

УДК 543.456

© Ю. Г. Вайнер, В. Н. Крашенинников, А. В. Зыбин, А. В. Малек, Ф. В. Верещагин, 2019

СДВОЕННЫЙ ОПТИЧЕСКИЙ МИКРОСКОП ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОДИНОЧНЫХ "ПРОЗРАЧНЫХ" НАНОЧАСТИЦ

Описывается экспериментальный макет дальнеполевого оптического микроскопа, предназначенного для одновременной визуализации одиночных наночастиц двумя разными методами. Первый метод базируется на модифицированной версии микроскопа поверхностного плазмонного резонанса, второй — на высокочувствительной регистрации флуоресцентных меток, введенных в наблюдаемые наночастицы. Созданный микроскоп позволяет визуализировать наночастицы, которые слабо поглощают свет в выбранном диапазоне длин волн и характеризуются коэффициентом преломления, близким к его величине в окружающей их жидкости (полимерные наночастицы, вирусы, липосомы, внутриклеточные микровезикулы в водных средах). Совмещение двух методов позволяет повысить достоверность детектирования исследуемых наночастиц. Описываются оптическая схема сдвоенного микроскопа и его принцип действия, приводятся примеры регистрации наночастиц.

Кл. сл.: оптическая флуоресцентная микроскопия, темнопольный микроскоп, микроскопия плазмонного резонанса, сдвоенный микроскоп, наночастицы, липосомы, экзосомы

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых и совершенствование существующих методов визуализации и характеристики нанообъектов различной природы является одним из актуальных направлений в развитии современной науки и техники. Это связано с возрастающими потребностями науки и практики, бурным развитием нанотехнологий, а также с растущими потребностями современной медицины, где нанотехнологии все более широко применяются при создании новых методов диагностики и лечения различных заболеваний.

Для получения информации об изучаемых нанообъектах на наноуровне традиционно используются методы электронной микроскопии, а в последние два десятилетия также методы атомно-силовой и ближнепольной оптической микроскопии. Однако эти методы обладают рядом принципиальных недостатков. При использовании просвечивающего электронного микроскопа необходимо приготавливать образец в виде очень тонкой пленки и помещать в условия высокого вакуума, что сильно усложняет процедуру измерений и не всегда возможно. Поток высокоэнергетических электронов, создаваемых в электронном микроскопе, оказывает нежелательное воздействие на анализируемый объект. Не все подлежащие анализу среды обладают нужным поглощением электронов. Методы атомно-силовой микроскопии

дают информацию лишь о поверхности и тонком приповерхностном слое образца. Сильное локальное поле наноострия зондовых микроскопов оказывает нежелательное возмущающее воздействие на исследуемую область образца. Информацию, получаемую при таких измерениях, не всегда удается однозначно связать с исследуемыми параметрами изучаемого объекта.

В последние годы для локальной диагностики нанообъектов различной природы были развиты методы оптической микроскопии сверхвысокого пространственного разрешения, основанные на дальнеполевой флуоресцентной микроскопии одиночных молекул (STORM, PALM) и нелинейной флуоресцентной микроскопии (STED). Однако указанные методы и их разновидности также обладают рядом существенных недостатков. Флуоресцентные молекулы, используемые в этих методах в качестве точечных меток, также могут оказывать нежелательное воздействие на образец. В частности, такое воздействие крайне нежелательно при исследованиях биологических объектов. Кроме того, указанные флуоресцентные метки подвержены эффектам фотонаведенного выжигания и мерцания, что также делает их использование проблематичным. Микроскопы, реализующие вышеперечисленные методы, имеют очень высокую стоимость, а операция измерения при их использовании весьма сложна.

Отмеченные недостатки рассмотренных методов

диагностики наночастиц объясняют актуальность разработки новых, более оперативных и простых в использовании инструментов для визуализации и характеристики наночастиц и наноструктур. Методы дальнеполевой оптической микроскопии являются перспективным кандидатом для таких целей, т.к. они характеризуются более высокой оперативностью, более низкой ожидаемой стоимостью приборов на их основе, а также потенциально меньшей сложностью в использовании.

Одной из весьма актуальных задач в развитии методов диагностики наночастиц является разработка методов и методик, позволяющих осуществлять индивидуальную диагностику одиночных наночастиц, т.к. усредненные результаты измерений, выполненных с большим ансамблем наночастиц, могут давать сильно искаженную информацию об изучаемых объектах, что вызывается значительным разбросом индивидуальных параметров наночастиц. Кроме того, индивидуальные параметры наночастиц могут заметно изменяться при их взаимном контакте или слипании.

Другой не менее актуальной задачей является разработка методов и приборов для оптической визуализации практически прозрачных наночастиц. К таким частицам относятся частицы, слабо поглощающие свет в выбранном диапазоне длин волн и характеризующиеся коэффициентом преломления, близким к его величине в окружающей среде. Это, например, многие нано- и микрочастицы биологической природы, которые обычно на-

ходятся в водных средах (многие белковые молекулы и комплексы, вирусы, внутриклеточные микровезикулы, липосомы, экзосомы и т.п.), а также широкий круг полимерных и других наночастиц органической природы, помещенных в жидкие среды.

Чрезвычайно актуальной задачей разработок в области нанодиагностики является также повышение достоверности разрабатываемых методов. Крайне низкий уровень регистрируемых сигналов и высокий вклад шумов и паразитных сигналов при таких измерениях, серьезные трудности с очисткой образца и удалением нежелательных примесей, а также трудности с проверкой, полученной при измерениях информации с применением альтернативных методов, например с применением электронного микроскопа, делают эту задачу особенно острой. В частности, это крайне важно во многих применениях (например, в задачах медицинской диагностики).

В статье описывается разработанный авторами и испытанный на ряде реальных наночастиц экспериментальный оптический дальнеполевой микроскоп, предназначенный для оперативной визуализации одиночных наночастиц различной природы в жидких средах, включая частицы, слабо поглощающие свет в рабочей области прибора и характеризующиеся коэффициентом преломления, близким к его значению в окружающей частицы среде. Прибор представляет собой сдвоенный дальнеполевой лазерный микроскоп, в котором

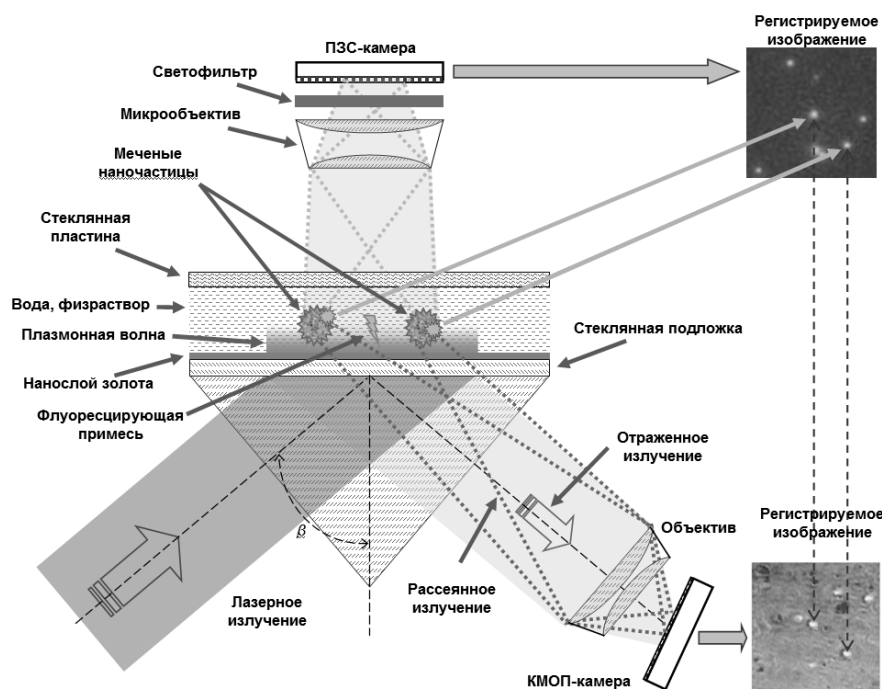


Рис. 1. Оптическая схема сдвоенного микроскопа плазмонного резонанса.

Штриховыми линиями справа показаны для примера случаи совпадения результатов детектирования одних и тех же наночастиц двумя методами

совмещены два разных метода: метод плазмонного резонанса (модифицированная версия, позволяющая реализовать режим регистрации световых сигналов от одиночных наночастиц) и метод флуоресцентной микроскопии. Одновременная регистрация наночастиц двумя существенно различающимися методами, которые характеризуются ошибками разной природы, позволяет значительно повысить реальную достоверность обнаружения детектируемых наночастиц, что, в частности, имеет очень большое значение в медицинской диагностике.

ОПТИЧЕСКАЯ СХЕМА И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ПРИБОРА

Разработанный прибор для оптической визуализации одиночных наночастиц состоит из двух соединенных в единую конструкцию оптических лазерных микроскопов, которые реализуют одновременно два разных метода дальнеполевой микроскопии. Один из них представляет собой модифицированный темнопольный микроскоп поверхностного плазмонного резонанса, а другой — темнопольный флуоресцентный микроскоп с возбуждением наночастиц поверхностной плазмонной волной. Принципиальная оптическая схема созданного прибора приведена на рис. 1.

Микроскоп поверхностного плазмонного резонанса, также как и большинство традиционных микроскопов такого типа, построен по схеме Кречмана. Он состоит из призмы полного внутреннего отражения, на одну из плоскостей которой нанесен нанослой золота. Поверхностная плазмонная эванесцентная волна в этом нанослое возбуждается падающим на одну из граней призмы

лазерным пучком, как показано на рис. 1. В нашем случае, в отличие от традиционной схемы, оптические сигналы, возникающие в результате взаимодействия плазмонной волны с осевшими на поверхность золота наночастицами, регистрируются не со стороны нанослоя золота, который расположен на рис. 1 "сверху", а в противоположном направлении, по которому распространяется отраженный от верхней грани призмы луч возбуждающего лазерного излучения (на рис. 1 это направление "вниз, вправо"). Указанное отличие носит принципиальный характер, т.к. оно позволяет использовать "незанятое" верхнее направление для одновременной регистрации исследуемых наночастиц с помощью расположенного сверху флуоресцентного микроскопа. Этот микроскоп позволяет детектировать наночастицы по свечению флуоресценции, которое может возбуждаться в них либо за счет взаимодействия частиц с эванесцентной плазмонной волной, распространяющейся вдоль поверхности нанослоя золота, либо путем их освещения с применением дополнительного источника излучения, работающего на другой длине волны, чем лазер, возбуждающий плазмонную волну. Если исследуемые наночастицы не флуоресцируют в используемом диапазоне длин волн, их можно метить с применением флуоресцентных меток.

Важной отличительной чертой разработанного микроскопа является то, что при регистрации наночастиц в "плазмонном" канале прибора излучение направляется на нанослой золота не под углом падения, соответствующим точному поверхностному плазмонному резонансу, как это делается в традиционных микроскопах плазмонного резонанса, а при слегка меньшем угле падения (см. рис. 2) [1].

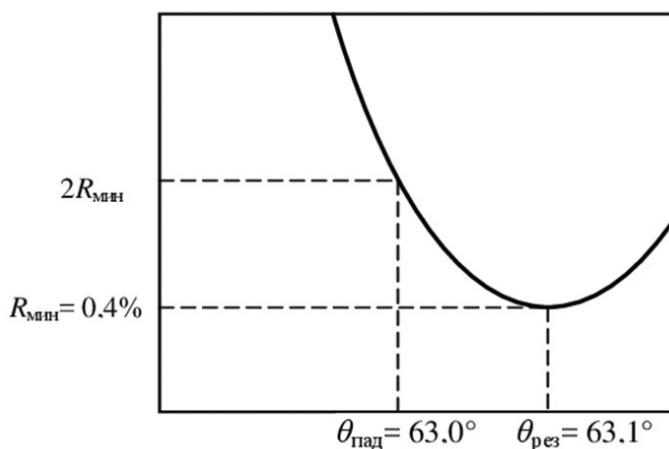


Рис. 2. Значение коэффициента отражения от слоя золота в зависимости от угла падения и величина угла падения лазерного излучения длиной волны 675 нм на нанослой золота, выбранного в проведенных экспериментах

Это позволило существенно повысить отношение сигнала к шуму при детектировании наночастиц, т.к. в таких измерениях указанное отношение определяется изменениями в величине сигнала, вызванного взаимодействием плазмонной волны с наночастицами, а не шумом излучения.

Для возбуждения плазмонной волны использовалось излучение непрерывного диодного лазера с длиной волны 675 нм, мощность излучения варьировалась в пределах 3–8 мВт. Призма изготовлена из стекла SF-10, характеризующегося значением коэффициента преломления 1.725 на выбранной длине волны. Для удобства работы нанослой золота наносился не на призму, а на вспомогательную стеклянную пластинку толщиной 1 мм, изготовленную из того же материала, что и призма. Пластинка устанавливалась на призме с помощью иммерсионной эмульсии, характеризующейся практически тем же значением коэффициента преломления, что и материал призмы ($n = 1.72$). Перед покрытием золотом на пластинку наносился промежуточный сверхтонкий слой титана толщиной 5 нм, и после этого наносился слой золота так, что суммарная толщина слоя титан + золото составляла 45 нм. Применение комбинированного нанослоя из двух металлов позволило увеличить контраст наблюдаемого резонанса. Согласно проведенным измерениям, уменьшение интенсивности отраженного сигнала при отражении от такого слоя в условиях точного резонанса доходило до десятых долей процента. С помощью светосильного фотообъектива (относительное отверстие — 1 : 2, фокусное расстояние — 50 мм) отраженное от нанослоя оптическое излучение и излучение, возникающее при взаимодействии наночастиц с плазмонной волной, фокусировались на приемной площадке КМОП-камеры (КМОП — комплементарная структура металл—оксид—полупроводник; на английском CMOS — complementary metal-oxide-semiconductor) с размерами пикселя 2.2×2.2 мкм и общей площадью (5.7×4.28) мм² (2600×1900 пикселей). Камера работала с частотой от 10 до 20 кадров/с. Использование КМОП-камеры вместо обычно применяемой в высокочувствительных оптических микроскопах ПЗС-камеры связано с тем, что в разработанном приборе предельная чувствительность обнаружения анализируемых наночастиц определяется не шумами камеры, а шумами фоновой засветки. Кроме того, при выборе типа камеры были учтены такие факторы, как большее число пикселей и их меньший размер, а также более высокая скорость считывания сигналов.

Флуоресцентное свечение меток в первых опытах возбуждалось тем же диодным лазером с длиной волны 675 нм, который создавал на измерительной поверхности призмы пятно с суммарной

мощностью не более 5 мВт. Оно собиралось с помощью светосильного иммерсионного микрообъектива ($NA = 1.2$, увеличение $60\times$) и регистрировалось с помощью высокочувствительной охлаждаемой ПЗС-камеры с размерами светочувствительной площадки 8×8 мм, состоящей из 1002×1004 пикселей размерами 8×8 мкм. Возбуждающее излучение подавлялось с помощью набора отрезающих светофильтров, обеспечивающих подавление на уровне до 10^8 .

Измерительная поверхность призмы с покрытой нанослоем золота пластинкой помещена в специально сконструированную проточную кювету с толщиной слоя 1 мм. Через этот объем непрерывно с малой скоростью прокачивалась жидкость, в качестве которой использовалась деионизованная вода или специально приготовленный солевой раствор, а в случае работы с наночастицами биологической природы — физраствор или буферный раствор. Одиночные наночастицы вводились в жидкость после проверки на отсутствие агрегатов. Это достигалось использованием свежеприготовленных образцов в случае липосом и экзосом и предварительной обработкой в ультразвуковой ванне — в случае полистироловых наночастиц. Регистрировались те частицы, которые осаждались на поверхность золотого нанослоя. Контроль на отсутствие или малость числа агрегатов осуществлялся непосредственно перед измерением с применением специального лазерного ультрамикроскопа, который позволял наблюдать и анализировать броуновское движение измеряемых наночастиц и таким образом определять их индивидуальные размеры.

РЕГИСТРАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ С ПОМОЩЬЮ СОЗДАННОГО МИКРОСКОПА

Методики детектирования наночастиц на микроскопе поверхностного плазмонного резонанса отрабатывались в экспериментах по регистрации полистироловых наночастиц дискретного ряда размеров 40, 80 и 300 нм и искусственных липосом, размеры которых находились в пределах 40–100 нм. Отработка методик детектирования на флуоресцентном микроскопе осуществлялась с применением искусственных липосом тех же размеров, что и в предыдущем случае, но меченых флуоресцентными метками на основе молекул красителя Су 5.5. В обоих каналах — как в канале для измерений на основе плазмонного резонанса, так и в канале для флуоресцентных измерений — была достигнута чувствительность, достаточная для уверенной визуализации одиночных наночастиц всех испытанных типов и размеров. Рассмотрим полученные результаты более подробно.

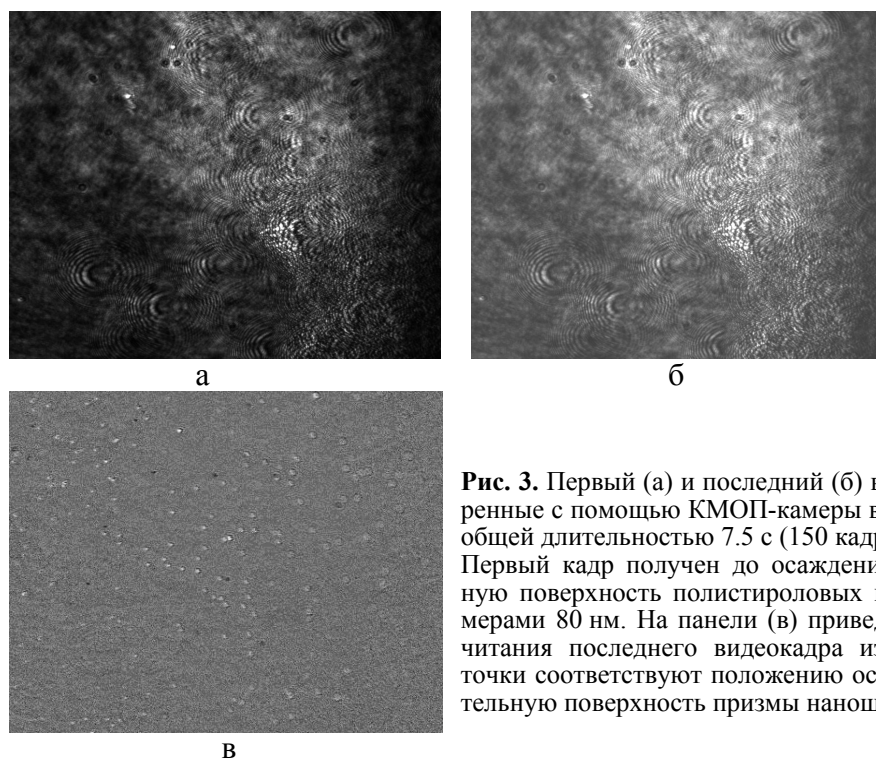


Рис. 3. Первый (а) и последний (б) видеокадры, измеренные с помощью КМОП-камеры в серии измерений общей длительностью 7.5 с (150 кадров). Первый кадр получен до осаждения на измерительную поверхность полистироловых наночастиц размерами 80 нм. На панели (в) приведен результат вычитания последнего видеокадра из первого. Яркие точки соответствуют положению осевших на измерительную поверхность призм наночастиц

Измерения на микроскопе поверхностного плазмонного резонанса

Одной из главных экспериментальных трудностей при измерениях на созданном плазмонном микроскопе является наличие большого числа микро- и нанодфектов на поверхности нанослоя золота, которые определяются качеством нанослоя и которые практически невозможно полностью удалить. Они приводят к нежелательным паразитным сигналам, мешающим детектировать сигналы от исследуемых наночастиц. На рис. 3 приведены результаты измерения сигналов от поверхности золотого нанослоя (видеокадры, зарегистрированные с помощью КМОП-камеры) для двух случаев: при отсутствии на измерительной поверхности исследуемых наночастиц — рис 3, а, и при наличии на поверхности большого числа таких частиц — рис 3, б. В качестве наночастиц в этих измерениях использовались полистироловые наночастицы размерами ~ 80 нм, осаждающиеся на поверхность нанослоя золота из потока протекающей жидкости, в которую они были предварительно введены. Приведены первый и последний кадр в серии измерений общей длительностью 7.5 с (150 кадров). Они свидетельствуют, что из-за наличия высокого уровня нежелательных оптических сигналов полезные сигналы практически не видны.

Для уменьшения влияния дефектов поверхности на результаты измерений программа обработ-

ки регистрируемых видеосигналов построена таким образом, что сигналы от первого кадра, полученные при отсутствии на измеряемой поверхности искомых наночастиц, вычитаются из всех последующих кадров. Если за время между первым и любым последующим кадром на измерительную золотую поверхность осела из протекающей вдоль поверхности жидкости хотя бы одна исследуемая наночастица, сигналы во всех кадрах, измеренных после осаждения частицы, изменятся. Изменения будут наблюдаться для тех точек (пикселей), которые соответствуют положению осевшей на измерительную площадку наночастицы. Таким образом, разностный сигнал, полученный при вычитании первого кадра из всех последующих, содержит информацию об осевших за время измерения наночастицах. Сказанное поясняется рис. 3, в, на котором изображены разностные сигналы, соответствующие тем же двум, что и выше, видеокадрам: первому, измеренному до оседания полистироловых наночастиц, и последнему, содержащему информацию обо всех осевших в ходе измерений наночастицах. Рис. 4 демонстрирует форму видеосигналов, получаемых при детектировании полистироловых наночастиц, и величину регистрируемых при этом шумов.

С использованием указанной процедуры были выполнены эксперименты по регистрации одиночных сферических нанопузырьков (нановезикул), размеры которых находились в пределах

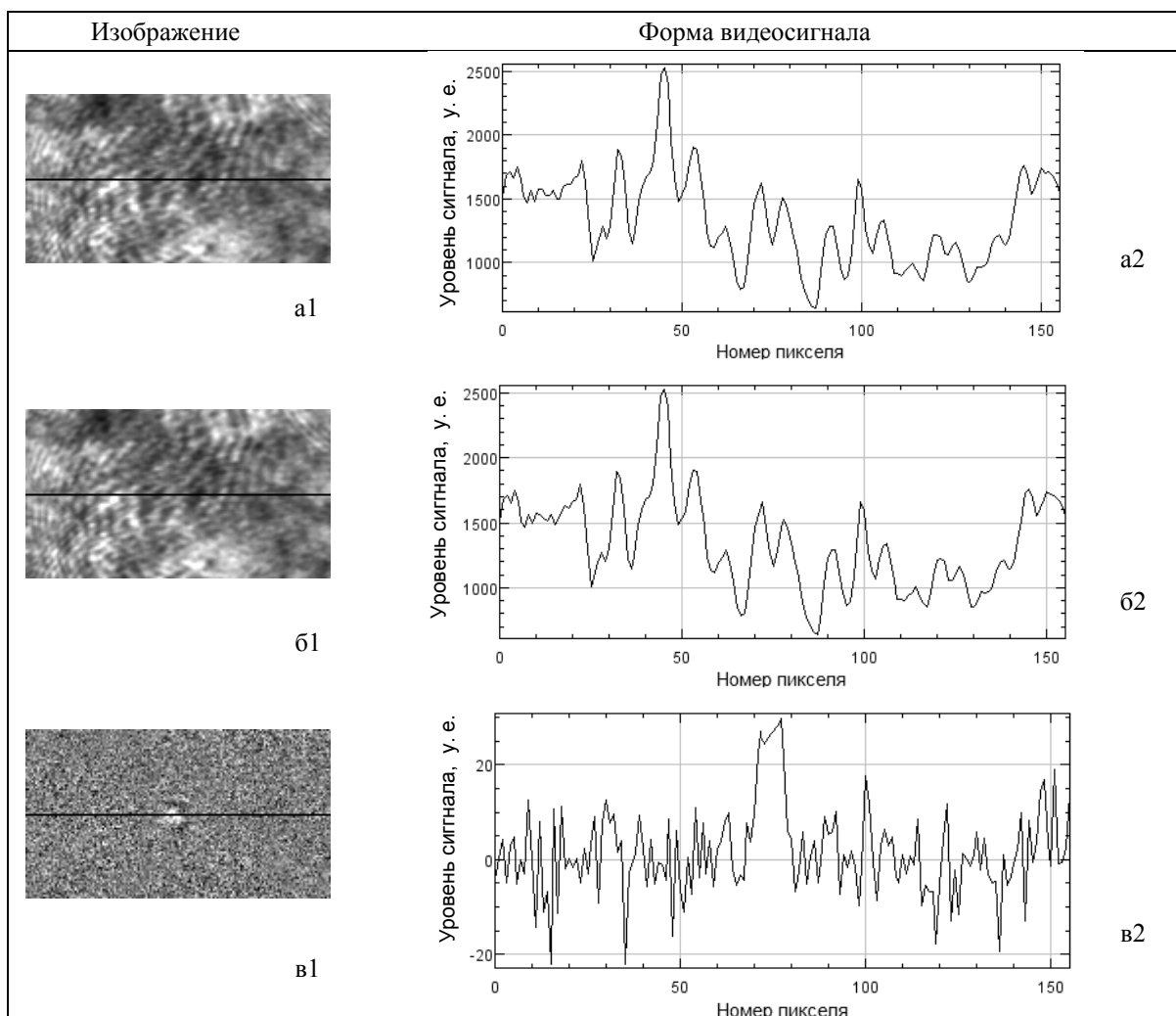


Рис. 4. Пример регистрации полистиролового наночастицы диаметром 80 нм с помощью созданного микроскопа плазмонного резонанса.

a1, б1 — фрагменты двух видеокadres, измеренных соответственно до (рис. 3, а) и после (рис. 3, б) осаждения полистиролового наночастицы на измерительную поверхность; в1 — их разность (рис. 3, в).

a2, б2 — форма сигналов в одинаковой для всех кадров видеостроке, которая помечена горизонтальной черной линией; в2 — их разность.

Демонстрационная строка выбрана проходящей по изображению наночастицы, визуально наблюдаемому на в1; ему на разностном сигнале в2 соответствует пик >20 у. е., что заметно выше уровня шумов в видеосигнале

40–100 нм. В качестве таких нанопузырьков были взяты искусственные липосомы и выделенные из крови человека экзосомы. Липосомы представляют собой наполненные водой нанопузырьки, оболочка которых состоит из одного или нескольких липидных слоев. Экзосомы — это выделяемые клетками в окружающую жидкость нанопузырьки, имеющие гораздо более сложное строение, чем липосомы. Оболочка экзосом (мембрана) состоит из двух липидных слоев, на поверхности и внутри которых имеются белки и углеводы. Внутри экзо-

сом содержится большое количество белков, молекул РНК и липидов. Липосомы в зависимости от их размера и числа липидных слоев, характеризуются коэффициентом преломления в пределах 1.36–1.39 [2], а экзосомы ~ 1.37 [3], что очень близко к значению коэффициента преломления воды (1.33) и физраствора для той же длины волны. Учитывая, что указанные наночастицы практически прозрачны в используемой в данных экспериментах области спектра, указанное обстоятельство делало визуализацию таких частиц

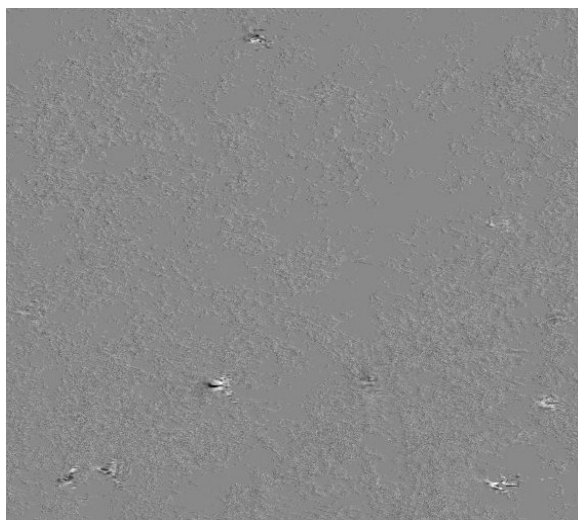
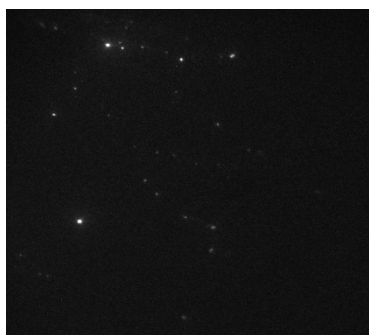


Рис. 5. Пример регистрации изображений единичных экзосом на микроскопе плазмонного резонанса. Поле зрения $\sim 800 \times 800$ мкм



а



б

Рис. 6. Пример регистрации флуоресцентных изображений одиночных экзосом (а) и липосом (б), помеченных флуоресцентными метками красителя Су 5.5. Поле зрения $\sim 300 \times 300$ мкм

сложной задачей. Тем не менее в наших экспериментах нам удавалось наблюдать достаточно достоверно как отдельные липосомы, так и одиночные экзосомы. Пример регистрации изображений одиночных экзосом приведен на рис. 5.

Измерения на флуоресцентном микроскопе

Липосомы и экзосомы, используемые в экспериментах в качестве измеряемых наночастиц, были функционализированы флуоресцентными молекулами цианинового красителя Су 5.5. Специальных мер для того, чтобы липосомы или экзосомы прилипали к поверхности золотой нанопленки не предпринималось. При скорости прокачки водной жидкости через кювету, равной ~ 0.3 мл/мин, на рабочей поверхности призмы размерами 300×300 мкм наблюдалось появление флуоресцентных сигналов от прилипших к измерительной поверхности одиночных наночастиц со скоростью примерно несколько частиц в мин. Чувствительность созданного флуоресцентного микроскопа была достаточна для надежной регистрации практически каждой одиночной наночастицы, меченой молекулами красителя Су 5.5. Примеры регистра-

ции флуоресцентных изображений одиночных липосом и экзосом приведены на рис. 6.

Существенной особенностью меченых флуоресцентными молекулами наночастиц в наших экспериментах был заметный эффект уменьшения интенсивности их флуоресцентного свечения во времени под действием интенсивного возбуждающего лазерного излучения (фотовыжигание). В результате этого эффекта флуоресцентное свечение детектируемых наночастиц практически пропадало за время порядка 1 мин и более после попадания частицы под лазерное излучение. В наших измерениях указанный эффект практически не влиял на их результаты, т. к. сразу после попадания частицы под лазерное излучение, как только она начинала флуоресцировать, ее флуоресцентное изображение детектировалось и запоминалось в памяти компьютера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создан экспериментальный макет сдвоенного оптического дальнеполевого темнопольного мик-

роскопа, реализующий одновременное измерение одних и тех же наночастиц, помещенных в водную среду, двумя разными методами: методом, основанном на модифицированной версии микроскопа поверхностного плазмонного резонанса, и методом флуоресцентной микроскопии.

Достигнута чувствительность, позволяющая визуализировать одиночные, прозрачные в рабочей области наночастицы, характеризующиеся коэффициентом преломления, близким к его значению в окружающей среде, размерами 40 и более нм.

Работа микроскопа продемонстрирована на примере детектирования одиночных полистироловых наносфер диаметром 80 нм, искусственных липосом, а также выделенных из плазмы крови человека внеклеточных везикул (экзосом), размеры которых варьировали в пределах 40–100 нм.

Работа выполнена в ИСАН в рамках НИР "Развитие методов высокочувствительной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения и спектроскопии комбинационного рассеяния для характеристики и изучения точечных нанообъектов и наноструктур".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gurevich E.L., Temchura V.V., Überla K., Zybin A. Analytical features of particle counting sensor based on plasmon assisted microscopy of nano objects // Sensors and Actuators B. Chemical. 2011. Vol. 160, no. 1. P. 1210–1215. DOI: 10.1016/j.snb.2011.09.050

2. Matsuzaki K., Murase O., Sugishita K., Yoneyama S., Akada K., Ueha M., Nakamura A., Kobayashi S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes. 2000. Vol. 1467, no. 1. P. 219–226. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00223-6
3. Pol van der E., Coumans F.A.W., Sturk A., Nieuwland R., Leeuwen van T.G. Refractive index determination of nanoparticles in suspension using nanoparticle tracking analysis // Nano Lett. 2014. Vol. 14, no. 11. P. 6195–6201. DOI: 10.1021/nl503371p

Институт спектроскопии РАН, Москва, Троицк
(Вайнер Ю.Г., Крашенинников В.Н., Зыбин А.В., Вережагин Ф.В.)

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова,
Санкт-Петербург (Малек А.В.)

Контакты: Вайнер Юрий Григорьевич,
vainer@isan.troitsk.ru

Материал поступил в редакцию 28.06.2018

DUAL OPTICAL MICROSCOPE FOR VISUALIZATION OF SINGLE "TRANSPARENT" NANOPARTICLES

Yu. G. Vainer¹, V. N. Krashenninnikov¹, A. V. Zybin¹, A. V. Malek², F. V. Vereschagin¹

¹*Institute for Spectroscopy of RAS, Moscow, Russia*

²*National medical research center of oncology named after N. N. Petrov of the Ministry of healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia*

An experimental setup of a far-field optical microscope intended for simultaneous visualization of single nanoparticles by two different methods is described. The first method is based on a modified version of a surface plasmon resonance microscope, the second on a highly sensitive recording of fluorescent labels inserted into the observed nanoparticles. The created microscope allows visualizing nanoparticles that weakly absorb light in a selected wavelength range and are characterized by a refractive index close to its size in the surrounding liquid (polymeric nanoparticles, viruses, liposomes, intracellular microvesicles in aqueous medium). The combination of the two methods allows to increase the reliability of nanoparticles detection. The optical scheme of the dual microscope and its principle of operation are described, and examples of the registration of nanoparticles are given.

Keywords: optical fluorescence microscopy, dark-field microscope, plasmon resonance microscopy, dual microscope, nanoparticles, liposomes, exosomes

REFERENCES

1. Gurevich E.L., Temchura V.V., Überla K., Zybin A. Analytical features of particle counting sensor based on plasmon assisted microscopy of nano objects. *Sensors and Actuators B. Chemical*, 2011, vol. 160, no. 1, pp. 1210–1215. DOI: 10.1016/j.snb.2011.09.050
2. Matsuzaki K., Murase O., Sugishita K., Yoneyama S., Akada K., Ueha M., Nakamura A., Kobayashi S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes*, 2000, vol. 1467, no. 1. P. 219–226. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00223-6
3. Pol van der E., Coumans F.A.W., Sturk A., Nieuwland R., Leeuwen van T.G. Refractive index determination of nanoparticles in suspension using nanoparticle tracking analysis. *Nano Lett.*, 2014, vol. 14, no. 11, pp. 6195–6201. DOI: 10.1021/nl503371p

Contacts: Vainer Yuriy Grigorievitch,
vainer@isan.troitsk.ru

Article received by the editorial office 28.06.2018