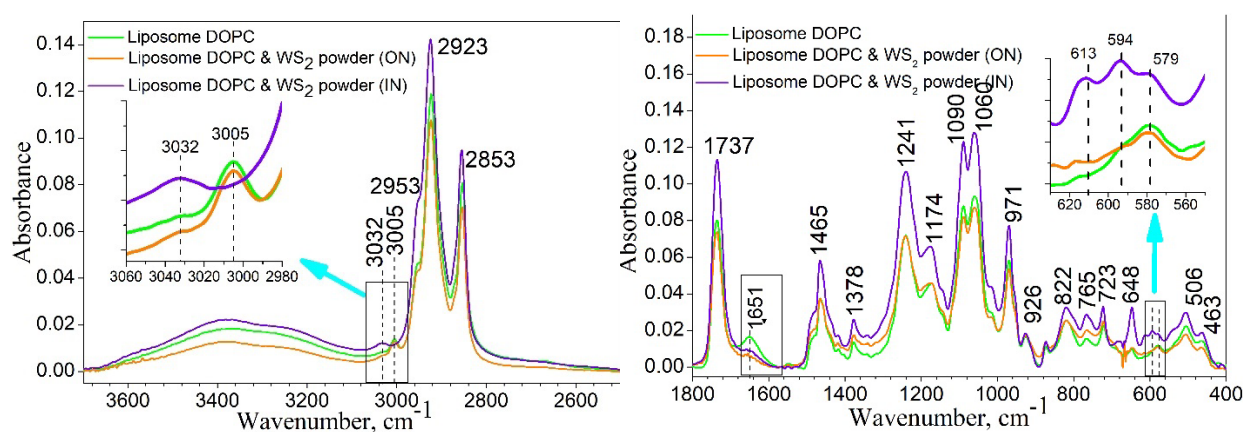


Рис.36. ATR-FTIR спектри ліпосом (контроль зелена крива), ліпосом з нанопорошком WS_2 на поверхні ліпосом (червона крива), ліпосом з нанопорошком WS_2 всередині ліпосом (синя крива).

На Рис.36 представлено ATR-FTIR спектри: зеленим – контрольні ліпосоми (DOPC без наночастинок), червоним – ліпосоми з WS₂ нанопорошком на поверхні (ON), синім – ліпосоми з включеним WS₂ нанопорошком (IN).

Високочастотна область (2800–3700 см⁻¹):

- Спостерігаються характерні смуги CH₂- валентних коливань при 2923 і 2853 см⁻¹, зі зростанням інтенсивності для зразка з WS₂ на поверхні, що вказує на взаємодію наночастинок з модельною мембраною.

- В області O–H коливань (3200–3400 см⁻¹) спостерігається зростання інтенсивності в обох модифікованих зразках, що пов'язано зі зміною гідратації фосфатних головок.

- В області 3000-3032 см⁻¹ (коливання -N⁺(CH₃)₃) з'являється нова смуга при 3032 см⁻¹, тоді як смуга 3005 см⁻¹ зникає, що може бути маркером включення частинок у бішар.

Середньочастотна та низькочастотна область (400–1800 см⁻¹):

- Посилення смуг PO₂⁻ (1241, 1090 см⁻¹) та C=O (1737 см⁻¹) особливо виражене в зразках із WS₂ нанопорошком на поверхні, що вказує на поверхневу взаємодію наночастинок із полярними групами.

- У зразку із наночастинами WS₂ всередині спостерігаються зміщення та послаблення смуги при 1648 см⁻¹, пов'язаної з деформацією груп O–H або C=C.

- У низькочастотній області (600–500 см⁻¹) для зразку із WS₂ нанопорошком всередині з'являється зміщення смуги з 579 до 594 см⁻¹, що може бути пов'язано з взаємодією WS₂ з головками ліпідів або зміною локальної симетрії.

У випадку додавання WS₂ або MoS₂ виявлено специфічні спектральні зміни, залежно від типу включення:

Для структур (внутрішнє включення наночастинок) характерне:

зниження інтенсивності в зоні O–H (3380 cm^{-1}) та PO_2^- (1241 cm^{-1}), що вказує на порушення водневих зв'язків та можливо — зменшення гідратації головок фосфоліпідів;

зміщення смуги C–H (2923 cm^{-1}) на вищі частоти (до 2925 cm^{-1}), що свідчить про підвищення флюїдності мембрани;

поява або підсилення смуги 3032 cm^{-1} при одночасному зникненні смуги 3005 cm^{-1} , які пов'язані з коливаннями C=C–H або групи $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, можливо по причині перерозподілу заряду в голівці ліпиду.

Для систем із наночастинками на поверхні було виявлено:

загальне посилення інтенсивності смуг до 30–40%, особливо в області PO_2^- і CH_2 , що інтерпретується як прояв SEIRA-ефекту

інтенсивність смуги C=O при 1737 cm^{-1} зростала до 45%, що свідчить про адсорбцію частинок у зоні головок ліпідів або на межі водно-ліпідного інтерфейсу;

водневе зв'язування проявлялось у вигляді посиленого контурного профілю в області 1062 cm^{-1} (C–C–O), а також у формі зсуву PO_2^- смуг на нижчі частоти (до 1238 cm^{-1}).

Додатково, при порівнянні ефектів від різних морфологічних форм наночастинок було встановлено, що:

WS_2 наночастинки спричиняли підсилення сигналів у FTIR спектрах, що може бути пов'язано з абсорбцією або входженням наночастинок у фосфоліпідний шар;

для MoS_2 спостерігали схожі ефекти, але зі слабшим загальним підсиленням та більш вираженим гасінням сигналів у разі включення частинок (IN), що збігалось з даними спектроскопії комбінаційного розсіювання, представленими нижче

Таким чином, ми бачимо що аналіз спектрів FTIR дозволив виявити тонкі структурні зміни, зумовлені наявністю наночастинок. Зміни інтенсивності та положення коливальних смуг виступають ефективними маркерами як для проникнення частинок всередину, так і для їх поверхневої

адсорбції. У поєднанні з квантово-хімічним моделюванням та мікроскопічними методами FTIR демонструє молекулярні взаємодії компонентів у гібридних наносистемах. Особливої уваги заслуговує спектральна область $3032\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, яка відповідає коливанням $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ та групи $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. У випадку внутрішнього включення частинок, інтенсивність смуги 3032 cm^{-1} зростала, тоді як 3005 cm^{-1} майже повністю зникала. Це явище може бути інтерпретоване як наслідок ізомеризації ланцюгів (*cis/trans*) або впливу частинок на розподіл заряду в зоні головки фосфоліпиду. Такі зміни співпадають із результатами FTIR, які показали потенційну взаємодію між атомами S або W наночастинок і карбонільними або фосфатними групами ліпиду.

4.2.2. Дослідження систем з модельними мембранами методами спектроскопії комбінаційного розсіювання та люмінесцентної спектроскопії

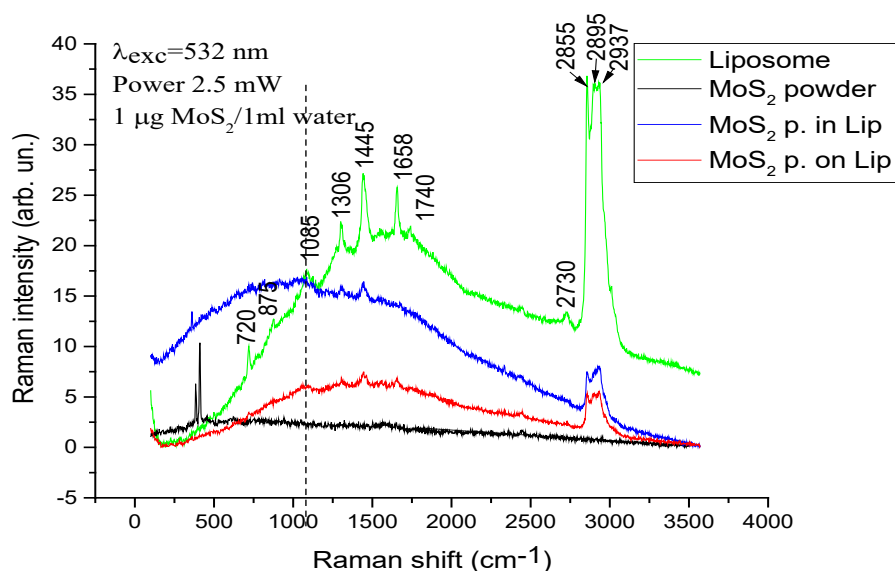


Рис. 36. Спектри комбінаційного розсіювання ліпосом без наночастинок (зелені криві) і з наночастинками всередині (сині криві) і на поверхні ліпосом (червоні криві). Чорним кольором показані спектри наночастинок.

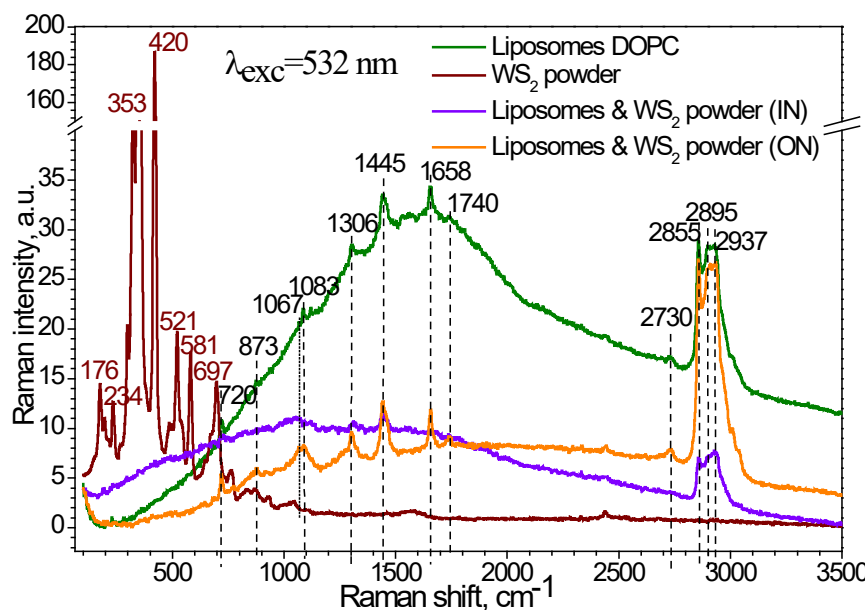


Рис. 38. Спектри комбінаційного розсіювання контрольних ліпосом (зелені криві) і з наночастинами всередині (сині та фіолетові криві) і на поверхні ліпосом (червоні та помаранчеві криві). Спектри наночастинок показані коричневим кольором.

У контрольних зразках (liposomes DOPC), зареєстрованих без наночастинок, Рис.37, Рис.38, спостерігалися характерні коливальні смуги, що відповідають функціональним групам ліпиду DOPC. Серед них можна виділити інтенсивні піки в області:

- 720 cm^{-1} — симетричне коливання CN (головка фосфатидилхоліну),
- 873 та 1067 cm^{-1} — коливання гліцеринового залишку та C—C молекулярних груп ,
- 1306 cm^{-1} — деформаційні коливання CH_2 у вуглеводневому ланцюзі,
- 1445 cm^{-1} — деформаційні коливання CH_2 (показник впорядкованості ланцюгів),
- 1658 cm^{-1} — валентні коливання молекулярних груп C=C (cis-ізомери),
- 1740 cm^{-1} — коливання карбонільної групи C=O.

У присутності наночастинок MoS_2 або WS_2 , введених у ліпосомальні системи, спостерігалися суттєві зміни у спектрах, залежно від локалізації

частинок. Найбільш вираженим ефектом було гасіння люмінесценції у випадку, коли наночастинки включались у структуру ліпосом. Це свідчить про зміну локального середовища, екранування або розсіювання збуджувального випромінювання внаслідок присутності неорганічного компонента.

У спектрах ліпосом, які містили WS_2 або MoS_2 всередині везикул, спостерігалось помітне зниження інтенсивності більшості характерних ліпідних смуг — зокрема 720, 1067, 1306 і 1445 cm^{-1} , — що є ознакою зменшення впорядкованості мембрани та зміни її внутрішньої структури. В окремих випадках вказані смуги зникали майже повністю, що свідчить про суттєві зміни у взаємодіях фосфоліпідних ланцюгів із наночастинками. Ці зміни корелюють із результатами FTIR, зокрема в частині перерозподілу водневих зв'язків і зміни інтенсивності смуг PO_2^- та CH .

Для систем ліпосом з адсорбованими зовні наночастинками, спостерігалось збереження більшості коливальних смуг.

Щодо самих наночастинок WS_2 , то їхні характеристичні спектральні маркери наступні :

$$E'_{2g} (\sim 353 \text{ cm}^{-1}) \text{ і } A_{1g} (\sim 422 \text{ cm}^{-1})$$

Ці сигнали не виявлялись у спектрах ліпосом із частинками, що вказує на низьку концентрацію наноматеріалу в точці вимірювання або його ефективне маскування ліпосомною матрицею.

Таким чином, спектроскопія комбінаційного розсіювання у поєднанні з ІЧ-аналізом надала комплексне уявлення про взаємодію 2D-наночастинок із ліпосомами. Гасіння флуоресценції, зникнення або зміна інтенсивності певних коливальних смуг, а також ефекти зсувів у спектрах є ефективними індикаторами проникнення наночастинок всередину ліпосоми, зміни впорядкованості ланцюгів, а також специфіки адсорбції на поверхні.

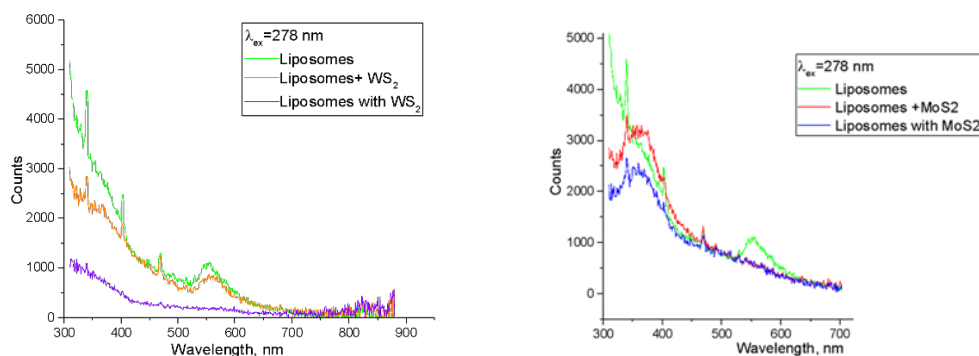


Рис.39. Спектри люмінесценції ліпосом з 2D наночастинками MoS₂ та WS₂

Ліпосоми без включень (Рис.39) демонструють інтенсивну флуоресценцію з вираженим максимумом при ~555 нм. Цей спектральний максимум пов'язаний із явищем так званої кластеролюмінесценції, що виникає внаслідок утворення кластерів ліпосом, в яких формується специфічне середовище для електронно-збуджених станів. Після взаємодії з наночастинками MoS₂ спостерігається повне гасіння сигналу на 555 нм. Одночасно у спектрах виникає нова зона випромінювання в діапазоні 300–400 нм із максимумом близько 360 нм. Цей ефект інтерпретується як наслідок формування взаємодій типу «ліпосома–наночастинка» та появи додаткових каналів рекомбінації електрон-діркових пар. Локальні електронні стани, індуковані MoS₂, призводять до зміщення енергій переходів і реалізації нових випромінювальних процесів, що відповідають короткохвильовому діапазону. Внутрішнє вбудовування частинок MoS₂ у ліпідний бішар значно посилює гасіння, що свідчить про виражене порушення структурної цілісності та електронної організації мембрани.

У випадку взаємодії з WS₂ спостерігається інша картина: люмінесценція ліпосом поблизу 555 нм зберігається, хоча й частково пригнічується, але не зникає повністю. При цьому короткохвильова смуга у діапазоні 300–400 нм виражена набагато слабше, ніж для MoS₂, а в деяких випадках майже непомітна. Це свідчить про те, що WS₂ має менш руйнівний вплив на

електронно-енергетичні стани ліпідного бішару та утворює більш біосумісні взаємодії з мембраною.

4.3. Мікроскопічні дослідження морфології та взаємодій в модельних системах

Методом оптичної мікроскопії у режимі bright field було застосовано для оцінки морфологічних характеристик як вихідних, без додавання наноструктур, так і модифікованих ліпосом, що містять наночастинки WS₂ або MoS₂.

Зображення оптичної мікроскопії реєстрували за допомогою інвертованого мікроскопа Euromex Oxion Inverso OX.2453-PLPHF зі збільшенням $\times 400$, у світлому полі (brightfield). Для підготовки зразків на скельце наносили краплю суспензії ліпосом (~ 10 мкл), покривали покривним склом, і негайно спостерігали під мікроскопом, щоб уникнути випаровування розчинника та коалесценції везикул. Спостереження проводили за кімнатної температури без фарбування, що дозволяло зберегти природну морфологію везикул. Паралельно проводився контроль стану ліпосом у динаміці — зокрема, безпосередньо після ультразвукової обробки або додавання наночастинок.

Скануюча електронна мікроскопія є важливим методом для дослідження морфології модельних ліпосом, особливо з огляду на потребу у високій просторовій роздільній здатності для аналізу нано- та мікроструктур.

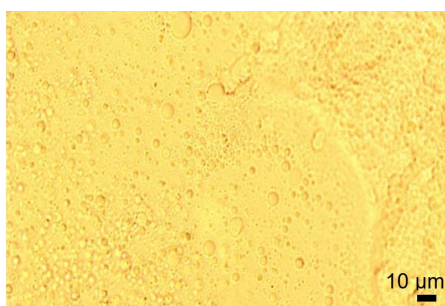
Вимірювання методом СЕМ, дозволили отримати прямі зображення як вихідних ліпосом, так і ліпосом, модифікованих наночастинами MoS₂ та WS₂, що значно поглибило розуміння просторової локалізації наночастинок, їх морфологічного впливу на мембрану, а також характеру взаємодії (зовнішнє адсорбція чи внутрішнє включення).

В ході дослідження використовувався скануючий електронний мікроскоп TESCAN MIRA LMU, обладнаний детектором Oxford Instruments X-Max для

енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії (EDS), а також детекторами вторинних електронів (SE) та зворотно відбитих електронів (BSE). Зйомка проводилась при прискорюючій напрузі 10 кВ із використанням збільшень у діапазоні $\times 1000$ – $\times 30000$, що забезпечувало якісну деталізацію поверхні та внутрішніх неоднорідностей.

4.3.1. Дослідження модельних ліпосом методом оптичної мікроскопії

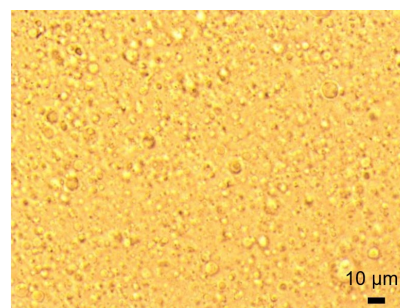
Оптична мікроскопія є однією з базових методик візуалізації біомембранних структур, що дозволяє здійснювати первинну оцінку розмірів, морфології, агрегаційного стану та динамічних змін модельних ліпосом у водному середовищі. Хоча роздільна здатність оптичного мікроскопа лімітується дифракційним обмеженням (~ 200 нм), цей метод залишається ефективним для спостереження середніх та великих ліпосом, (Рис.40,41) а також для контролю процесу їх формування в реальному часі.



Ліпосоми без включень



Ліпосоми з наночастинками
 MoS_2 (всередині)



Ліпосоми з наночастинками
 MoS_2 (ззовні)

Рис.40. Оптична мікроскопія зразків з наночастинками MoS_2

У зразках, що містили лише DOPC-ліпосоми без домішок (контроль), було виявлено сферичні структури із чіткими контурами, діаметром від 0,1 до 4 мкм, причому найбільш поширені були везикули діаметром близько 1 мкм. Переважна більшість ліпосом мали моно-дисперсний характер із чіткими межами, що відповідало стабільному уніламелярному стану. Морфологічно, ліпосоми виглядали як світлі округлі об'єкти на сірому фоні, часто з невеликою неоднорідністю у внутрішній частині, що могло свідчити про мультиламелярність або внутрішню структуру (наприклад, залишки води або агрегація).

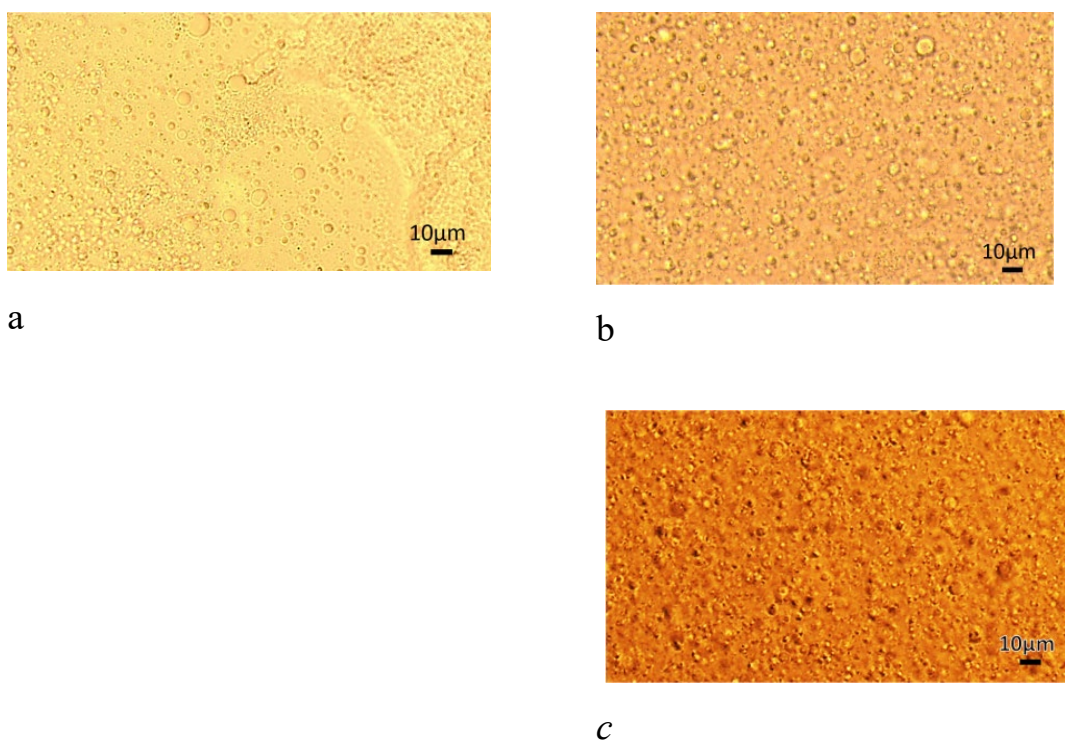


Рис. 41. Оптичні зображення ліпосом без наночастинок (а), ліпосом з нанопорошком WS₂ на поверхні ліпосом (b) і ліпосом з нанопорошком WS₂ всередині ліпосом (с).

Після додавання наночастинок WS₂ або MoS₂ фіксували значні зміни в розподілі розмірів та морфології ліпосом. У зразках, де наночастинки додавали до вже сформованих ліпосом, візуально спостерігалось збільшення середнього розміру везикул: частіше зустрічалися ліпосоми діаметром 2–6 мкм, а деякі

агреговані структури досягали 10–12 мкм. Це свідчить про потенційне злиття мембран або адсорбцію частинок на зовнішній поверхні, що викликає зміну тиску на бішар і його розтягування.

У випадку, коли наночастинки додавали до ліпідів до формування везикул, у полі зору фіксувались як малі (менше 500 нм), так і гігантські (до 10 мкм) структури. Зразки мали більш неоднорідний вигляд, спостерігались часті виступи — морфологічно виражені випинання мембрани, що можуть свідчити про включення частинок у внутрішній об'єм везикули або асиметрію тиску на внутрішній і зовнішній поверхні бішару. Часто можна було бачити структури з більш щільною внутрішньою грануляцією, які могли відповідати мультиламелярним або агломерованим станам.

Незважаючи на обмеження у роздільній здатності, оптична мікроскопія виявилась корисною для підтвердження фактів формування ліпосом, оцінки їхньої стабільності, флуктуацій і агрегації після введення наночастинок. Вона дозволила оперативно ідентифікувати зразки, які потенційно містили внутрішні включення або поверхневу адсорбцію частинок, що надалі підтверджувалося методами скануючої електронної мікроскопії та спектроскопії.

Таким чином, оптична мікроскопія слугувала не лише як базовий інструмент первинної верифікації, але й як метод контролю морфологічної цілісності ліпосом у різних умовах синтезу і взаємодії з наноструктурами. Це особливо важливо при підготовці зразків до складніших спектроскопічних та електронно-мікроскопічних аналізів.

4.3.2. Дослідження модельних ліпосом методом скануючої електронної мікроскопії

Скануюча електронна мікроскопія біологічних зразків, органічних і непровідних структур, та зокрема ліпосом, потребує складної багатоступінчастої пробопідготовки. В даному дослідженні, зразки ліпосом

готувалися шляхом нанесення 10–20 мкл суспензії на провідну кремнієву підкладку з попередньо очищеною поверхнею. Осадження здійснювалося в ламінарній шафі при температурі $\sim 18^{\circ}\text{C}$ з контролем випаровування, що дозволяло мінімізувати ризик колапсу структури везикул під час сушіння. Після висушування зразки поміщали у вакуумну камеру, де здійснювали осадження шару золота товщиною ~ 20 нм за допомогою методу магнетронного розпилення. Це було необхідно для запобігання накопиченню заряду на діелектричній поверхні ліпосом і забезпечення висококонтрастного зображення.

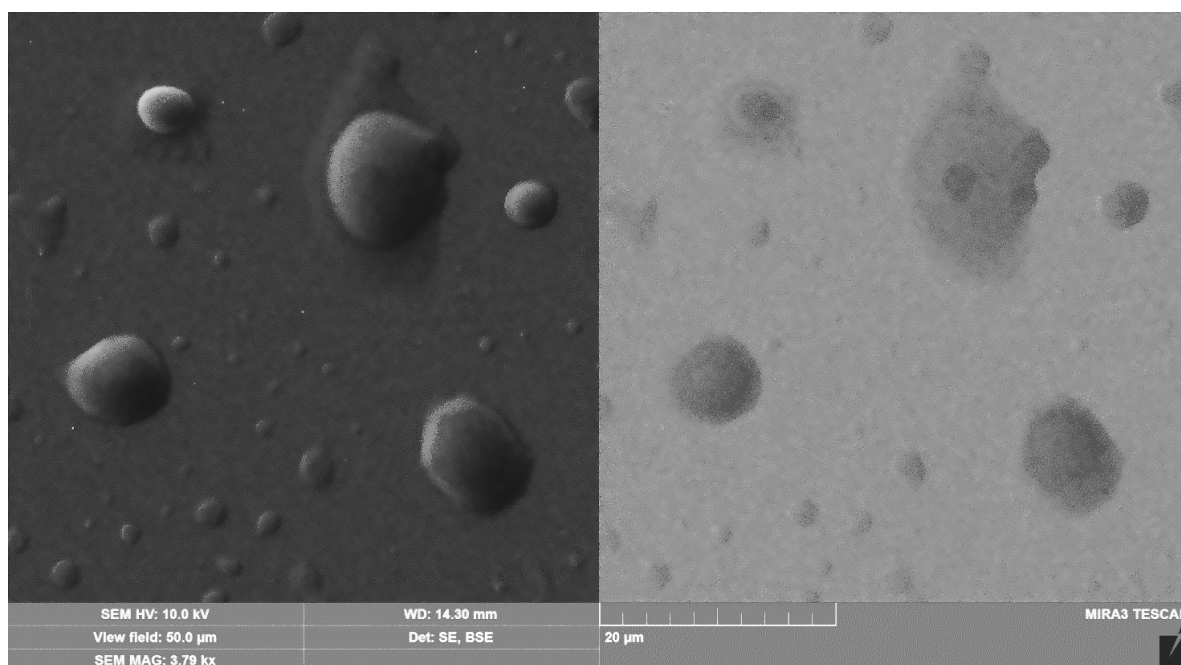


Рис 42. СЕМ зображення ліпосом без наночастинок в SE (a) і BSE (b) режимах, поле зору 50 мкм

На Рис.42 представлені модельні ліпосоми, виготовлені на основі фосфоліпиду DOPC без включення наночастинок. Зйомку виконано при прискорюючій напрузі 10,0 кВ, відстані до зразка 14,30 мм та збільшенні $\times 3790$, із застосуванням двох режимів детектування: вторинних електронів (SE, ліва частина зображення) та зворотно відбитих електронів (BSE, права частина).

У режимі SE ліпосоми відображаються як сферичні або злегка сплюснуті структури із гладкою поверхнею, високим контрастом країв та чіткими тіньовими переходами. Більші ліпосоми мають розміри від 1 до 5 мкм, а дрібніші везикули — менше 500 нм — також добре фіксуються. Спостерігаються одиничні ізольовані об'єкти, а також групи агрегованих ліпосом, можливо, внаслідок часткового злипання під час осадження та сушіння на підкладці.

У режимі BSE зображення має загалом нижчу контрастність, що пов'язано з тим, що всі елементи системи (C, H, O, P) мають низький атомний номер і не створюють значного зворотного розсіювання. Ліпосоми у BSE-режимі виглядають як світлі тіні на сірому фоні, без чітко виражених яскравих ділянок, що характерно для зразків без важких елементів. Зображення підтверджує відсутність включень з високим атомним номером, що також виступає контрольним маркером чистоти зразка, у якому відсутні наночастинки типу WS_2 або MoS_2 .

Контури ліпосом у BSE режимі мають меншу чіткість, але дозволяють оцінити внутрішню структуру везикул, зокрема, у деяких випадках видно неоднорідність щільності або потовщення країв, що може свідчити про мультиламелярність або нерівномірну товщину мембран. Особливо великі везикули мають помітне затемнення центру, що може бути пов'язано з товщиною шару або втратою пружної напруги після висушування.

Таким чином було проаналізовано дані об'єкти, як еталонний контрольний зразок для подальшого порівняння зі зразками, що містять наночастинки, що дасть змогу точно визначити зміни, викликані зовнішніми агентами.

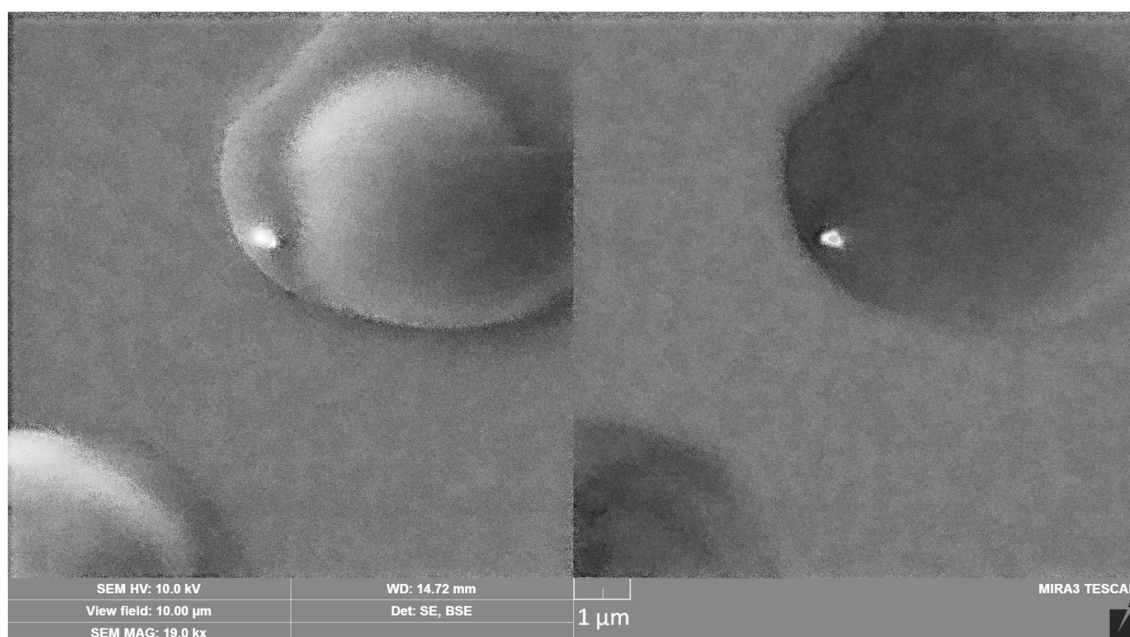


Рис.43. СЕМ-зображення ліпосом із 2D наночастинками WS_2 на поверхні ліпосом в режимах SE та BSE, поле зору 10 мкм

На зображенні, Рис.43 отриманому з використанням детекторів SE та BSE при прискорювальній напрузі 10,0 кВ та збільшенні $\times 19\,000$, зображено модельні ліпосоми, які містять наночастинки WS_2 як всередині, так і на зовнішній поверхні везикул.

У режимі BSE чітко візуалізуються яскраві зони на периферії ліпосом, що відповідають розміщенню важких атомів вольфраму (W), з атомним номером $Z = 74$. Завдяки високій здатності до розсіювання зворотних електронів, області, де локалізовані наночастинки WS_2 , мають підвищену контрастність у порівнянні з навколишньою органічною ліпідною матрицею.

На представленому зображенні видно два ліпосомальних об'єкти сферичної форми, з чітко вираженим опуклим утворенням або виступів на їхній поверхні. У зоні контакту цих виступів з фоновою поверхнею (правий нижній край кожної ліпосоми) спостерігається локальне посилення сигналу BSE, що однозначно вказує на присутність включеної або адсорбованої WS_2 наночастинки. Така морфологічна особливість може бути наслідком проникнення частинки в бішар ліпосоми з частковим зануренням, або її

прикріплення до зовнішньої поверхні мембрани з наступним деформуванням оболонки .

Додатково спостерігається відмінність у контрасті SE зображення, яка підсилює візуалізацію тонких поверхневих деталей — мембранних контурів, виступів, зміщень оболонки. Враховуючи особливості SE/BSE-контрасту, можна стверджувати, що частинки WS_2 взаємодіють із фосфоліпідним бішаром, утворюючи місцеві деформації мембрани та/або включення.

Таким чином, сканування підтверджує наявність WS_2 наночастинок як на поверхні, так і всередині ліпосом, причому завдяки використанню режиму BSE вдається чітко диференціювати неорганічні компоненти (високий атомний номер) від органічної матриці (вуглець, кисень, фосфор тощо), що має вирішальне значення для аналізу складних біо-неорганічних наносистем. Це дозволяє також встановлювати морфологічні маркери локалізації частинок — наприклад, наявність локальних виступів або підвищеної електронної щільності в зоні мембрани.

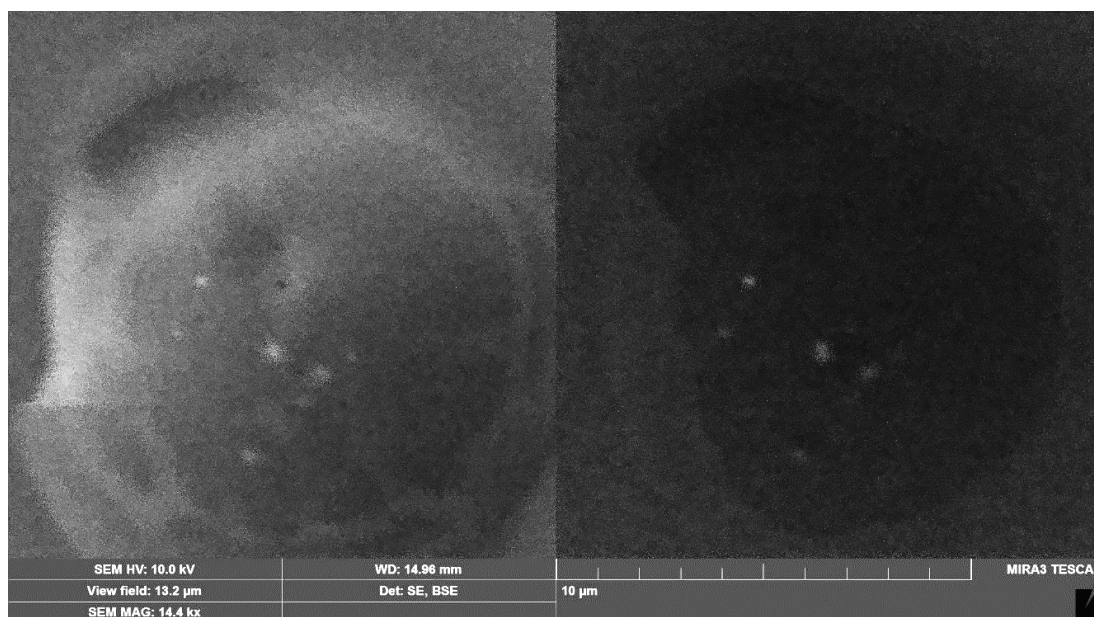


Рис. 44. СЕМ-зображення ліпосом із наночастинками WS_2 , включеними всередину ліпосоми, отримані в режимах SE та BSE . Поле зору – 13,2 мкм, збільшення – $\times 14,4k$.

На зображенні Рис.44 представлено модельні ліпосоми, модифіковані шляхом включення наночастинок WS_2 під час формування везикул. Зйомка виконана за допомогою комбінованого використання детекторів вторинних SE та зворотно відбитих електронів BSE при прискорюючій напрузі 10,0 кВ. Зразки були нанесені на кремнієву підкладку та висушені перед скануванням, що сприяло осіданню надлишкових наночастинок з суспензії на поверхню.

У режимі SE (ліва частина зображення) чітко візуалізується велика сферична ліпосома, діаметром близько 10 мкм. Особливу увагу привертають морфологічні виступи на поверхні везикули, що є ознакою локальної деформації мембрани. У центральній частині ліпосоми видно неоднорідні світлі ділянки, що можуть відповідати включеним внутрішньо наночастинок WS_2 або зонам з підвищеною електронною густиною. Форма ліпосоми неідеально сферична – спостерігаються незначні сплюснення та асиметрія, що вказує на можливу зміну внутрішнього тиску або вплив наноструктур на механіку бішару.

У режимі BSE (права частина зображення) на тому ж об'єкті фіксується локальне посилення контрасту у вигляді світлих плям, зосереджених у внутрішній частині ліпосоми. Ці світлі ділянки є характерною ознакою присутності важких атомів вольфраму ($Z = 74$) в структурі WS_2 . Завдяки високому коефіцієнту зворотного розсіювання електронів для вольфраму, такі наночастинок чітко контрастують на фоні органічної матриці, що складається переважно з вуглецю, водню, кисню та фосфору.

Наявність кількох точкових джерел сигналу в межах однієї ліпосоми вказує на множинне включення наночастинок WS_2 у її внутрішній простір. Спостережувані виступи у SE-режимі корелюють із локалізацією яскравих ділянок у BSE-зображенні, що дозволяє інтерпретувати їх як місця розміщення частинок під бішаром або частково включених у нього.

Ці морфологічні особливості – виступи, асиметрія, зміни контурів – свідчать про вплив внутрішнього включення наночастинок WS_2 на загальну архітектуру ліпосоми. У порівнянні зі зразками, де WS_2 адсорбовані на

поверхні мембрани, тут деформації є більш глибокими та просторово вираженими, що вказує на сильнішу взаємодію наночастинок з мембранною структурою зсередини.

Таким чином, зображення наочно підтверджують, що, WS_2 наночастинки справді локалізуються всередині ліпосом; їх присутність викликає місцеву деформацію мембрани та зміну морфології; режим BSE є інформативним для виявлення внутрішньої локалізації важких елементів, а SE дозволяє фіксувати супутні топографічні ефекти.

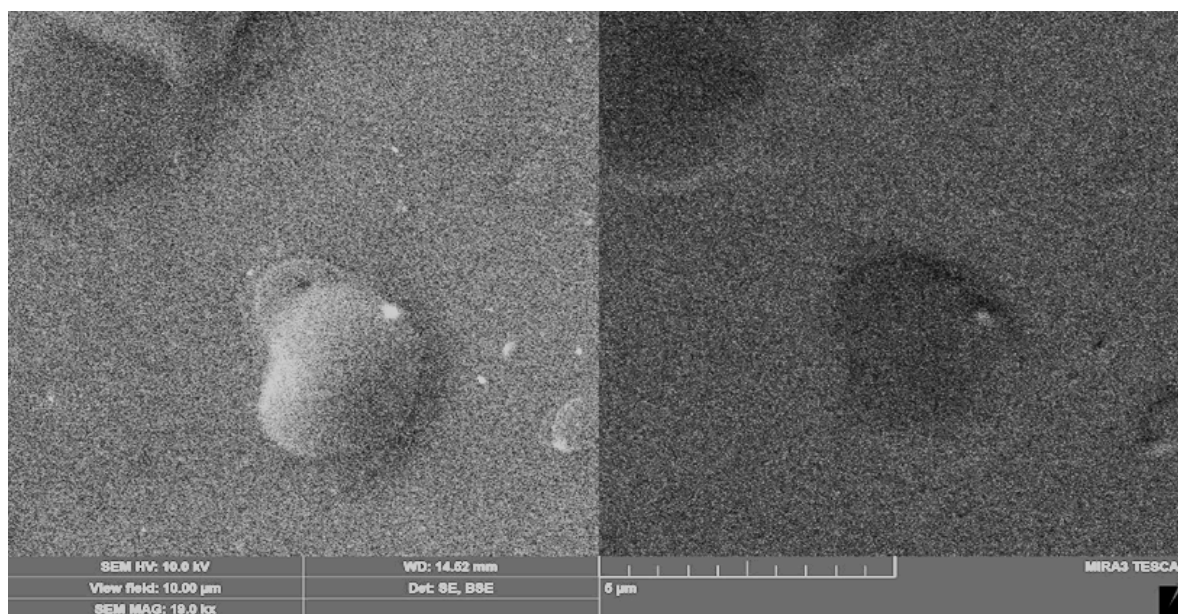


Рис. 45. СЕМ-зображення ліпосом із двовимірними наночастинками MoS_2 , розташованими на зовнішній поверхні ліпосом, у режимах SE та BSE ; поле зору – 10 мкм, збільшення $\times 19\,000$

На наведеному зображенні, Рис.45, представлено результати скануючої електронної мікроскопії модельних ліпосом, модифікованих наночастинками MoS_2 , що були адсорбовані на поверхню мембран після формування везикул. Зображення отримані за допомогою детекторів вторинних електронів (SE) та зворотно відбитих електронів (BSE) при прискорювальній напрузі 10,0 кВ.

У SE-режимі (ліва частина зображення) добре видно округлі структури ліпосом, зокрема одна велика сферична везикула діаметром приблизно 2–3 мкм із чітким рельєфом. У верхній частині ліпосом спостерігається невелике

світле підвищення — морфологічний виступ, яка, ймовірно, відповідає наночастинці MoS_2 , адсорбованій на зовнішній поверхні бішару. Цей виступ змінює локальний профіль поверхні везикули, що добре фіксується в SE-контрасті завдяки топографічній чутливості.

У BSE-режимі (права частина зображення) у тій же зоні видно локальну яскраву точку, що є типовим проявом присутності елемента з більш високим атомним номером — у цьому випадку молібдену ($Z = 42$). Контраст у зображенні створено завдяки зворотному розсіюванню електронів важкими атомами, що дозволяє чітко локалізувати MoS_2 на фоні органічної (вуглецевої) матриці.

Загальний вигляд ліпосом у BSE залишається дещо розмитим, однак наявність яскравої точки на краю мембрани підтверджує, що наночастинка MoS_2 знаходиться на поверхні везикули, а не всередині. Таке розміщення також не викликає значних деформацій або змін у формі самої ліпосоми, на відміну від зразків з внутрішнім включенням.

Таким чином, результати сканування демонструють, що: 2D-наночастинки MoS_2 ефективно адсорбуються на зовнішній поверхні мембрани ліпосом, утворюючи локальні виступи. Контраст у BSE-режимі дозволяє чітко диференціювати наночастинки MoS_2 від ліпідної матриці; відсутність внутрішніх яскравих включень підтверджує поверхневу локалізацію частинок без проникнення в ліпосому.

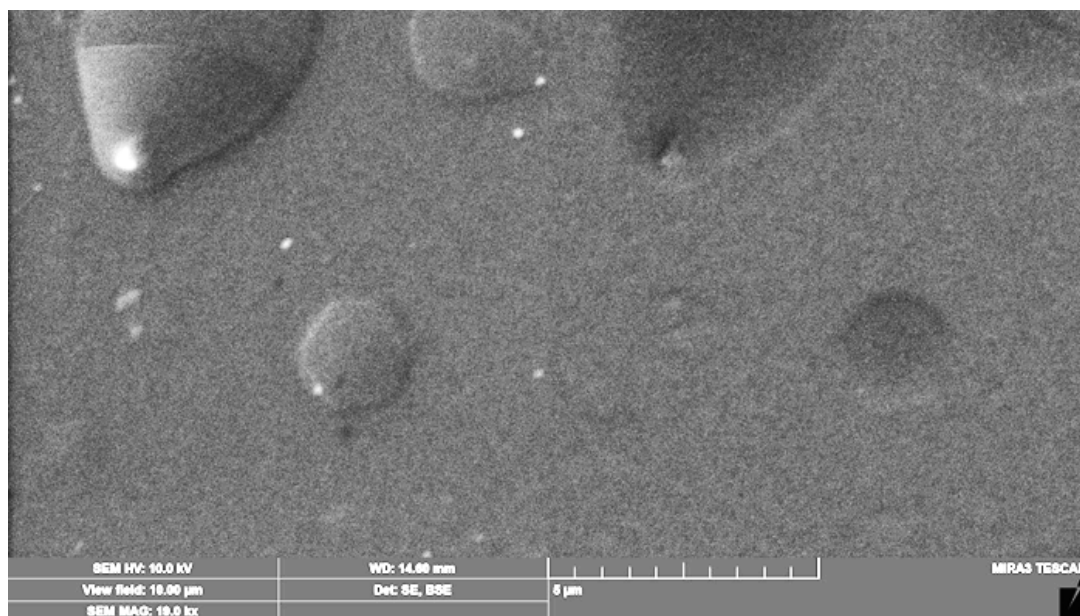


Рис. 46. СЕМ-зображення ліпосом із наночастинками MoS_2 , включеними всередину ліпосом, отримані у режимах SE (a) та BSE (b); поле зору – 10 мкм, збільшення $\times 19\,000$

На зображенні Рис.46 показано результат скануючої електронної мікроскопії ліпосом, модифікованих шляхом включення 2D-наночастинок MoS_2 під час процесу самозбірки. Аналіз виконано в умовах прискорювальної напруги 10,0 кВ з використанням SE- (вторинні електрони) та BSE- (зворотно відбиті електрони) режимів. Зображення було отримано за допомогою мікроскопа MIRA3 TESCAN при площі огляду 10 мкм.

У SE-режимі (ліва частина зображення) добре видно округлі везикули, розміром від 0.5 до 3 мкм. Окремі ліпосоми мають морфологічні особливості, характерні для внутрішньої деформації: спостерігаються локальні виступи, асиметрія об'єму та легке викривлення мембрани. Це може свідчити про присутність твердих включень у внутрішньому водному об'ємі, які впливають на механічний тиск зсередини.

У BSE-режимі (права частина зображення) фіксуються яскраві точкові ділянки, локалізовані внутрішньо по центру або ближче до країв ліпосом. Ці ділянки є характерною ознакою присутності важких атомів молібдену ($Z = 42$), які входять до складу наночастинок MoS_2 . Їх виявлення можливе завдяки

високій ефективності зворотного розсіювання електронів при взаємодії з важкими елементами, що забезпечує чітке контрастування на фоні органічного середовища.

Особливістю цього зображення є те, що наночастинки MoS_2 не зосереджені на поверхні, як у випадку зовнішньої адсорбції, а розташовані всередині мембранної структури, що підтверджується морфологічними змінами у формі везикул; відсутністю яскравих сигналів на зовнішній межі; наявністю яскравих BSE-центрів в області внутрішньої частини ліпосом.

Таким чином, представлений знімок є прямим морфологічним підтвердженням успішного включення наночастинок MoS_2 у внутрішній об'єм ліпосом. Отримані результати узгоджуються з даними спектроскопії, зокрема гасінням сигналів у комбінаційного розсіювання та зміною спектрального профілю у FTIR, що також є ознаками глибокої взаємодії наночастинок із внутрішньою структурою мембрани.

Зображення демонструє, що включені 2D-наночастинки MoS_2 викликають локальні структурні перебудови мембрани й можуть змінювати механічні та функціональні властивості ліпосомальної системи

Важливо відзначити, що ліпосоми з наночастинами демонстрували підвищену стійкість до пошкодження електронним пучком у порівнянні зі зразками без наночастинок. Це, ймовірно, пов'язано з локальним підвищенням теплопровідності внаслідок включення WS_2/MoS_2 , що розсіюють енергію пучка. Також було зафіксовано більшу чутливість «чистих» ліпосом до умов вакуумного висушування — частіше спостерігалось сплюснення або колапс.

Застосування скануючої електронної мікроскопії, дозволило детально охарактеризувати морфологію ліпосом, зміну їхньої геометрії внаслідок взаємодії з наночастинами, і локалізацію наночастинок. Метод забезпечив важливі докази впливу WS_2 та MoS_2 на структуру та стабільність мембран, зокрема через появу поверхневих аномалій та структурних виступів. Комбінування СЕМ з іншими методами (DLS, FTIR, комбінаційне розсіювання

, квантово-хімічні розрахунки) дозволяє забезпечити повноцінний аналіз гібридних нанобіосистем на основі ліпосом.

Дослідження зразків ліпосом із сфінгомієліну і холестеролу

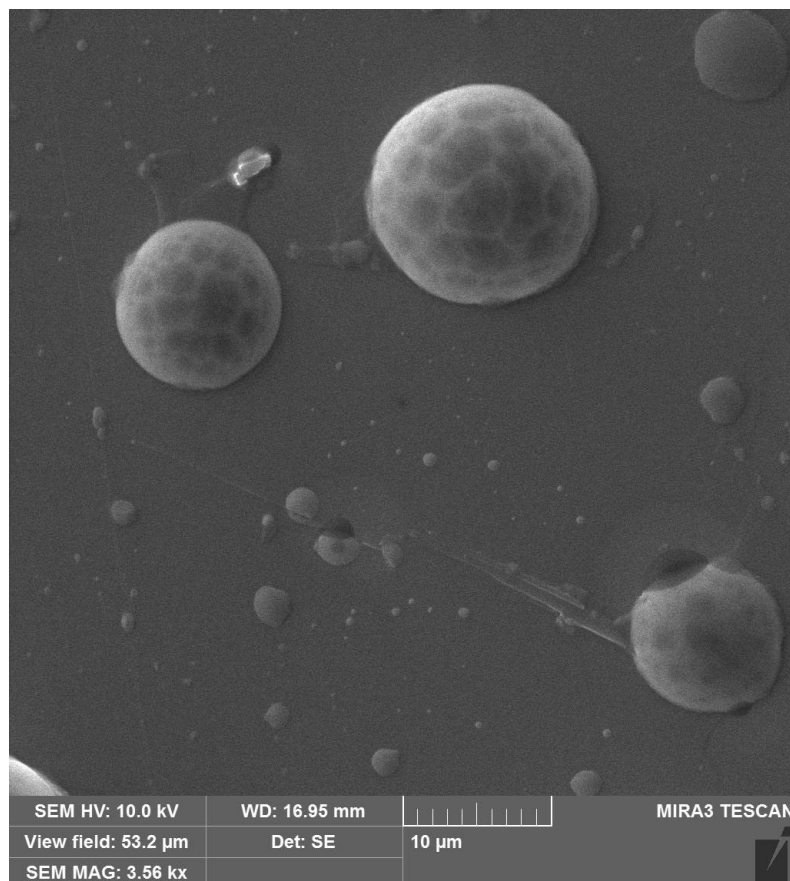


Рис.47. СЕМ-зображення ліпосом в режимі SE із сфінгомієліну і холестеролу

На представленому зображенні, Рис.47, отриманому при збільшенні 3.56 тис. разів, в режимі SE, спостерігається морфологія ліпосом на основі сфінгомієліну і холестеролу

Основні об'єкти мають сферичну форму, характерну для уніламелярних ліпосом. Діаметр найбільших візуалізованих структур становить приблизно 6–10 мкм, що відповідає великим уніламелярним або гігантським ліпосомам, ймовірно сформованим внаслідок агрегації або коалесценції дрібніших везикул після осадження та ліофілізації.

Поверхнева структура, у межах більшості ліпосом спостерігається помітна внутрішня неоднорідність контрасту, що може свідчити про фазову сепарацію усередині мембрани, наявність рідкоупорядкованих (Lo) і рідкокристалічних (Ld) доменів, характерних для мембран з холестерином, внутрішню багатошаровість. На декількох ділянках видно ниткоподібні з'єднання між ліпосомами, що можуть бути артефактами висушування або залишками частково зруйнованих везикул. У місцях контакту між везикулами помітна часткова деформація сферичної геометрії, що може бути наслідком капілярних сил при ліофілізації.

.Додавання холестеролу суттєво впливає на організацію ліпідного бішару, сприяючи утворенню рідкоупорядкованих доменів, що видно як морфологічна гетерогенність у СЕМ.

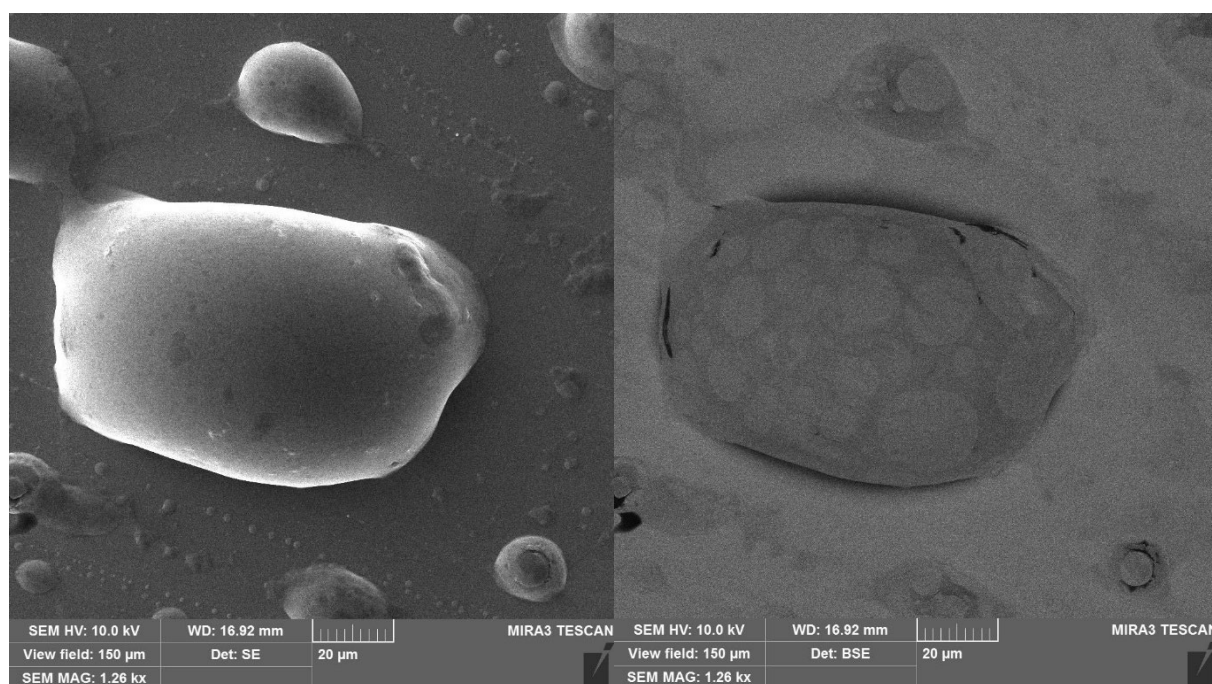


Рис.48. СЕМ-зображення ліпосом в режимі SE і BSE із сфінгомієліну і холестеролу

СЕМ зображення, Рис.48 демонструє характерну морфологію ліпосом, що містять сфінгомієлін і холестеролу з ознаками структурної організації, типової для систем із фазовою сепарацією, а також можливими наслідками дегідратації та осадження. Ці спостереження узгоджуються з припущенням

про утворення мікродоменів, аналогічних ліпідним рафтам, у штучно сформованих мембранних моделях.

Зображення в режимі вторинних електронів у межах поля зору чітко візуалізовано декілька десятків ліпосом діаметром від 0.5 до 80 мкм.

Центральна структура — гігантська ліпосома неправильної еліпсоїдної форми, що ймовірно виникла внаслідок злиття або коалесценції дрібніших везикул у процесі підготовки зразка. Поверхня центральної ліпосоми є гладкою і рівномірною, що характерно для зображень у SE-режимі, який чутливий до топографії поверхні. Наявність таких обрисів вказує на цілісну мембрану без очевидних механічних пошкоджень.

Вище та нижче центральної ліпосоми помітні дрібніші сферичні структури, можливо залишки мультиламелярних везикул.

Ниткоподібні утворення між ліпосомами можуть свідчити про залишкові мембранні з'єднання або структурні залишки при дегідратації.

Зображення в режимі назад розсіяних електронів. У цьому режимі найбільше акцентується контраст за атомним номером (Z-contrast) — більш щільні або хімічно насичені області дають сильніший відбитий сигнал.

Центральна ліпосома виявляє внутрішню гетерогенність сигналу: спостерігаються окремі зони підвищеної яскравості, що мають округлу форму й нерівномірно розташовані.

Ці округлі області з більш високим сигналом можуть інтерпретуватись як ліпідні домени з підвищеним вмістом холестерину та сфінголіпідів, тобто ліпідні рафти (liquid-ordered microdomains).

Порівняльний аналіз SE та BSE зображень

Ліпідні рафти, як ділянки з високою густиною холестерину й сфінголіпідів, утворюють рідкоупорядковані домени (Lo) в межах більш рідких ділянок мембрани (Ld), які на зображенні в BSE проявляються як контрастні, світлі плями. Гетерогенність внутрішньої структури великої ліпосоми свідчить про фазову сегрегацію — критично важливу властивість штучних мембран у біофізичних моделях.

Комбінований аналіз режимів SE і BSE дозволяє не лише оцінити морфологію ліпосом (форма, розмір, зв'язки), а й виявити функціонально важливі домени — ліпідні рафти — завдяки їхній хімічній та структурній гетерогенності. Подібна візуалізація є важливою для досліджень мембранних механізмів, зокрема у контексті впливу лікарських речовин або вірусних білків на мембранну впорядкованість.

У контрольних зразках (ліпосоми без наночастинок) у режимі SE фіксувалися сферичні об'єкти діаметром від 100 нм до 3–4 мкм, з чітко вираженою тривимірною формою. Зображення, отримані у режимі BSE, продемонстрували неоднорідності всередині ліпосом, які інтерпретувалися як залишки вологи або мультиламелярна структура. Поверхня таких ліпосом була гладкою, без виступів або зморщень, що свідчило про стабільність мембранної структури в процесі підготовки зразка.

4.4. Аналіз механізмів взаємодії

Адсорбція фосфоліпідів на бездефектних ділянках дисульфідів перехідних металів (WS_2 , MoS_2) є переважно нековалентною. Молекули ліпиду утримуються над площиною шару за рахунок Ван-дер-Ваальсової взаємодії та водневих зв'язків; ковалентне зв'язування є малоімовірним через велику відстань і відсутність реакційно-активних центрів. Натомість на краях і в дефектних зонах (насамперед за наявності вакансій сірки та поверхневого окислення) можливе утворення міцніших контактів за участі атомів кисню ліпиду, з формуванням зв'язків типу W–O (для WS_2) або O–Mo / N–Mo (для MoS_2) у приповерхневих ділянках з дефектами. Елементний аналіз підтверджує дефіцит сірки та наявність кисню у наночастинках WS_2 : O $\approx$ 2,5 мас.% та S $\approx$ 20,7 , що узгоджується з виникненням активних центрів на краях

і поверхні частинок і пояснює підвищену реакційну здатність щодо полярних груп ліпідів.

Також, у зразках із наночастинками інтенсивність ліній комбінаційного розсіювання має тенденцію до зменшення, разом із зменшенням інтенсивності люмінесценції — що також можна визначити, як індикатор наявності взаємодії між частинками та мембраною

Квантово-хімічне моделювання для контактних ділянок «WS₂—фрагмент DOPC» застосовано для аналізу початкового контакту за участі атома О у фрагменті ліпиду з подальшою перебудовою зв'язків на дефекті. Саме такі локальні контакти узгоджуються зі спостережуваним перерозподілом інтенсивностей у діапазонах 3005–3032 см⁻¹ та 580–620 см⁻¹ і зі змінами смуг, що належать до –N⁺(CH₃)₃ у головці фосфоліпиду. Перебудови у зоні ~3035 см⁻¹ спостерігалися для ліпосом з наночастинками WS₂; при цьому характер підсилення може різнитися залежно від того, чи частинки знаходяться всередині або на поверхні ліпосоми [3,4].

Окремо слід відзначити роль геометрії двовимірних шарів. Кривизна поверхні WS₂ і пов'язана з нею неоднорідність локальних електричних полів приводять до підсилення інтенсивності смуг поглинання ліпідної мембрани (ефект SEIRA) на рівні близько 30% —суттєвої величини для біологічних макромолекул.

4.5. Висновки до Розділу 4

1. Створено ліпосоми на основі DOPC з наночастинками MoS₂ та WS₂ на поверхні та всередині ліпосоми
2. Застосовано метод СЕМ для візуалізації ліпосом та ліпосом з наночастинками MoS₂ та WS₂. Зафіксовано наночастинки на/або в ліпосомі.
3. FTIR-спектроскопія встановила перебудову водневих зв'язків в фосфатних групах при внутрішній локалізації (ослаблення O–H і PO₂[–], поява смуг в області 3030–3032 см^{–1}, що відноситься до коливань -N⁺(CH₃)₃, тоді як при поверхневій адсорбції спостерігалось підсилення смуг C=O та PO₂[–] на 10–30 % внаслідок ефекту SEIRA.
4. Додавання наночастинок MoS₂ індукує гасіння кластеролюмінесценції ліпосом при 555 нм та появу нових смуг у діапазоні 300–400 нм, що відображає формування нових електрон-діркових станів; WS₂ зберігає люмінесценцію при 555 нм частково, демонструючи більш м'який поверхневий вплив.

РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНИХ ПЕРЕБУДОВ У МЕМБРАНАХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС

5.1. Клітини карциноми легені Льюїс та їх пробопідготовка

У рамках дослідження механізмів структурних перебудов у реальних мембранах, важливу роль відіграє вибір адекватної клітинної моделі, що здатна імітувати поведінку пухлинних клітин в умовах, наближених до *in vivo*. Для цього в даній роботі було використано клітини карциноми легені Льюїс (Lewis Lung Carcinoma, LLC), які широко застосовуються у дослідженнях, завдяки здатності до інтенсивного росту, формування метастазів, а також стабільності в культурі. Клітини LLC є типовою моделлю пухлин легеневої локалізації, придатною для вивчення процесів, пов'язаних із циркулюючими метастатичними пухлинними клітинами, які втратили здатність до прикріплення і набули метастатичних властивостей. Саме така здатність до перебування у суспензійному стані є ключовою при вивченні морфологічних і функціональних перебудов мембран за умов втрати адгезії, що часто спостерігається при ранніх стадіях метастазування.

Клітини були отримані з Національного банку клітинних ліній та штамів пухлин ІЕПОР НАН України та культивувались у середовищі RPMI-1640, збагаченому 10% фетальною сироваткою, глутаміном і антибіотиками, за стандартних умов інкубації при 37 °C і 5% CO₂. Для моделювання деадгезивного стану культуральні чашки попередньо оброблялись розчином полі(2-гідроксиетилметакрилату) (poly-HEMA), що утворює гідрофільну неадгезивну поверхню і тим самим запобігає прикріпленню клітин до субстрату. Така стратегія дозволила отримати культуру клітин, що зберігає округлу форму та перебуває в суспензії, що відповідає поведінці циркулюючих пухлинних клітин у кров'яному руслі. [199-205]

Після інкубації протягом 48 годин клітини збирались шляхом делікатного центрифугування, що мінімізувало механічні пошкодження та

агрегацію. Осад фіксувався сумішшю 4% параформальдегіду та 2,5% глутаральдегіду в фосфатному буфері (PBS), що забезпечувало стабілізацію структурних компонентів. Після трикратного промивання PBS і дворазового промивання дистильованою водою, зразки наносились на відшліфовані кремнієві підкладки для електронної мікроскопії і на скляні для оптичної мікроскопії.

5.2. Флуоресцентна мікроскопія клітин LLC

Для аналізу клітин карциноми легені Льюїс (LLC), що були культивовані в умовах деадгезивного росту, була застосована флуоресцентна мікроскопія, що дозволила отримати загальні уявлення про форму, розміри та стан клітин. Зображення були отримані на інвертованому мікроскопі Euromex Oxion Inverso (model OX.2453-PLPHF, Euromex Microscopen, The Netherlands).

За відсутності прикріплення до підложки, клітини зберігали кулясту форму, що характерно для циркулюючих метастатичних пухлинних клітин. При низькому та середньому збільшенні ($200\times$ – $400\times$) було виявлено як поодинокі клітини, так і невеликі агрегати, ймовірно утворені внаслідок залишкових міжклітинних взаємодій. Клітини в оптичному полі виглядали напівпрозорими, з чіткими межами, що давало змогу спостерігати характерні особливості в будови клітин, а також неоднорідність розподілу клітинних компонент при використанні відповідних фільтрів.

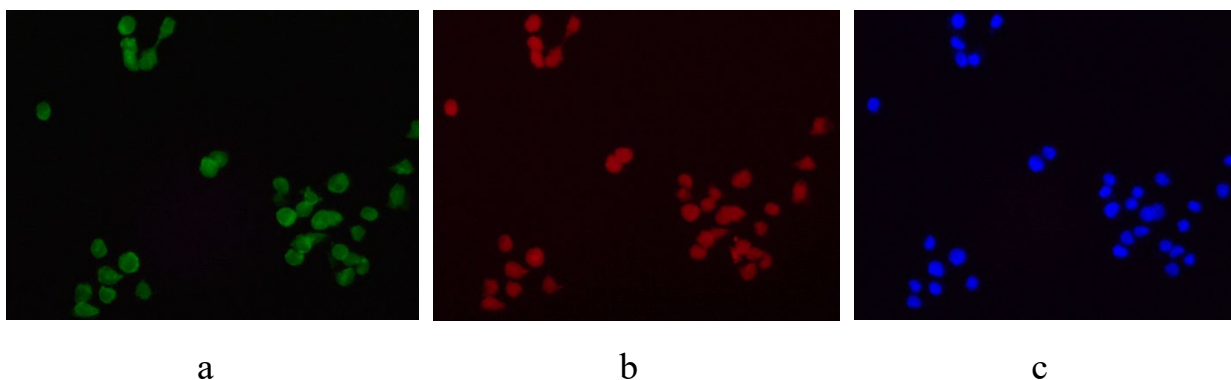


Рис.49. Мікроскопічні зображення клітин LLC. F-актин забарвлений Alexa Fluor 488-фалоїдином, клітинні ядра пофарбовані Hoechst 33342.2. Масштабна шкала - 20 мкм. Збудження – ультрафіолетова лампа з використанням стандартного набору флуоресцентних фільтрів.

Результати флуоресцентної мікроскопії Рис.49 показали, що в умовах деадгезивного росту відбуваються перебудови цитоскелету, пов'язані зі зниження механічної підтримки з боку підложки і адаптацію цитоскелету до умов деадгезивного росту. Ядра мали правильну овальну форму та займали значний об'єм клітин, що також є характерним для деадгезивного типу росту клітин. Барвник Hoechst 33342 дозволив виявити хроматинову структуру, яка виглядала щільно упакованою, з чітко окресленим ядром у центрі, що може вказувати на збережену функціональну активність [1].

5.3. Конфокальна мікроскопія клітин LLC

Поряд із класичною флуоресцентною мікроскопією використовувалась конфокальна мікроскопія, яка забезпечує оптичне секціювання зразка з можливістю тривимірної реконструкції клітини. В конфокальному режимі вдалось отримати зображення високої просторової роздільності, на яких чітко візуалізувались як актинові структури, так і ядерний контур. У порівнянні з традиційною флуоресценцією, конфокальна мікроскопія дозволила відокремити сигнали від різних глибин зразка, що було особливо важливо при вивченні об'ємних клітин у суспензії.

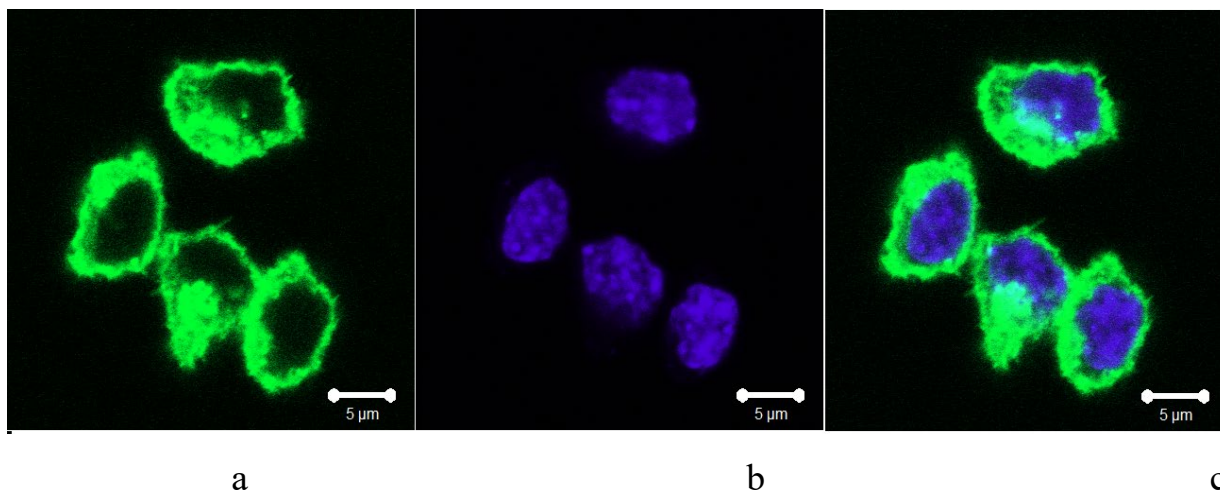


Рис. 50. Конфокальні зображення клітин LLC. F-актин забарвлений Alexa Fluor 488-фалоїдином, збудження лазером 488 нм (а), клітинні ядра пофарбовані Hoechst 33342.2, збудження лазером 405 нм (б). і с) зображення з обох каналів. Масштаб = 5 мкм

На Рис.50 представлено зображення клітин карциноми легені Льюїс (LLC), що перебувають у деадгезивному стані. Сигнал у зеленому каналі показує розподіл нитчастого F-актину у клітині, який був мічений флуоресцентним барвником Alexa Fluor 488-фалоїдином (рис. 50.а). Паралельно для контрастування ядер використовувався барвник Hoechst 33342 — специфічний до ДНК, що випромінює флуоресценцію в синьому діапазоні (рис. 65.б).

У клітинах LLC, що росли в деадгезивних умовах, комбіноване застосування забарвлення F-актину та ядер дозволило отримати повну картину внутрішньоклітинної організації, зафіксувавши як перерозподіл цитоскелетних структур, так і просторове положення ядра в умовах відсутності прикріплення до поверхні. У клітинах LLC, оброблених Alexa Fluor 488-фалоїдином, було виявлено значне зменшення діаметру та довжини F-актину, що відображає структурну адаптацію до умов деадгезивного росту.

Водночас слід зазначити, що підготовка зразків для конфокальної мікроскопії включає ряд інвазивних етапів, які потенційно можуть вплинути на нативний фізіологічний стан клітин. Зокрема, хімічна фіксація, фарбування флуорофорами та інтенсивне лазерне збудження можуть індукувати фотострес, або навіть апоптоз, що потребує обережності при інтерпретації отриманих результатів.

Для мінімізації інвазивності та покращення якості візуалізації, в цьому дослідженні також було випробувано можливість використання наночастинок як альтернативних контрастних агентів. Зокрема, застосовувалась водна суспензія –наночастинок –MoS₂ у концентрації 0,1 мг/мл. Ці наноструктури мають флуоресценцією та здатністю до взаємодії з клітинними структурами, що дозволяє використовувати їх як мітки у конфокальній мікроскопії без необхідності додаткового фарбування. Результати експерименту підтвердили, що MoS₂-наночастинок успішно проникають у клітини LLC, локалізуючись переважно в цитоплазмі та поблизу ядерної мембрани. Це свідчить про їх потенціал як контрастуючих засобів та носіїв терапевтичних препаратів.

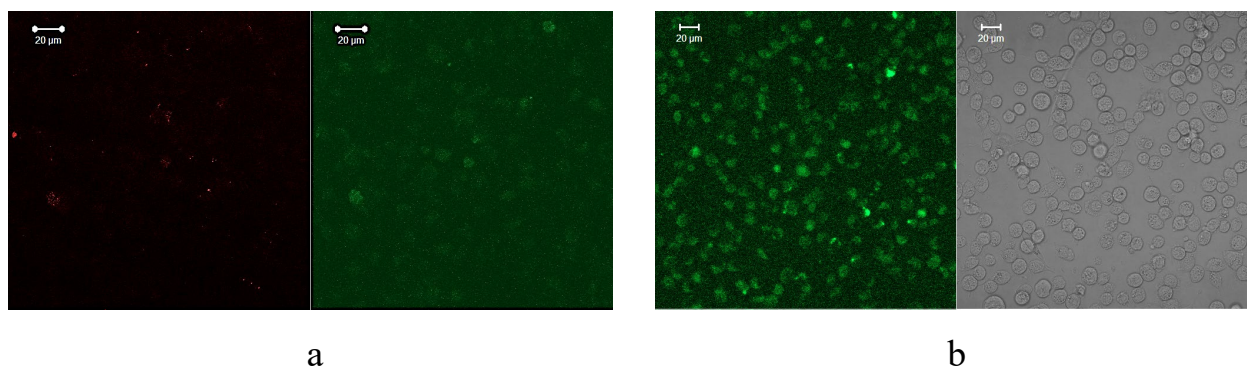


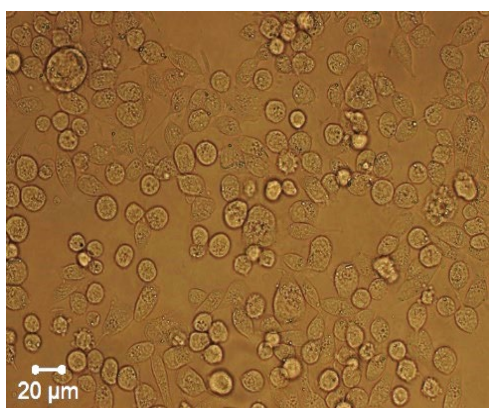
Рис.51. Конфокальні зображення клітин LLC: (а) контрольні, довжина хвилі збудження: 543 та 488 нм, б) клітин LLC з 2D наночастинками MoS₂ збудження 488 нм та у режимі пропускання. Масштаб = 20 мкм

На Рис.51 представлено зображення, отримані методом конфокальної мікроскопії, для двох експериментальних груп: контрольних клітин карциноми легені Льюїс (LLC) (рис. 51а), клітин, інкубованих з наночастинками дисульфиду молібдену (MoS₂) (рис. 51б),

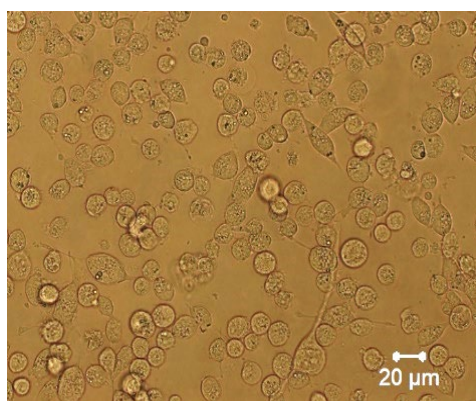
Для збудження флуоресценції в різних спектральних діапазонах було застосовано кілька лазерних джерел із налаштованими довжинами хвиль. Зокрема, для збудження червоної флуоресценції використовували лазер з довжиною хвилі 543 нм (T1), при потужності 60%. Для зеленого каналу застосовували лазер на 488 нм (T2, 50% потужності), який, ефективно збуджує автофлуоресценцію деяких наноструктур

Для розділення флуоресцентних сигналів у системі використовувались світловідбивачі (дихроїчні дзеркала) FW1-1 (FSet10wf) і FW1-2 (FSet20wf), що відповідали наборам фільтрів для різних каналів реєстрації. Ці оптичні елементи забезпечували ефективну сепарацію спектральних сигналів, запобігаючи перехресному збудженню та артефактам при багатоканальній візуалізації.

Крім стандартного флуоресцентного збудження, було проведено додаткове опромінення ультрафіолетовим (UV) світлом у режимі пропускання (transmission mode), без застосування емісійних фільтрів. Такий режим дозволив зафіксувати природну автофлуоресценцію як самих клітин, так і введених наночастинок. У результаті вдалося візуалізувати розподіл MoS₂-наночастинок у клітинах без додаткових барвників, що підкреслює їх потенціал як ендogenous флуоресцентних міток.



а



б

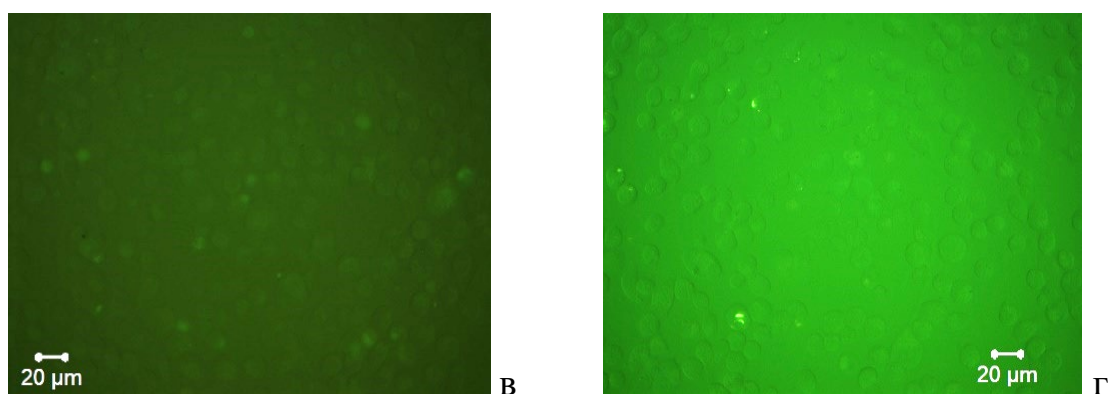


Рис.53. Конфокальні зображення клітин LLC (а) контроль, клітини LLC з наночастинками MoS_2 (б), при збудженні галогенною лампою, режим пропускання; і клітини LLC (в) контроль, клітини LLC з наночастинками MoS_2 (г) при збудженні УФ-лампюю з фільтрами FSet10 wf і FSet20 wf. Масштаб = 20 мкм

Окрім конфокальної візуалізації, для подальшого дослідження клітин LLC—та їх взаємодії з наноструктурами було використано метод широкопольової флуоресцентної мікроскопії, Рис.53. Візуалізація клітин контрольної групи (рис. 53а,в), клітин після інкубації з наночастинками дисульфиду молібдену (рис. 53б,г)), проводилась у двох режимах: збудження галогеновою лампою у режимі пропускання та збудження ультрафіолетовим (UV) випромінюванням із селективною фільтрацією сигналів за допомогою фільтрів FSet10 wf та FSet20 wf. Таке поєднання режимів дозволило оцінити як стандартні флуоресцентні сигнали, так і автофлуоресценцію наночастинок та їх вплив на загальний фоновий рівень люмінесценції клітин.

Аналіз отриманих зображень підтвердив, що наночастинки MoS_2 ефективно виконують функцію мультифункціональних маркерів. Вони не лише сприяють детекції структурних компонентів клітини, а й дозволяють візуалізувати ключові біологічні процеси, зокрема апоптоз, некроз, внутрішньоклітинний транспорт, а також розподіл терапевтичних агентів. У клітинах, оброблених MoS_2 без додаткових препаратів, не спостерігалось жодних ознак токсичного впливу — навпаки, було відзначено невелике

підвищення проліферативної активності, що свідчить про толерантність LLC-клітин до даного наноматеріалу.

Деталізоване вивчення конфокальних зображень дозволило з'ясувати, що субнанометрові частинки MoS_2 , успішно проникають у клітини та локалізуються переважно в цитоплазмі, іноді концентруючись у перинуклеарній зоні.

У сукупності, отримані результати свідчать про високий потенціал 2D- MoS_2 наночастинок як інструменту флуоресцентного контрастування у біофізичних дослідженнях клітин. Особливо перспективним є їхнє використання у складі з терапевтичними агентами, такими як доксорубіцин, що дозволяє об'єднати функції візуалізації та доставки препарату в єдиній системі. Поєднання з наноструктурованими підкладками відкриває додаткові можливості для підсилення сигналу та підвищення чутливості методів візуалізації.

5.4. Скануюча електронна мікроскопія клітин LLC

Скануюча електронна мікроскопія була застосована для детального аналізу клітин LLC, які культивувались в умовах адгезивного та деадгезивного росту, що моделює стан циркулюючих метастатичних пухлинних клітин.

Оскільки біологічні об'єкти, зокрема клітини, мають високий вміст води та є електрично непровідними, СЕМ-аналіз таких зразків вимагає ретельної та поетапної препаративної підготовки.

Підготовані клітини переносили на шліфовані кремнієві пластинки — вибір таких підкладок був зумовлений їх хімічною інертністю, електропровідністю та відсутністю поверхневої топології, яка могла б ускладнити інтерпретацію зображень. Осаджені клітини висушували в умовах ламінарного боксу при кімнатній температурі, після чого наносили тонкий (~20 нм) шар золота методом магнетронного розпилення, що запобігало електростатичному заряду під час експозиції електронним пучком. Окремої

уваги потребує збереження механічної цілісності клітин після фіксації та сушіння. LLC-клітини продемонстрували достатню структурну стійкість і не піддалися колапсу під дією електронного пучка. Це свідчить про високу якість підготовки зразків, адекватне фіксування цитоскелету та ефективне зневоднення без структурних артефактів.

Сканування проводилось у режимі вторинних електронів (SE) при прискорювальній напрузі 10.0 кВ. Поле зору варіювалося від 150 до 20 мкм, що відповідало ступеню збільшення від 1260 $\times$ до 9480 $\times$.

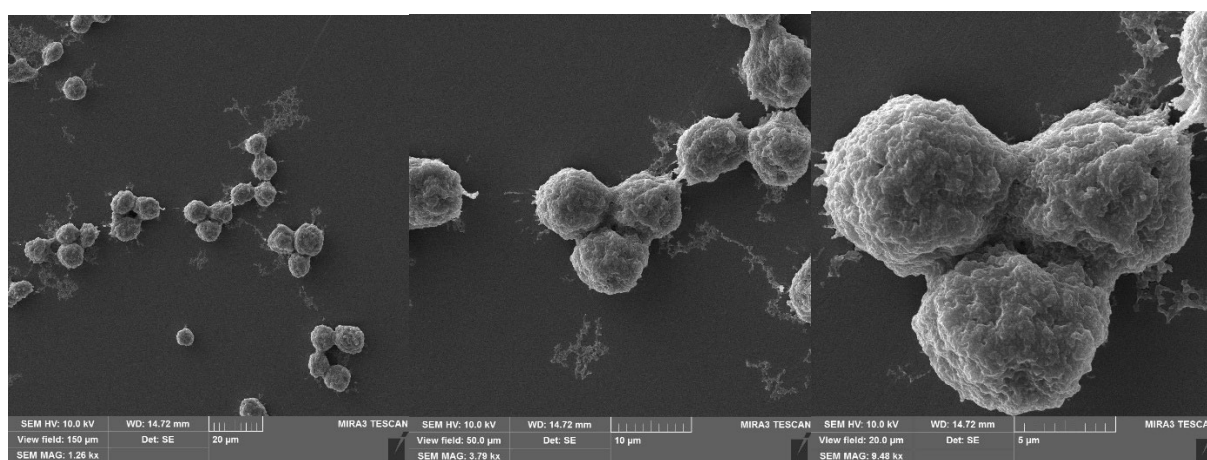


Рис.54. СЕМ-зображення деагезивних клітин LLC, серія послідовних збільшень однієї ділянки

На зображеннях, Рис.54 при низькому збільшенні (1260 $\times$) було виявлено ізольовані сферичні клітини, а також невеликі агломерати, що утворювались внаслідок залишкових міжклітинних взаємодій після центрифугування. Клітини зберігали свою округлу форму, що свідчить про відсутність адгезії до підкладки та збереження деадгезивного фенотипу. При середньому збільшенні (3790 $\times$) було чітко видно контури клітин, а також екстрацелюлярні волокнисті структури, ймовірно, залишки розірваних актинових або інших цитоскелетних компонентів, пов'язаних з міжклітинними контактами.

Найбільш детальна інформація була отримана при високому збільшенні (9480 $\times$), де візуалізувались залишки мікропротрузій клітинної мембрани —

філоподії, мікворсинки. Поверхня мембрани виявилась текстурованою, із ділянками різної зернистості та численними везикулярними утворами, що вказує на функціональну активність та внутрішньоклітинну реорганізацію.

На зображенні добре видно щільний кластер сферичних клітин, частина з яких перебуває в стані скупчення, можливо внаслідок залишкових клітинних адгезивних взаємодій або під час осадження в процесі підготовки. Поверхня більшості клітин горбиста, текстурована, із наявністю пухирчастих, мікровезикулярних та мікропротрузійних структур, що є типовими ознаками активної мембранної динаміки. У деяких клітин спостерігаються виражені складки, що можуть відображати зневоднення або цитоскелетну перебудову в умовах фіксації.

Розміри клітин варіюють у межах 8–12 мкм, що узгоджується з літературними даними для LLC. Кластерна організація клітин нагадує агрегати циркулюючих пухлинних клітин, які можуть тимчасово утримувати міжклітинні контакти навіть у стані суспензії.

Бачимо, що візуалізація підтверджує механічну стабільність клітин після фіксації — вони зберегли об'єм та поверхневу структуру без явних ознак колапсу. Подібні структури можуть слугувати об'єктами дослідження для аналізу апоптозу, ендоцитозу та взаємодії з наночастинками.

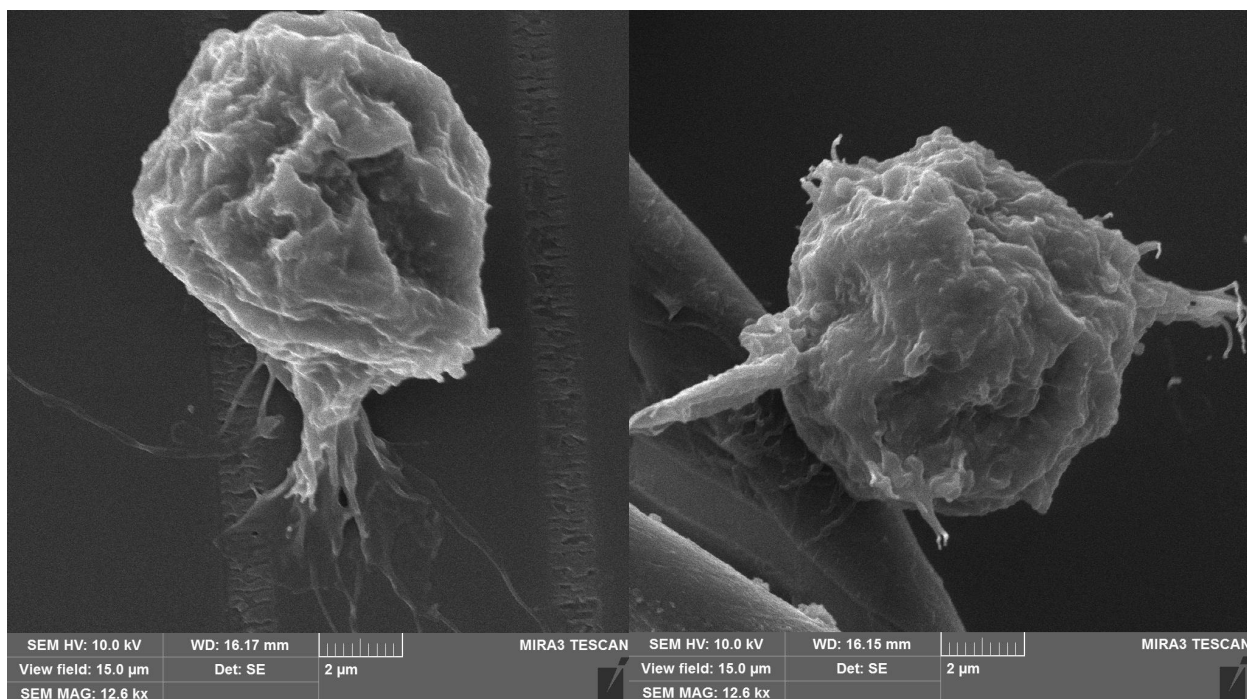


Рис.55. СЕМ-зображення клітин неадгезивної LLC, культивованих в режимі SE,

На Рис.55 зліва, клітина LLC, яка залишається у сферичному стані після обробки. Поверхня клітини вкрита численними дрібнотекстурированными нерівностями, мікропухирцями та складками, що вказує на інтенсивну мембранну динаміку. Така поверхнева топографія є типовою для неадгезивного стану та відповідає активному функціонуванню клітин, які знаходяться в суспензії або імітують стан циркулюючих метастатичних пухлинних клітин. Агрегація клітин могла виникнути внаслідок залишкових міжклітинних контактів під час центрифугування або осадження.

На Рис.55 справа зображення демонструє контактні структури клітини, що взаємодіє з підкладкою. У центрі видно одну клітину LLC, яка демонструє збережену округлу форму, але також має виражені витягнуті філоподії, виступи, що прилягають до підкладки. Ці структури мають довжину до кількох мікрометрів і є ознакою початкового етапу адгезії або спроб клітини закріпитися навіть в умовах неадгезивної поверхні.

Мембрана клітини має нерівномірну, складчасту структуру з наявністю щілиноподібних западин, що може бути пов'язано з перерозподілом актину та

внутрішньоклітинного тиску після фіксації. Такий вигляд є характерним для клітин, що зазнали структурної перебудови цитоскелету, або демонструють активацію механізмів міграції.

Усі зображення демонструють високу морфологічну складність поверхні клітин LLC, зокрема у вигляді філоподій, складок, мікровезикул та псевдоподій.

Фіксація та препаративна підготовка забезпечили збереження просторової архітектури клітин і деталей мембрани. Наявність виступів і контактних структур свідчить про реорганізацію цитоскелету, а також активацію процесів міграції, адгезії або апоптозу.

Для подальшого дослідження, було використано і адаптовано систему пробопідготовки методом сушки в критичній точці (CPD), що передусім передбачає заміщення води в клітині спиртовим розчинником, який згодом був заміщений вуглекислотою. Застосування 96% етанолу в суспензії забезпечило ефективне попереднє зневоднення клітин, з подальшим стабільним переходом до критичної сушки. Фіксація з OsO_4 сприяла контрастуванню ліпідних доменів та збереженню мембранної архітектури. Це дозволило максимально зберегти морфологічні особливості клітини, для дослідження в умовах вакууму в електронному мікроскопі. Целюлозний фільтр із пористістю 0,5 мкм який був використани в процесі пробопідготовки, формує фонову мікроструктуру, яка допомагає стабілізувати клітини під час сушіння і добре контрастує з об'єктами спостереження. Видимі округлі пори не заважають візуалізації, а навпаки, підкреслюють об'ємність клітин.

Пробопідготовка та параметри зображення на Рис.56 були наступними: підкладка: целюлозний фільтр із порами $\sim 0,5$ мкм ~ 20 нм золота (магнетронне розпилення), метод візуалізації, вторинні електрони (SE), збільшення: ~ 6300 х, поле зору: 30 мкм, робоча відстань: ~ 16.5 мм, прискорююча напруга: 10.0 кВ

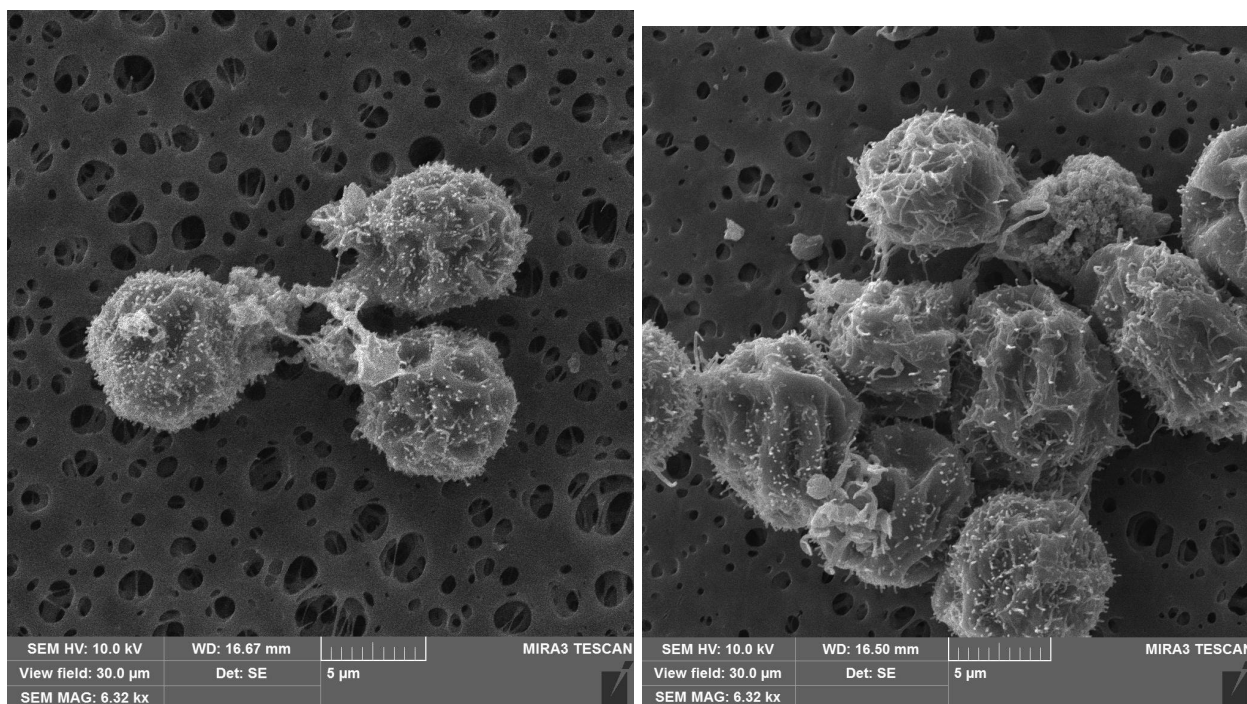


Рис 56/: Клітини LLC, підготовлені методом сушки в критичній точці, CPD) на целюлозному фільтрі

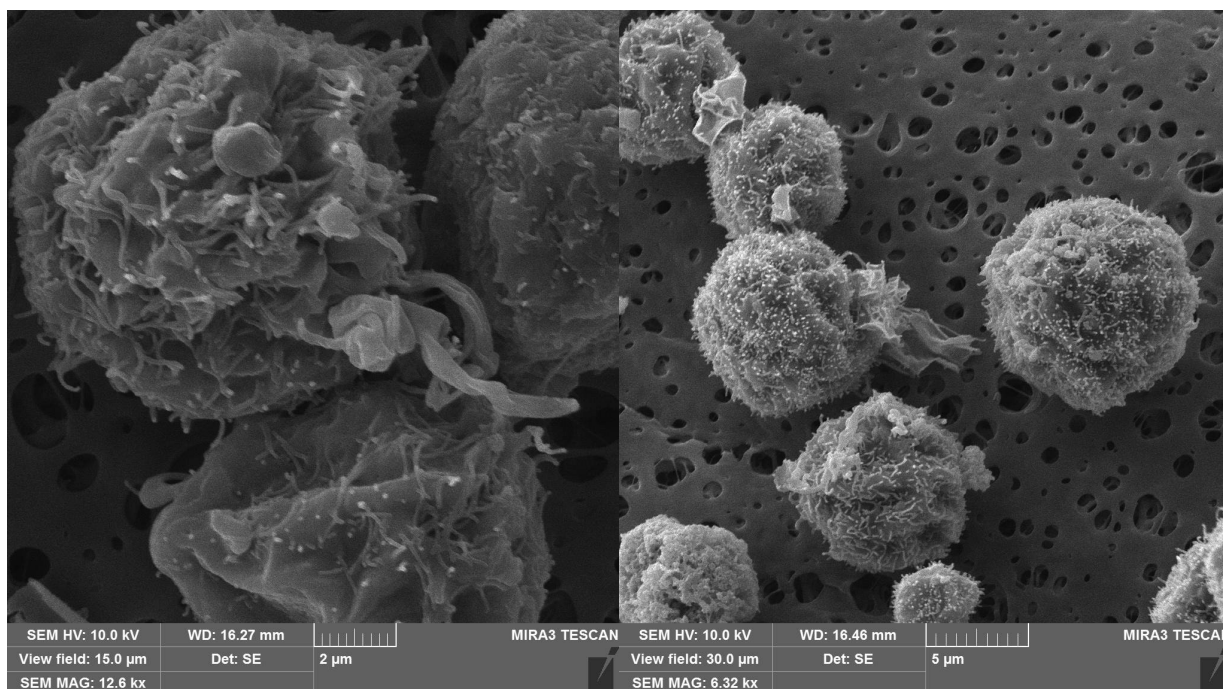
На зображенні зліва чітко візуалізовано групу з трьох клітин, що зберегли сферичну або овальну форму після фіксації та сушіння. Клітини демонструють помірно текстуровану поверхню з дрібнозернистими елементами, які, ймовірно, відповідають білковим або глікопротеїновим доменам плазматичної мембрани.

Між клітинами чітко видно мембранні містки, які вказують на збереження залишкових міжклітинних контактів після обробки. У нижній частині зображення видно структури, що відходять від клітин до підкладки — це можуть бути філоподії, наявність яких свідчить про попередню адгезію до поверхні фільтру.

На Рис.56 праворуч ми бачимо агреговані клітини з численними мікрориступами. Це зображення демонструє великий агрегат з ~ 10 клітин LLC, що зберегли індивідуальну морфологію. Поверхня кожної клітини характеризується наявністю великої кількості мікроскопічних виступів, схожих на філоподії, мікроросинки. Ці структури мають довжину від 100 до

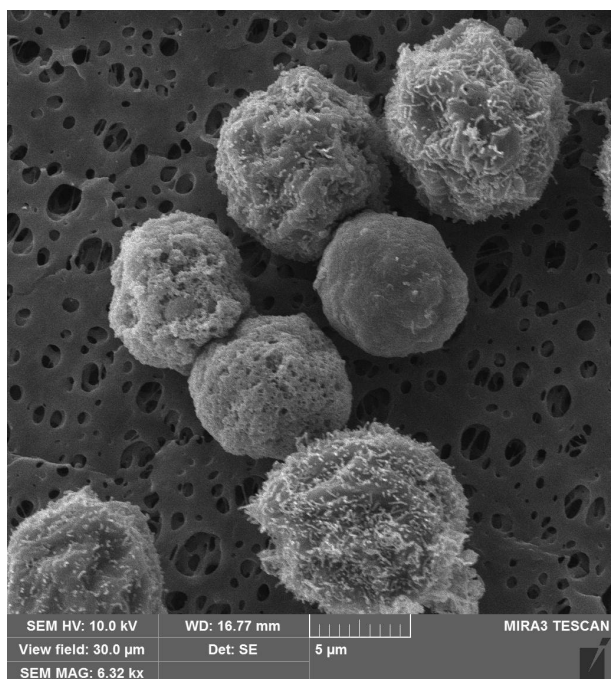
500 нм та варіативну форму: від тонких ниткоподібних до широких структур. Ці деталі особливо добре зберігаються саме завдяки сушінню методом критичної точки, який мінімізує поверхневі натяги та запобігає колапсу м'яких біологічних структур. Класичні ознаки апоптозу або клітинного стресу не спостерігаються: мембрани не зруйновані, об'єм клітин збережено, поверхневі структури залишаються.

Помітні випуклі мікрокупи на поверхні клітин можуть бути залишками ендосом або везикул, що формуються під час ендоцитозу. Поверхнева морфологія клітин вказує на відсутність руйнування, високу структурну цілісність та збереження функціонально значущих елементів, які можуть бути об'єктами подальшого аналізу, зокрема взаємодії з наночастинками, аналізу клітинної активності, секреції, тощо.



а

б



В

Рис 57.: Клітини LLC, висушені методом CPD на целюлозному фільтрі

На Рис.57, проведено серію послідовних вимірювань, для клітин LLC. Зображення Рис.57а — гомогенна популяція округлих клітин із дрібнозернистою структурою. Це зображення ілюструє групу клітин LLC, що утворюють компакту мозаїку з майже ідеально сферичною геометрією. Поверхня кожної клітини вкрита великою кількістю мікропухирців та дрібних виступів (0.1–0.3 мкм).

Окремі клітини вкриті тонкою гранулярною фракцією, яка може відповідати залишкам поверхневої секреції або внутрішньоклітинного вмісту внаслідок дегідратації. Незважаючи на це, клітини демонструють високий ступінь морфологічної збереженості, а їх поверхнева щільність та ступінь фрагментації мембран виглядає повністю фізіологічним.

Зображення також фіксує контактні зони між клітинами, де спостерігається початкове злиття або деформація країв, що вказує на можливу ініціацію міжклітинних контактів, подібних до тих, що реалізуються під час формування кластерів циркулюючих пухлинних клітин.

На Рис.57б — варіації морфотипів: від сферичних до поруватих структур. Це зображення вражає морфологічною неоднорідністю клітинної популяції. У межах одного поля зору спостерігаються як сферичні клітини з гладкою поверхнею, так і клітини з пористою мембраною. Така гетерогенність свідчить або про відмінності у стадії клітинного циклу, або про різну відповідь клітин на фіксацію та сушіння.

Цікавою є наявність клітин із частковим руйнуванням поверхневої структури, яка набуває пористості, схожої на спінені ліпідні домени. Це може бути результатом дії фіксаторів на клітини, що перебували в активному метаболічному стані з підвищеною секрецією або вивільненням екзосом.

Інша підгрупа клітин має хвилясту, гофровану поверхню з численними мікропротрузіями, розташованими хаотично по всій площині — це характерна ознака активної мембранної динаміки, яка вказує на інтенсивне переформатування актинового цитоскелету, можливо під дією стресу.

На Рис.57в — багатошарова клітина з виступами. Центральна клітина на зображенні демонструє розвинуту поверхневу архітектуру з багатошаровими складками, численними виступами та щільними мікроструктурами, що нагадують активні мембранні бляшки. Спостерігається високий ступінь морфологічної неоднорідності поверхні, з зонами локальної агрегації мембранних виступів і формування складчастих структур.

Окремі фрагменти мембрани, що виглядають як витягнуті трубчасті утворення, можуть відповідати філаментам, що свідчать про стан переходу клітини з мобільного до стабілізованого типу. Їхня довжина перевищує кілька мікрометрів, що є нетиповим для фіксованих клітин, і це підкреслює високу ступінь збереження динамічних структур завдяки сушінню методом критичної точки.

Отримані СЕМ-зображення клітин LLC у деадгезивному стані дозволяють провести порівняльний аналіз з результатами, отриманими раніше для модельних ліпосом та ліпосом з включеними наночастинками. У той час як ліпосоми мають переважно гладку поверхню та регулярну сферичну форму,

пухлинні клітини демонструють складну топографію та різноманітність поверхневих структур.

Таким чином, ми бачимо, що скануюча електронна мікроскопія виявилась надзвичайно інформативною для оцінки поверхневої морфології клітин карциноми легені Льюїс в умовах, що моделюють циркулюючі метастатичні пухлинні клітини. Завдяки оптимізованій підготовці експериментальних зразків та застосуванню режиму SE-візуалізації вдалося отримати зображення з нанометровою роздільною здатністю, що дозволили виявити ключові структурні ознаки: мікропротрузії, філоподії, локальні деформації мембрани та мікровезикулярні утворення. Ці елементи є маркерами функціональної активності клітини та можуть відображати специфічні механізми, пов'язані з метастазуванням, апоптозом або міжклітинною взаємодією

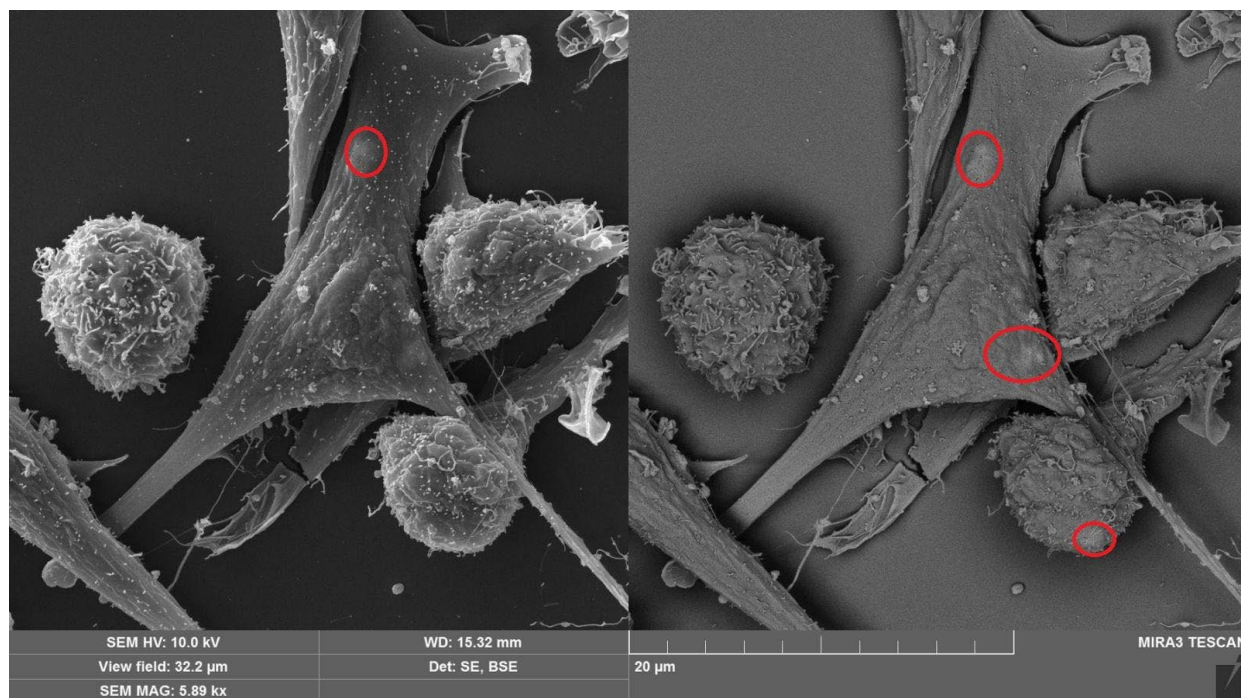


Рис.58. CEM зображення клітин LLC з наночастинками WS_2 в режимах SE та BSE

Також було проведено CEM-аналіз клітин LLC/R9, інкубованих з наночастинками WS_2 в адгезивних умовах. На Рис.58 праворуч видно, що у

режимі SE реєструються переважно включення, які викликають локальні деформації мембрани (діаметром близько 0,9–1,1 мкм),

Режим BSE за тих же параметрів сканування демонструє елементно-контрастну картину, чутливу до матеріалів з високим атомним номером. У BSE-режимі у тій самій центральній клітині фіксуються три виразні яскраві ділянки, виділені червоним, які не всі чітко проглядаються у SE-зображенні. Верхня ділянка збігається за розташуванням із виступом, поміченим у SE, підтверджуючи наявність частинки під мембраною. Друга ділянка, розташована ближче до центру клітини, має діаметр $\sim 1,3\text{--}1,5$ мкм і не має чітко вираженої поверхневої деформації у SE, що вказує на більш глибоке розташування наночастинки. Найменша яскрава точка у нижній частині клітини, діаметром $\sim 0,4\text{--}0,5$ мкм, імовірно, відповідає поодинокій частинці або невеликому кластеру WS_2 .

Аналіз локалізації цих включень, також дозволяє аналізувати біологічні процеси, що призводять до накопичення WS_2 у клітині. Спостережена нерівномірність розподілу частинок вказує на вплив цитоскелетних структур та мембранної гетерогенності на шляхи внутрішньоклітинного транспорту наноматеріалів.

Таким чином, комбінований аналіз у SE та BSE режимах дозволяє не лише візуалізувати морфологічні наслідки взаємодії клітин з наночастинками, але й встановити зв'язок між фізичними характеристиками WS_2 , їх здатністю проникати крізь плазматичну мембрану клітини.

Таблиця 2

Результати вимірювання EDS у вагових відсотках репрезентативна ділянка клітин з WS_2

C	N	O	Al	S	W	Os	Всього
42.37	5.10	3.17	0.26	10.28	33.81	5.00	100.00

Важливим результатом, окрім іншого, є узгодженість співвідношення S/W в структурі WS₂, виміряного методом EDS, Табл.2. Для стехіометричного WS₂ очікуване співвідношення (вагове) $S/W \approx 0.258/0.742 = 0.35$. За таблицею маємо $S/W = 10.28/33.81 = 0.304$. У перерахунку на атомні відсотки (з урахуванням атомних мас: S 32.06, W 183.84) отримуємо $S \approx 6.92\%$, $W \approx 3.97\%$, тобто $S:W \approx 1.74$, що близько до 2:1 для WS₂ з дефіцитом сірки. Відхилення пояснюються сильним розбавленням сигналу, клітинною матрицею та Os; по-друге, частковим самопоглинанням низькоенергетичних ліній S K α у рельєфному, покритому зразку; по-третє, можливими перекриттями M-серій важких елементів (W, Os) у ділянці 1.7–2.2 кеV, що ускладнює аналіз.

Попри це, в ході дослідження вдалося зафіксувати наявність виразних піків W і S, що однозначно підтверджують присутність дисульфиду вольфраму і отримати елементне співвідношення що відповідає композиції наночастинок WS₂.

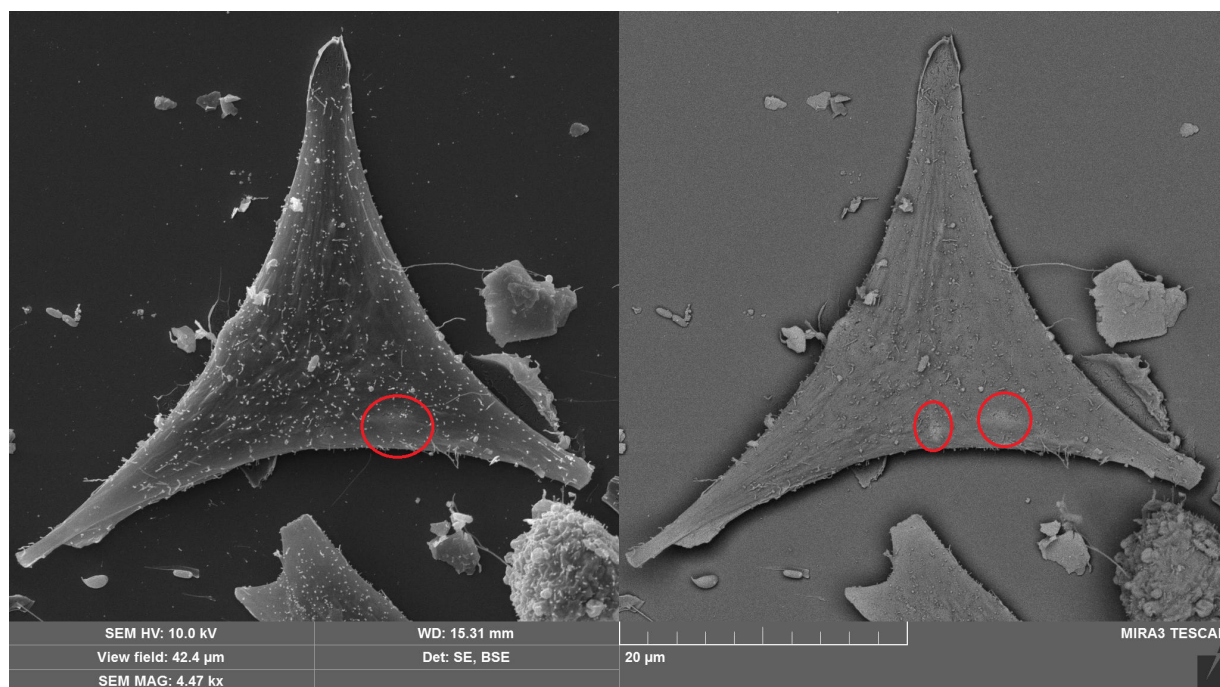


Рис.59. СЕМ зображення клітин LLC з наночастинками MoS₂ в режимах SE та BSE

На Рис.59, аналогічно з попередніми результатами, зображені клітини лінії LLC/R9. Ліва частина сканування в режимі SE, відображає рельєф і морфологічні деталі поверхні клітини з витягнутою трикутною формою. Поверхня має локальні ділянки нерівностей і поодинокі опуклості; у зоні, виділеній червоним, помітний виступ діаметром близько 0,8–1,0 мкм, що може відповідати близько розташованому до мембрани включенню наночастинки MoS₂. Через нижчий атомний номер молібдену ($Z = 42$) у порівнянні з вольфрамом, аналогічні включення дають менш виражений BSE-контраст, а невеликі деформації поверхні можуть зливатися з мікрорельєфом мембрани. У зонах, виділених червоним, фіксується помірне підвищення яскравості, яке вказує на локалізацію внутрішньоклітинних включень.

Таблиця 3.

Результати вимірювання EDS у вагових відсотках, репрезентативна ділянка клітини з MoS₂

N	O	Na	Al	Si	S	Ca	Mo	Os	Total
12.43	4.90	0.40	0.45	0.93	25.78		48.60	6.51	100.00

Аналіз результатів вимірювання EDS з репрезентативної ділянки з MoS₂ на Табл.3, показав вміст молібдену 48,60 % і сірки 25,78 %, що становить близько трьох чвертей маси зразка та свідчить про локалізацію наночастинки у межах клітинного об'єму. Співвідношення S:Mo становить 0,53 за масою та 1,59:1 в атомних відсотках, що дещо нижче від стехіометрії MoS₂, що пояснюється перекриттям спектральних ліній сірки і молібдену та частковим поглинанням сигналу у клітинній матриці. Присутність азоту і кисню відповідає молекулярному складу клітини, сигнал осмію — постфіксації OsO₄, а сліди натрію, алюмінію та кремнію пов'язані з буферними солями або домішками. Дані підтверджують внутрішньоклітинне вбудовування MoS₂, а також, по аналогії із переднім зразком, присутність дисульфиду молібдену і

наближене елементне співвідношення що відповідає композиції наночастинок MoS₂.

Отримані результати для клітин LLC/R9 після інкубації з наночастинками WS₂ та MoS₂ демонструють здатність обох типів двовимірних дихалькогенідів проникати у клітини в умовах адгезивного росту та формувати внутрішньоклітинні включення. У випадку WS₂, завдяки вищій атомній вазі вольфраму, включення чітко фіксуються у BSE-режимі та підтверджуються EDS-аналізом із співвідношенням S:W, близьким до стехіометрії. Для MoS₂ BSE-контраст менш виражений, однак EDS так само виявив характерні лінії молібдену та сірки.

Порівняльний аналіз SE і BSE зображень показав, що наночастинки можуть як локалізуватися біля мембрани, викликаючи поверхневі деформації, так і розміщуватися глибше в цитоплазмі, не змінюючи топографії, але створюючи елементно-залежний контраст. Біологічно це вказує на активні механізми внутрішнього транспорту, та на можливе накопичення наночастинок у везикулах.

5.5. Висновки до Розділу 5

1. Було апробовано широкий набір експериментальних методів — флуоресцентну, конфокальну та скануючу електронну мікроскопію — для комплексної візуалізації та аналізу клітин карциноми легені Льюїс.

2. Розроблені та апробовані процедури пробопідготовки (вакуумної сушки і сушки в критичній точці) клітин LLC, вирощених в адгезивних та деадгезивних умовах, для візуалізації методом електронної мікроскопії.

3. Встановлено, що навіть за відсутності адгезії, клітини зберігають динамічну мембранну архітектуру, проявляючи перебудови цитоскелету у вигляді філоподій, ламелоподій і мікроворсинок. У випадку пробопідготовки зразків методом сушки в критичній точці, краще візуалізується тонка структура клітини.

4. Виявлено вбудовування наночастинок MoS_2 та WS_2 у клітини LLC і проведено візуалізацію даних наноструктур у зворотньо-відбитих електронах. Елементний склад підтверджено енергодисперсійною рентгенівською спектроскопією.

5. Взаємодія клітин LLC з наночастинами MoS_2 та WS_2 супроводжується проникненням крізь мембрану, локалізацією в цитоплазмі та локальними неоднорідностями бішару, що відображає індукцію електростатичних полів і механічних напружень.

ВИСНОВКИ

Для дослідження взаємодії наночастинок MoS_2 та WS_2 з модельними мембранами та клітинами карциноми легені Льюїса (LLC), місць зв'язування, структурних особливостей застосовувались експерименти з використанням флуоресцентної, конфокальної, скануючої електронної мікроскопії, оптичної, коливальної, люмінесцентної спектроскопії.

1. Створено модельні системи «ліпосома-наночастинка» для дослідження взаємодій наночастинок з мембранами.

2. Застосування скануючої електронної мікроскопії та енергодисперсної рентгенівської спектроскопії дозволило візуалізувати наночастинки MoS_2 та WS_2 і морфологічні особливості ліпосом з ними, які неможливо зафіксувати методами оптичної мікроскопії

3. 2D наночастинки MoS_2 та WS_2 виявили здатність до нековалентної взаємодії з фосфоліпідними мембранами шляхом водневого зв'язування.

4. Встановлено спектроскопічні маркери вбудовування наночастинок в ліпосомах: гасіння люмінесценції і затухання раманівського розсіювання в спектрах ліпосом з наночастинками, зсув характеристичних ІЧ смуг на 30 cm^{-1} в області валентних коливань діолеїлхолін групи.

5. СЕМ-візуалізація показала інтеграцію наночастинок в ліпосоми та морфологічні перебудови. У зворотно-відбитих електронах зафіксовано контраст важких елементів, що підтверджує локалізацію наночастинок.

6. Для клітин LLC розроблено й апробовано процедури пробопідготовки (вакуумна та критична точка сушки), що дозволили вперше отримати високоякісні СЕМ-зображення клітин у адгезивному та деадгезивному станах.

7. Встановлено, що наночастинки MoS_2 та WS_2 локалізуються як в цитоплазмі клітини, так і в околі мембрани клітині, модифікуючи поверхню мембрани, утворюючи поверхневі нерівності.

8. Поєднання модельних і клітинних систем забезпечило можливість відокремити фізичні ефекти взаємодій від клітинно-специфічних реакцій.

Ліпосоми відображають безпосередні зміни в структурі ліпідного бішару, тоді як клітини LLC демонструють перетворення цих змін у морфологічне ремоделювання мембрани, з утворенням ламілоподій та перебудовою міжклітинних контактів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Optical and electron microscopy imaging of model circulating tumour cells. M. Olenchuk, G. Monastyrskyi, O. Gnatyuk, A. Boisen, Z. Zhang, G. Solyanik, D. Kolesnyk, S. Karakhim, G. Dovbeshko. *Biophysical Bulletin*. 2025;53:46–59. (Q4) <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-06>
2. The influence of WS₂ 2D NPs on the liposomes formation, morphology and spectral properties. Olena P. Gnatyuk, Maryna V. Olenchuk, Grygorii P. Monastyrskyi, Yurii M. Barabash, Ievgen V. Gubareni, Ganna V. Levchenko, Andrii S. Nikolenko, Anatoliy S. Tolochko, Ihor M. Kupchak, Galyna I. Dovbeshko. *Journal of Molecular Structure*. 2025 (Preprint). <https://doi.org/10.2139/ssrn.5196556> (Q2)
3. MoS₂ 2D nanoparticles as inducers of changes in liposomes formation and their spectroscopic properties. G. Monastyrskyi, O. Gnatyuk, I. Gubareni, G. Levchenko, A. Nikolenko, M. Olenchuk, A. Tolochko, I. Kupchak, G. Dovbeshko. *Low Temperature Physics*. 2025, 51(2), 287–299. <https://doi.org/10.1063/10.0035414> (Q3)
4. Effect of 2D-WS₂ Nanoparticles on a Local Electrical Field at a Membrane Vicinity: Vibrational Spectroscopy Data. Galina I. Dovbeshko, Ulyana K. Afonina, Marina V. Olenchuk, Ihor M. Kupchak, Olena P. Gnatyuk, Grygorii P. Monastyrskyi, Andrii S. Nikolenko, Hanna V. Shevlyakova, Anna M. Morozovska. *Journal of Physical Chemistry C*. 2024, 128(3), 1131–1138. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c05693> (Q2)
5. Transient processes in electric transport in the powder MoS₂ samples. V. V. Vainberg, O. S. Pylypchuk, V. N. Poroshin, M. V. Olenchuk, G. I. Dovbeshko, G. P. Monastyskyi. *Journal of Applied Physics*. 2022, 131, 234301. <https://doi.org/10.1063/5.0090012> (Q2)
6. Magnetic properties of MoS₂ and WS₂ powders. Andrii Bodnaruk, Grygorii Monastyrskyi, Valerii Bykov, Maryna Olenchuk, Galyna Dovbeshko. *Proceedings of the 2022 IEEE 41st International Conference on Electronics and Nanotechnology*

- (ELNANO). 2022, 91. <https://doi.org/10.1109/ELNANO54667.2022.9927028> (SJIR 0.174, H-Index 12)
7. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: W. H. Freeman.
 8. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science.
 9. Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720–731.
 10. Lodish, H. F., Darnell, J. E. (2000). Transport across cell membranes. In *Molecular Cell Biology* (Chapter 12). W. H. Freeman.
 11. Brodsky, F. M., Lem, L. (2003). Regulation of intracellular transport: The emerging role of the cell membrane. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(2), 133–143.
 12. Garcia-Parajo, M. F., Cambi, A., Torreno-Pina, J. A., Thompson, N., Jacobson, K. (2014). Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization. *Journal of Cell Science*, 127(23), 4995–5005. <https://doi.org/10.1242/jcs.149955>
 13. Dufrêne, Y. F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., Gerber, C., Müller, D. J. (2017). Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, 12(4), 295–307. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>
 14. Owen, D. M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A., Gaus, K. (2012). Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nature Protocols*, 7(1), 24–35.
 15. Siani, P., Donadoni, E., Ferraro, L., Re, F., Di Valentin, C. (2021). Molecular Dynamics Simulations of Doxorubicin in Sphingomyelin-Based Lipid Membranes. *arXiv preprint arXiv:2109.00436*.
 16. Li, H., Zhao, T., Sun, Z. (2018). Analytical Techniques and Methods for Study of Drug-Lipid Membrane Interactions. *Reviews in Analytical Chemistry*, 37(1), 20170012.

17. van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–124.
18. Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068), 578–580.
19. Coskun, Ü., Simons, K. (2011). Cell membranes: The lipid perspective. *Structure*, 19(11), 1543–1548.
20. Nicolson, G. L. (2014). The Fluid–Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(6), 1451–1466.
21. Lingwood, D., Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46–50.
22. Simons, K., Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 31–39.
23. Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597–1598.
24. Simons, K., Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110(5), 597–603.
25. Manes, S., del Real, G., Martinez, A. C. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nature Reviews Immunology*, 3(7), 557–568.
26. Parton, R. G., Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 185–194.
27. Dustin, M. L., Cooper, J. A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature Immunology*, 1(1), 23–29.
28. Simons, K., Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a004697.
29. Gomez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jimenez-Baranda, S., Martinez-A, C. (2001). Segregation of leading-edge and uropod

components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9642–9647.

30. Liu, P., Rudick, M., Anderson, R. G. (2002). Multiple functions of caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41295–41298.

31. Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research*, 44(4), 655–667.

32. Kim, M., Jung, S. Y., Lee, Y. M. (2017). Disruption of lipid rafts by cholesterol depletion inhibits the association of GPI-anchored proteins and Src kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485(2), 388–394.

33. Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *Journal of Cell Biology*, 160(1), 113–123.

34. Li, Y., Schwabe, R. F., DeVries-Seimon, T., Yao, P. M., Gerbod-Giannone, M. C., Tall, A. R., Tabas, I. (2005). Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor- α and interleukin-6: model of NF- κ B- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 21763–21772.

35. Lingwood, D., Binnington, B., Rog, T., Vattulainen, I., Grzybek, M. (2011). Cholesterol modulates glycosphingolipid conformation and receptor activity. *Nature Chemical Biology*, 7(5), 260–262.

36. Mayor, S., Rao, M. (2004). Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic*, 5(4), 231–240.

37. Campelo, F., Malhotra, V. (2012). Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 407–427.

38. Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Hell, S. W. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, 457(7233), 1159–1162.

39. Lingwood, D., Simons, K. (2007). Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nature Protocols*, 2(9), 2159–2165.

40. Owen, D. M., Gaus, K. (2010). Imaging lipid domains in cell membranes: the advent of super-resolution fluorescence microscopy. *Frontiers in Plant Science*, 1, 91.
41. Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and Surface Forces* (3rd ed.). Academic Press.
42. Mouritsen, O. G. (2010). The liquid-ordered state comes of age. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(7), 1286–1288.
43. van Meer, G., de Kroon, A. I. P. M. (2011). Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*, 124(1), 5–8.
44. Futerman, A. H., Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Reports*, 5(8), 777–782.
45. Maxfield, F. R., van Meer, G. (2010). Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(4), 422–429.
46. Hakomori, S. (2003). Structure and function of sphingoglycolipids in transmembrane signalling and cell-cell interactions. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1235–1241.
47. Lopez, P. H. H., Schnaar, R. L. (2009). Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(5), 549–557.
48. Varki, A. (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, 446(7139), 1023–1029.
49. Fadeel, B., Xue, D. (2009). The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(5), 264–277.
50. van Meer, G., Sprong, H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 373–378.
51. Yeagle, P. L. (1989). Lipid–protein interactions in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 988(3), 183–204.

52. Radhakrishnan, A., McConnell, H. M. (2000). Chemical activity of cholesterol in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1469(1), 164–176.
53. Levental, I., Byfield, F. J., Chowdhury, P., Gai, F., Baumgart, T., Janmey, P. A. (2009). Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma membrane vesicles. *Biochemical Journal*, 424(2), 163–167.
54. Simons, K., Gerl, M. J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 688–699.
55. Brown, D. A., London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17221–17224.
56. Sonnino, S., Prinetti, A. (2013). Membrane domains and the “lipid raft” concept. *Current Medicinal Chemistry*, 20(1), 4–21.
57. Kinoshita, M., Nishimura, S. (2007). Role of unsaturated phospholipids in formation of the liquid-ordered phase in lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(1), 123–131.
58. Kusumi, A., Fujiwara, T. K., Morone, N., Yoshida, K. J., Chadda, R., Xie, M., Suzuki, K. G. N. (2012). Mechanisms organizing the cell membrane: largely unexplored territory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 208–214.
59. Bagatolli, L. A., Mouritsen, O. G. (2013). Temperature-dependent lipid domain formation in model membranes: A brief review. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(5), 457–466.
60. Raghunathan, K., Milholland, J., Stryer, L. (1999). pH-dependent conformational changes in membranes modulate protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6229–6234.
61. Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: From Physics to Applications*. Elsevier Science Publishers B.V.
62. Chernomordik, L. V., Kozlov, M. M. (2003). Protein–lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 175–207.

63. Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A., Sligar, S. G. (2004). Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. *Journal of the American Chemical Society*, 126(11), 3477–3487.
64. Binder, H., Zschörnig, O. (2002). The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 115(1-2), 39–61.
65. Lewis, R. N. A. H., McElhaney, R. N. (2000). Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes. In M. Mantsch & D. Chapman (Eds.), *Infrared Spectroscopy of Biomolecules* (pp. 159–202). Springer.
66. Klauda, J. B., Venable, R. M., Freites, J. A., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., Pastor, R. W. (2010). Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(23), 7830–7843.
67. Veatch, S. L., Keller, S. L. (2003). Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophysical Journal*, 85(5), 3074–3083.
68. Marsh, D. (2009). Liquid-ordered phases induced by cholesterol: a compendium of binary phase diagrams. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(10), 2114–2123.
69. Ipsen, J. H., Karlström, G., Mouritsen, O. G., Wennerström, H., Zuckermann, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine–cholesterol system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 905(1), 162–172.
70. Heberle, F. A., Feigenson, G. W. (2011). Phase separation in lipid membranes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a004630. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004630>
71. Marsh, D. (2013). *Handbook of lipid bilayers* (2nd ed.). CRC Press.
72. Gater, D. L., Abdul-Wahab, R., Ghannoum, M. A., Elewski, B. E. (2010). Cholesterol modulates lipid raft stability and membrane fluidity in

- phosphatidylcholine-based liposomes. *Biophysical Journal*, 99(1), 57–66.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.034>
73. Monnard, P.-A., Deamer, D. W. (2002). Membrane self-assembly processes: steps toward the first cellular life. *The Anatomical Record*, 268(3), 196–207.
<https://doi.org/10.1002/ar.10154>
74. Bhattacharya, K., Mukherjee, S. P., Gallud, A., Burkert, S. C., Bistarelli, S., Bellucci, S., Fadeel, B. (2016). Biological interactions of MoS₂ nanosheets: implications for their use as therapeutic agents. *Advanced Functional Materials*, 26(43), 7780–7790.
75. Jaiswal, M., Shankar, R., Swami, R., Bhaskar, A., Jaiswal, A. K. (2020). WS₂ nanosheets: a promising candidate for drug delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(5), 6274–6286.
76. Gao, G., Ding, G. (2022). Theoretical study on the interaction between phospholipid molecules and MoS₂ nanosheets. *Journal of Physical Chemistry C*, 126(15), 7890–7898.
77. Li, H., Zhang, Q., Yap, C. C. R., Tay, B. K., Edwin, T. H. T., Olivier, A., Baillargeat, D. (2012). From bulk to monolayer MoS₂: Evolution of Raman scattering. *Advanced Functional Materials*, 22(7), 1385–1390.
78. Wang, Y., Li, X., Chen, H. (2021). Electrostatic interactions between phospholipid bilayers and WS₂ nanosheets: A molecular dynamics study. *Langmuir*, 37(12), 3580–3587.
79. Zhu, H., Wang, Y., Xiao, J., Liu, M., Xiong, S., Wong, Z. J., Zhang, X. (2015). Observation of piezoelectricity in free-standing monolayer MoS₂. *Nature Nanotechnology*, 10(2), 151–155.
80. Fei, R., Yang, L. (2015). Strain-engineering the anisotropic electrical conductance of few-layer black phosphorus. *Nano Letters*, 14(5), 2884–2889.
81. Yang, L., et al. (2010). BMK1 mediates endothelial cell proliferation through the regulation of VEGF expression. *Cancer Cell*, 18(6), 723–735
82. Lydon, M. J., Minett, T. W., Tighe, B. J. (1985). Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. *Biomaterials*, 6(6), 396–402.

83. Ingram, P. N., et al. (2013). PolyHEMA soft lithography for selective cell seeding, migration blocking, and high-throughput suspension cell culture. *Proceedings of the 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS)*, 486–488.
84. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols*, 4(3), 309–324.
85. Katt, M. E., et al. (2016). In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 12.
86. Moore, G. E., Gerner, R. E., Franklin, H. A. (1967). Culture of normal human leukocytes. *JAMA*, 199(8), 519–524.
87. Folkman, J., Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature*, 273(5661), 345–349.
88. Evans, C. L., Xie, X. S. (2008). Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 883–909.
89. Campagnola, P. J., Loew, L. M. (2003). Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1356–1360. <https://doi.org/10.1038/nbt894>
90. Psilodimitrakopoulos, S., Petegnief, V., Soria, G., et al. (2009). Estimation of the effective orientation of the SHG source in primary cortical neurons. *Optics Express*, 17(17), 14418–14425.
91. Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9, 413–418.
92. Hell, S. W., Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19(11), 780–782.
93. Huang, B., Babcock, H., Zhuang, X. (2010). Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell*, 143(7), 1047–1058.

94. Balzarotti, F., Eilers, Y., Gwosch, K. C., Gynnå, A. H., Westphal, V., Stefani, F. D., Hell, S. W. (2017). Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science*, 355(6325), 606–612.
95. Weisenburger, S., Boening, D., Schomburg, B., Giller, K., Becker, S., Griesinger, C., Sandoghdar, V. (2014). Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy. *Nature Methods*, 11(2), 137–142.
96. Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E., Kenworthy, A. (2001). Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(6), 444–456.
97. Digman, M. A., Gratton, E. (2011). Lessons in fluctuation correlation spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 62, 645–668.
98. Li, D., Shao, L., Chen, B. C., Zhang, X., Zhang, M., Moses, B., Betzig, E. (2015). Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science*, 349(6251), aab3500.
99. Zhang, Y., Cui, M. (2019). High-resolution optical imaging in deep tissue. *Nature Methods*, 16(5), 469–471.
100. Stokes, D. J. (2008). *Principles and Practice of Variable Pressure Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ECEM)*. John Wiley & Sons.
101. Everhart, T. E., Thornley, R. M. (1960). Wide-band detector for micro-microampere low-energy electron currents. *Journal of Scientific Instruments*, 37(7), 246–248.
102. Lloyd, G. E. (1987). Atomic number and crystallographic contrast images with the CEM: a review of backscattered electron techniques. *Mineralogical Magazine*, 51(359), 3–19.
103. Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Joy, D. C., Lyman, C. E., Echlin, P., Lifshin, E., Michael, J. R. (2003). *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis* (3rd ed.). Springer.
104. Salvat, F. (2022). Bethe stopping-power formula and its corrections. *Physical Review A*, 106(3), 032809.
105. Montanari, C. C., Dimitriou, P. (2017). The IAEA stopping power database, following the trends in stopping power of ions in matter. *Nuclear Instruments and*

- Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 408, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2017.05.021>
106. Campillo, I., Pitarke, J. M., Eguiluz, A. G. (1998). Electronic stopping power of aluminum crystal. arXiv preprint cond-mat/9808113. <https://arxiv.org/abs/cond-mat/9808113>
107. Chhowalla, M., Shin, H. S., Eda, G., Li, L. J., Loh, K. P., Zhang, H. (2013). The chemistry of two-dimensional layered transition metal dichalcogenide nanosheets. *Nature Chemistry*, 5(4), 263–275. <https://doi.org/10.1038/nchem.1589>
108. Voiry, D., Yang, J., Chhowalla, M. (2015). Recent strategies for improving the catalytic activity of 2D TMD nanosheets toward the hydrogen evolution reaction. *Advanced Materials*, 28(29), 6197–6206. <https://doi.org/10.1002/adma.201600100>
109. Heising, J., Kanatzidis, M. G. (1999). Exfoliated and restacked MoS₂ and WS₂: Ionic reactions of MoS₂ and WS₂ layers. *Journal of the American Chemical Society*, 121(6), 11720–11732. <https://doi.org/10.1021/ja992439a>
110. Shi, H., Pan, H., Zhang, Y.-W., Yakobson, B. I. (2013). Quasiparticle band structures and optical properties of strained monolayer MoS₂ and WS₂. *Physical Review B*, 87(15), 155304. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.87.155304>
111. Kośmider, K., Fernández-Rossier, J. (2013). Electronic properties of the MoS₂-WS₂ heterojunction. *Physical Review B*, 87(7), 075451. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.87.075451>
112. Hong, J., Hu, Z., Probert, M., Li, K., Lv, D., Yang, X., Wu, J. (2015). Exploring atomic defects in molybdenum disulphide monolayers. *Nature Communications*, 6, 6293. <https://doi.org/10.1038/ncomms7293>
113. Komsa, H.-P., Krasheninnikov, A. V. (2015). Native defects in bulk and monolayer MoS₂ from first principles. *Physical Review B*, 91(12), 125304. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.91.125304>
114. Conley, H. J., Wang, B., Ziegler, J. I., Haglund, R. F., Pantelides, S. T., Bolotin, K. I. (2013). Bandgap engineering of strained monolayer and bilayer MoS₂. *Nano Letters*, 13(8), 3626–3630. <https://doi.org/10.1021/nl4014748>

115. Eda, G., Fujita, T., Yamaguchi, H., Voiry, D., Chen, M., Chhowalla, M. (2012). Coherent atomic and electronic heterostructures of single-layer MoS₂. *ACS Nano*, 6(8), 7311–7317. <https://doi.org/10.1021/nn302422x>
116. Tongay, S., Suh, J., Ataca, C., Fan, W., Luce, A., Kang, J. S., Wu, J. (2013). Defects activated photoluminescence in two-dimensional CEMiconductors: interplay between bound, charged, and free excitons. *Scientific Reports*, 3, 2657. <https://doi.org/10.1038/srep02657>
117. Bertolazzi, S., Brivio, J., Kis, A. (2011). Stretching and breaking of ultrathin MoS₂. *ACS Nano*, 5(12), 9703–9709. <https://doi.org/10.1021/nn203879f>
118. Cooper, R. C., Lee, C., Marianetti, C. A., Wei, X., Hone, J., Kysar, J. W. (2013). Nonlinear elastic behavior of two-dimensional molybdenum disulfide. *Physical Review B*, 87(3), 035423. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.87.035423>
119. Vishnoi, P., Ling, K. S., Kloc, C., Cheetham, A. K. (2021). Why Are Double Perovskite Iodides so Rare? *Chem. Mater.*, 33(10), 3618–3625. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c00616>
120. Egerton, R. F. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, CEM, and AEM*. Springer.
121. Fan, X.-L., Yang, Y., Xiao, P., Lau, W.-M. (2016). Ferromagnetism in transitional metal-doped MoS₂ monolayer. *Nanoscale Research Letters*, 11, 154. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1376-y>
122. Wang, J., Sun, F., Yang, S., Li, Y., Zhao, C., Xu, M., Zhang, Y., Zeng, H. (2016). Robust ferromagnetism in Mn-doped MoS₂ nanostructures. *Applied Physics Letters*, 109(9), 092401. <https://doi.org/10.1063/1.4961883>
123. Dey, S., Srivastava, P., Phutela, A., Bhattacharya, S., Singh, F., Ghosh, S. (2024). Synergetic effect of edge states and point defects to tune ferromagnetism in CVD-grown vertical nanostructured MoS₂: A correlation between electronic structure and theoretical study. *Journal of Alloys and Compounds*, 946, 169340. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2023.169340>

124. Zhang, J., Soon, J. M., Loh, K. P., Yin, J., Ding, J., Sullivan, M. B., Wu, P. (2007). Magnetic molybdenum disulfide nanosheet films. *Nano Letters*, 7(8), 2370–2376. <https://doi.org/10.1021/nl071013i>
125. Mathew, S., Gopinadhan, K., Chan, T. K., Yu, X. J., Zhan, D., Cao, L., Rusydi, A., Breese, M. B. H., Dhar, S., Shen, Z. X., Venkatesan, T. (2012). Magnetism in MoS₂ induced by proton irradiation. *Applied Physics Letters*, 101(10), 102103. <https://doi.org/10.1063/1.4747206>
126. Shirokura, T., Muneta, I., Kakushima, K., Tsutsui, K., Wakabayashi, H. (2019). Strong edge-induced ferromagnetism in sputtered MoS₂ film treated by post-annealing. *Applied Physics Letters*, 115(19), 192404. <https://doi.org/10.1063/1.5126713>
127. Zhang, M., Li, Q., Cheng, W., Gao, Y., Ying, M. (2023). Robust room-temperature ferromagnetism induced by defect engineering in monolayer MoS₂. *Applied Surface Science*, 608, 155220. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.155220>
128. Wang, Y., Tseng, L.-T., Murmu, P. P., Bao, N., Kennedy, J., Ionescu, M., Ding, J., Suzuki, K., Li, S., Yi, J. (2017). Defects engineering induced room temperature ferromagnetism in transition metal doped MoS₂. *Materials & Design*, 121, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.02.067>
129. Frisch, H. L., Sonnenblick, E., Vyssotsky, V. A. (1961). Critical Percolation Probabilities (Site Problem). *Physical Review*, 124(4), 1021–1024. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.124.1021>
130. Zhang, Z., Zou, X., Crespi, V. H., Yakobson, B. I. (2013). Intrinsic Magnetism of Grain Boundaries in Two-dimensional Metal Dichalcogenides. *arXiv preprint arXiv:1308.4355*. <https://arxiv.org/abs/1308.4355>
131. Tao, P., Guo, H., Yang, T., Zhang, Z. (2013). Strain-induced magnetism in MoS₂ monolayer with defects. *arXiv preprint arXiv:1309.2066*. <https://arxiv.org/abs/1309.2066>

132. Yuan, S., Roldán, R., Katsnelson, M. I., Guinea, F. (2014). Effect of Point Defects on the Optical and Transport Properties of MoS₂ and WS₂. arXiv preprint arXiv:1404.1934. <https://arxiv.org/abs/1404.1934>
133. Evans, C. L., Xie, X. S. (2004). Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3), 827–840. <https://doi.org/10.1021/jp035693v>
134. Liput, D. J., Nguyen, T. A. (2021). A Guide to Fluorescence Lifetime Microscopy and Förster's Resonance Energy Transfer in Neuroscience. *Frontiers in Neuroscience*.
135. Zhang, X.-F., Zhang, Y., Xu, B. (2017). Enhance the fluorescence and singlet oxygen generation ability of BODIPY: Modification on the meso-phenyl unit with electron withdrawing groups. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*.
136. Prieto-Montero, R., et al. (2019). Methylthio BODIPY as a standard triplet photosensitizer for singlet oxygen production: a photophysical study. *Physical Chemistry Chemical Physics*.
137. Hanson, R. K. (2013). Spectral Lineshapes. Lecture Notes, Princeton University.
138. Snyder, B., et al. (1982). Fluorescence energy transfer in two dimensions. A numeric solution for random and nonrandom distributions. *Biophysical Journal*, 40(2), 137–148.
139. Hoff, A. J., Deisenhofer, J. (1998). Theories for kinetics and yields of fluorescence and photochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1365(1-2), 1–6.
140. De Mello, J. C., Wittmann, H. F., Friend, R. H. (1997). An improved experimental determination of external photoluminescence quantum efficiency. *Advanced Materials*, 9(3), 230–232.
141. Young Chai Cho et.al. *Scientific Reports* 10(1) DOI: 10.1038/s41598-020-68650-7
- 142.- OpenStax Biology / LibreTexts, CC BY 4.0

143. Connes, P. Early History of Fourier Transform Spectroscopy. *Infrared Physics*, 24(2–3), 69–93 (1984). [https://doi.org/10.1016/0020-0891\(84\)90054-4](https://doi.org/10.1016/0020-0891(84)90054-4)
144. T. Hirschfeld. “Upper Boundaries to the Extent of the Jacquinot or Throughput Advantage in Fourier Transform Infrared Spectroscopy.” *Applied Spectroscopy*, 31(5), 471-472 (1977).
145. McWhirter, J. T., & Sievers, A. J. (1992). Time-Resolved Spectroscopy with Fourier Transform Spectrometers: Maintaining the Fellgett Advantage. *Applied Spectroscopy*.
146. “Peak Fitting Applied to Fourier Transform Infrared and Raman Spectra” — A. Sadat et al., *Applied Sciences*, 2020.
147. “Analysis of FT-IR spectroscopic data: The Voigt profile” — Reilly, Walsh, Greenfield, Donohue, *Spectrochimica Acta Part A*, 1992.
148. Geraldles, C. F. G. C., & Lima, L. M. P. (2020). Introduction to Infrared and Raman-Based Biomedical Spectroscopy. *Frontiers in Medicine*, 7:57. DOI:10.3389/fmed.2020.00057
149. Brunetti, A. C., Scolari, L., Lund-Hansen, T., Weirich, J., & Rottwitt, K. (2012). All-in-fibre Rayleigh-rejection filter for Raman spectroscopy. *Electronics Letters*, 48(5), 275-276.
150. “Structural Determination of Model Phospholipid Membranes by Raman Spectroscopy” — J. Giancaspro et al., 2022.
151. Turrell, G. & Corset, J. (1996). *Raman Microscopy: Developments and Applications*. Academic Press.
152. Ferraro, J. R., Nakamoto, K., & Brown, C. W. (2003). *Introductory Raman Spectroscopy* (2nd ed.). Academic Press.
153. Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd ed.). Springer.
154. Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH.

155. Gaigalas, A. & Wang, L. (2008). Measurement of the Fluorescence Quantum Yield Using a Spectrometer With an Integrating Sphere Detector. *Journal of Research (NIST JRES)*.
156. Gaigalas, A. & Wang, L. Measurement of the Fluorescence Quantum Yield Using a Spectrometer With an Integrating Sphere Detector (2025)
157. Pawley, J. B. (Ed.). (2006). *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (3rd ed.). Springer.
158. Diaspro, A. (Ed.). (2010). *Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications and Advances*. Wiley-VCH.
159. Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T., et al. (2019). Super-resolution microscopy demystified. *Nature Cell Biology*, 21, 72–84.
160. Zumbusch, A., Holtom, G. R., & Xie, X. S. (1999). Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering. *Physical Review Letters*, 82(20), 4142–4145.
161. Axelrod, D. (2001). Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2(11), 764–774.
162. Becker, W. (2012). Fluorescence lifetime imaging—techniques and applications. *Journal of Microscopy*, 247(2), 119–136.
163. Hell, S. W. (2007). Far-field optical nanoscopy. *Science*, 316(5828), 1153–1158.
164. Betzig, E., Patterson, G. H., et al. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793), 1642–1645.
165. Newbury, D. E., & Ritchie, N. W. M. (2015). Performing elemental microanalysis with high accuracy and high precision by scanning electron microscopy/silicon drift detector energy-dispersive X-ray spectrometry (CEM/SDD-EDS). *Journal of Materials Science*, 50(2), 493–518.
166. Friel, J. J., & Lyman, C. E. (2006). X-ray mapping in electron-beam instruments. *Microscopy and Microanalysis*, 12(1), 2–25.
167. Lukiyanov, F. A., Rau, E. I., & Sennov, R. A. “Depth Range of Primary Electrons, Electron Beam Broadening, and Spatial Resolution in Electron-Beam Studies.” *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, Vol. 73, No. 4, 2009, pp. 441–449.
168. Tian, J., et al. “Monte Carlo Simulation and Theoretical Calculation of CEM Secondary Electron Yield and Electron Range.” *Ultramicroscopy*, 2023.

169. Gauvin, R., et al. "High Resolution Imaging in the Field Emission Scanning Electron Microscope at Low Accelerating Voltages." *Microscopy and Microanalysis*, 2014.