

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ ИММАНУИЛА КАНТА»

---

*На правах рукописи*



**Зюбин Андрей Юрьевич**

**Спектрофлуорометрия и спектроскопия гигантского комбинационного  
рассеяния света в исследованиях биомаркеров социально-значимых  
заболеваний**

Специальность 1.5.2 - Биофизика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
доктора физико-математических наук

Научный консультант:

доктор физико-математических наук  
Лаврова Анастасия Игоревна

2025 год

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР</b> .....	16
1.1 Усиление оптических эффектов рассеяния света и флуоресценции металлическими наночастицами .....	16
1.2 Методы математического моделирования оптических свойств наноструктур .....	26
1.3 Наночастицы благородных металлов: методы получения и области применения .....	28
1.3.1 Физические методы синтеза наночастиц .....	30
1.3.2 Физический синтез наночастиц платины .....	31
1.3.3 Химические методы синтеза наночастиц .....	31
1.4 Зеленый синтез наночастиц родия и платины .....	34
1.5 Синтез наночастиц серебра и золота .....	36
1.6. Применения наночастиц металлов в задачах биофизики .....	40
1.7. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света в исследованиях тромбоцитов и их мембран .....	41
1.8 Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света и ее применение для анализа клеток микобактерий туберкулеза .....	43
1.9 Математические подходы к различению массивов сложных спектральных данных и выделения характеристических колебательных полос .....	46
<b>ГЛАВА 2. МЕТОДИКА И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	62
2.1 Расчет оптических свойств коллоидных и планарных наночастиц .....	62
2.2 Физический синтез сред коллоидных наночастиц золота и структурированных поверхностей .....	65
2.3 Химический синтез сред коллоидных наночастиц золота и структурированных поверхностей, исследование оптических свойств .....	66
2.4 Физический синтез коллоидных наночастиц платины для проведения спектрофлуорометрических исследований .....	72
2.5 Оценка плазмонной генерации планарных и коллоидных оптических сенсоров для исследований клеточных структур. ....	76
2.6 Оптические исследования тромбоцитов .....	82

2.6.1	Спектральные и время-разрешенные флуоресцентные исследования тромбоцитов .....	82
2.6.2	Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света тромбоцитов.....	85
2.7.	Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния бактериальных клеток <i>E.Coli</i> и микобактерий туберкулеза .....	87
2.7.1	Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния бактериальных клеток <i>E.Coli</i> .....	87
2.7.2	Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния бактериальных клеток <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	91
2.8	Подходы на базе машинного обучения и нейросетей для дифференциации массивов спектров тромбоцитов .....	96
2.9	Подходы к DFT моделированию спектральных биомаркеров .....	97
2.10	Математическая обработка массивов спектров данных комбинационного рассеяния света.....	98

### **ГЛАВА 3. СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ**

#### **СПЕКТРОСКОПИИ.....104**

3.1	Спектральная однородность тромбоцитов.....	104
3.2	Спектральные КР исследования здоровых пациентов и пациентов с патологиями ССЗ... ..	115
3.3	Спектральные и время-разрешенные флуоресцентные исследования здоровых пациентов и пациентов с патологиями ССЗ.....	123
3.4.	Применение алгоритмов на базе машинного обучения для анализа спектральных выборок и выявления биомаркеров различий.....	131
3.5.	Углубленное классифицирование и применение нейросетей для анализа спектральных выборок и выявления биомаркеров различий.....	144
3.5.1.	Вторичная классификация здоровых пациентов.....	144
3.5.2	Оптимизация гиперпараметров для здоровых пациентов.....	145
3.5.3	Вторичная классификация больных пациентов.....	146
3.5.4	Оптимизация гиперпараметров для больных пациентов.....	147
3.6	Применение нейросетей в задаче классификации.....	148

### **ГЛАВА 4. СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО И ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В ИССЛЕДОВАНИЯХ ВНУТРИШТАММОВЫХ РАЗЛИЧИЙ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ.....162**

4.1 Исследования воздействия антибиотиков на клетки <i>E.coli</i> .....	162
4.2 Исследования внутриштаммовых различий конгломератов клеток микобактерий туберкулеза различной резистентности штамма <i>Beijing</i> .....	171
4.3 Исследования внутриштаммовых различий одиночных клеток микобактерий туберкулеза различной резистентности штамма <i>Beijing</i> .....	182
4.4 Создание спектральной библиотеки штаммов микобактерий туберкулеза референсных и клинических штаммов.....	191
<b>ГЛАВА 5. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СПЕКТРОВ КОМБИНАЦИОННОГО И ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА ЭЛЕМЕНТОВ РЕЦЕПТОРОВ ТРОМБОЦИТОВ.....</b>	
<b>5.1 Расчет спектров комбинационного рассеяния света элементов рецепторов тромбоцитов при связывании их с лекарственными препаратами.....</b>	<b>195</b>
<b>5.2 Расчет спектров комбинационного рассеяния света для элементов клеточных стенок микобактерий при связывании их с лекарственными препаратами.....</b>	<b>203</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>217</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>218</b>

## Список сокращений и условных обозначений

НЧ	Наночастицы
ПП	поверхностные плазмоны
ПР	плазмонный резонанс
ППП/ SPP	поверхностные плазмоны-поляритоны
ППР	поверхностный плазмонный резонанс
ЛПП	локализованный поверхностный плазмон
ЛППР	локализованный поверхностный плазмонный резонанс
Ag НЧ	серебряные сферические наночастицы
Ag@SiO <sub>2</sub> НЧ	серебряные сферические наночастицы, покрытые кремнезёмной оболочкой
Ag НС	серебряные сфероидальные наночастицы (наностержни)
Ag@SiO <sub>2</sub> НС	серебряные сфероидальные наночастицы (наностержни), покрытые кремнезёмной оболочкой
Au НЧ	золотые сферические наночастицы
Au@SiO <sub>2</sub> НЧ	золотые сферические наночастицы покрытые кремнезёмной оболочкой
Au НС	золотые сфероидальные наночастицы (наностержни)
Au@SiO <sub>2</sub> НС	золотые сфероидальные наночастицы (наностержни) покрытые кремнезёмной оболочкой
Р6Ж/Р6G	флуороновый краситель родамин 6Ж
FRET	Ферстеровский резонансный перенос энергии, индуктивно-резонансный перенос энергии, диполь-дипольный ( <i>d-d</i> ) перенос энергии
МУФ/MEF	металл-усиленная флуоресценция
SET	поверхностного переноса энергии
NSET	нанометаллический перенос поверхностной энергии
PRET	плазмонный резонансный перенос энергии
PIRET	плазмонно-индуцированный резонансный перенос энергии
КР	комбинационное рассеяние света
FDTD	Метод конечной разности во временной области
ГКРС/ГКРС	гигантское комбинационное рассеяние света, <i>Surface Enhanced Raman scattering</i>
ManLAM	липоарабиноманнан, покрытый маннозой

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень её разработанности

В последние десятилетия спектроскопия комбинационного (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) света активно применяется в мировой науке для экспресс-регистрации и безметочного исследования структурных особенностей биомолекул. Такие подходы позволяют исследователям быстро, неинвазивно, с высокой степенью чувствительности и точности, получать спектральную информацию, в том числе от биологических объектов макроскопического масштаба - бактериальных клеток. Методы, основанные на металл-усиленной флуоресценции и колебательной спектроскопии, успешно используются для целей лекарственного мониторинга, анализа раковых клеток, анализа клеточных механизмов. В последнее время ведутся исследования широкого спектра бактериальных клеток, успешно реализуются методики дифференциации различных культур бактерий. Спектроскопия ГКР применяется для анализа бактериальных клеток: *K. pneumonia*, *E. coli*, *S. cohnii*, *Brucella*, *S. typhimurium*, *S. aureus* и других. В последние годы известны попытки применения ГКР-спектроскопии и для исследований и бактериальных клеток микобактерий туберкулеза. В подавляющем большинстве данные исследования направлены на дифференциацию видов туберкулезных бактерий, выявление межвидовых различий штаммов туберкулеза или сравнение туберкулезных и нетуберкулезных штаммов. С другой стороны работы по применению ГКР-спектроскопии проводятся и в сфере сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), которые остаются ведущей причиной смертности на глобальном уровне в течение последних двух десятилетий во всем мире. Общее количество случаев ССЗ удвоилось с 271 млн. в 1990 г. до 523 млн. в 2019 г., а число смертей от ССЗ увеличилось с 12,1 млн. в 1990 г. до 20,5 млн. в 2021 г. Процесс тромбообразования играет важнейшую роль в выявлении, диагностике и лечении ССЗ и является объектом пристального внимания ученых всего мира. Исследование тромбоцитов и их структурных изменений под влиянием внутренних и внешних факторов на сегодняшний день является и остается актуальной задачей. Активация тромбоцитов считается ключевым моментом в патогенезе ССЗ и его осложнений; поэтому ингибирование рецепторов, ответственных за агрегацию тромбоцитов [305], является важнейшей задачей в процессе лечения и профилактики ССЗ. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния и ГКР могут быть очень информативными для исследования молекулярной структуры тромбоцитов, а методы КР, используемые для анализа молекулярных компонентов, таких как аминокислоты, белки, липиды, могут дать представление о структуре тромбоцитов и их спектральном ответе на антитромбоцитарную терапию, которая является ключом к подходам персонализированной медицины.

### Цель и задачи диссертационной работы

Целью работы является выявление биомаркеров социально-значимых заболеваний на основе биофизического анализа клеток человека и патогенов с использованием плазмонных

наноструктур, ГКРС, спектрофлуорометрии и методов машинного обучения.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Применить планарные и коллоидные оптические сенсоры на базе плазмонного резонанса для исследования тромбоцитов, клеток *E.coli*, клеток микобактерий туберкулеза *M.tuberculosis*, выработать оптимальную методологию исследований для получения разрешенных спектров тромбоцитов, бактериальных клеток.

2. Исследовать спектральные характеристики рассеяния клеток методом гигантского комбинационного рассеяния света, при использовании возбуждающего излучения с длинами волн  $\lambda=532$  нм,  $\lambda=632.8$  нм,  $\lambda=785$  нм.

3. Разработать методы выделения наиболее информативных спектральных полос для определения степени антибиотикорезистентности бактерий и определения состояния тромбоцитов для групп спектральных данных, соотносящихся с функциональным состоянием тромбоцитов.

4. Изучить возможность применения многомерных методов статистического анализа (машинное обучение, корреляции) к спектральным данным рассеяния тромбоцитов с низким соотношением сигнал-шум.

5. На основе выделенных биомаркеров изучить сопутствующие изменения и процессы в рецепторах P2Y12 тромбоцитов под воздействием лекарственных средств, а также антибиотикорезистентность клеток *E.coli* и микобактерий туберкулеза.

6. Изучить возможность применения методов квантово-механического DFT моделирования для анализа колебательных спектров компонентов клеток микобактерий, а также тромбоцитов и их рецепторов.

**Научная новизна** исследования заключается в получении новых фундаментальных знаний о биомаркерах, характеризующие молекулярные изменения, связанные с тромбоцитарной агрегацией, состоянием тромбоцита, а также антибиотикорезистентностью микобактерий туберкулеза, включая следующие результаты:

- Впервые было выполнено определение спектральных внутриштаммовых различий клеточной стенки MbT для Beijing spp. с различной степенью лекарственной устойчивости и места локализации, в том числе на единичных клетках, базирующееся на спектральном анализе молекулярных изменений компонентов структуры клеточной стенки микобактерии в результате действия лекарственных препаратов.

- Впервые функциональное состояние тромбоцитов периферической крови было сопоставлено с детальными характеристиками спектров КР и ГКР на основе новых методов, оптимизирующих их регистрацию.

- Потенциальные маркеры антибиотикорезистентности получили новое объяснение на основе детально изученных спектров КР и ГКР рассеяния клеток микобактерий туберкулеза (в том числе одиночных) с различной степенью антибиотикорезистентности.

- Уточнены молекулярно-биологические характеристики выявленных биомаркеров, связанных с антибиотикорезистентностью и механизмами связывания лекарственных препаратов с мишенями.

Данные характеристики были определены на основе интеграции экспериментальных результатов и математического моделирования колебательных спектров комбинационного рассеяния света (КРС) биомолекул, входящих в состав клеточной стенки микобактерий и рецептора тромбоцита.

### **Объект и предмет исследования**

Предметом исследования диссертационной работы являются молекулярные изменения в тромбоцитах человека, взятых от здоровых пациентов и пациентов с ССЗ, а также биохимические маркеры антибиотикорезистентности в микобактериях туберкулеза и клетках *E.coli*. Объектами исследования являются ансамбли клеток и образцы биологических жидкостей человека – тромбоциты, клетки *E.coli*, клетки микобактерий *M.tuberculosis* пекинского штамма с различной степенью антибиотикорезистентности.

### **Методология и методы исследования**

Для расчёта напряженности электрического поля и теоретических значений ГКР вблизи НЧ было применено численное моделирование методом FDTD с применением программного обеспечения ANSYS Lumerical FDTD Solutions. Получение коллоидных золотых металлических НЧ различной геометрии производилось химическим способом. Сферические платиновые и золотые НЧ были получены в работе методом лазерной абляции в жидкости на фемтосекундной лазерной установке TETA-X, AVESTA. Спектры поглощения наночастиц были исследованы на спектрофотометре Shimadzu UV-2600. Размеры синтезированных НЧ были исследованы методом фотонной корреляционной спектроскопии на установках Photocor Complex и Photocor Compact-Z. Для исследования морфологии поверхностей с адсорбированными на них НЧ была применена двулучевая электронно-ионная система сверхвысокого разрешения Cross Beam XB 540. Для регистрации спектров и кинетики флуоресценции комплекса «НЧ-флуорофор/тромбоцит» использовался спектрофлуориметр Fluorolog-3. Для расчёта квантового выхода была использована приставка Quanta-φ F-3029 Integrating Sphere для спектрофлуориметра Fluorolog-3. Исследование клеток микобактерий проводилось на спектрометре Renishaw Virsa, исследование тромбоцитов выполнялось на спектрометре комбинационного рассеяния света Centaur U. Исследование клеток микобактерий выполнялось с использованием спектрометров КРС Renishaw Centerra и Horiba Labram 800. Первичная обработка полученных данных производилась с помощью программного обеспечения Origin Pro и ImageJ. Расчет колебательных спектров аминокислот, метаболитов проводилось в программной среде Gaussian 16 и пакете GaussView методом DFT.

### **Научная новизна**

Научная новизна исследования заключается в получении новых фундаментальных результатов о биомаркерах, характеризующие молекулярные изменения, связанные с тромбоцитарной агрегацией, состоянием тромбоцита, антибиотикорезистентностью микобактерий туберкулеза.

В рамках данной работы впервые получены следующие результаты:

- Выполнен спектральный анализ молекулярных изменений компонентов в структуре клеточной стенки микобактерии в результате действия лекарственных препаратов, выполнено определение спектральных внутриштаммовых различий клеточной стенки *MbT* для *Beijing spp.* различной степени лекарственной устойчивости и места локализации, в том числе на единичных клетках.
- Детально изучены спектры КР и ГКР тромбоцитов периферической крови, разработаны условия для их оптимальной регистрации. Впервые спектры КР и ГКР тромбоцитов будут сопоставлены с функциональным состоянием тромбоцитов.
- Детально изучены спектры КР и ГКР клеток микобактерий туберкулеза (в том числе одиночных) с различной степенью антибиотикорезистентности, определены и объяснены потенциальные маркеры антибиотикорезистентности.
- Выполнено математическое моделирование колебательных КР-спектров биомолекул, составляющих рецептора тромбоцита и частей клеточной стенки микобактерии. По результатам моделирования, были уточнены экспериментальные данные выявленных биомаркеров антибиотикорезистентности и связывания лекарственных препаратов с мишенью.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные экспериментальные и теоретические результаты представляют собой новые подходы к анализу молекулярной структуры рецепторов тромбоцитов, маркеров антибиотикорезистентности клеток *E.coli* и *M.tuberculosis*.

Полученные новые фундаментальные результаты с применением КР- и ГКР-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии (в том числе с временным разрешением) для исследований комплексов НЧ со сложными объектами на примере тромбоцитов, которые могут быть положены в основу разработки оптических сенсоров для целей диагностики состояния клеток крови человека.

Практическая значимость работы также заключается в получении новых результатов, по данным КР спектроскопии о биомаркерах антибиотикорезистентности, определяющих внутриштаммовые различия пекинского штамма микобактерий, а также состояния рецепторов тромбоцитов.

О востребованности результатов свидетельствуют публикации в рецензируемых научных журналах российских и зарубежных издательств. Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись при поддержке следующих проектов: проект государственного задания Минобрнауки "Спектрально-кинетические исследования плазмонного взаимодействия наночастиц металлов с органическими молекулами и квантовыми точками в различных средах", проект ФЦП № 14.575.21.0073 "Исследования и разработки" по теме "Разработка тест-систем для индивидуализации лекарственной терапии острых лимфобластных лейкозов у детей на основе профилирования протеома лимфобластов и генетических детерминант системы детоксикации",

грант для молодых исследователей в рамках программы повышения конкурентоспособности ведущих университетов «Программа 5-100», № 2016-01/5-100 "Исследование механизмов возникновения раннего апоптоза методом конфокальной спектроскопии комбинационного рассеяния", проект базовой части государственного задания № 3.5022.2017/БЧ "Исследование фотофизических процессов с участием молекул органолюминофоров и наночастиц в испаряющейся капле биологической жидкости" (2017-2019), инициативный проект "Исследование штаммов деактивированных *Mycobacterium tuberculosis* оптико-спектральными методами" № 7.52.634.2017, в коллаборации с СПбГУ, НИИ Фтизпульмунологии Минздрава РФ, грант РФФ № 19-72-00004 "Фундаментальные основы создания нового метода экспресс-оценки лекарственной чувствительности бактерий туберкулеза на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния", грант РФФ № 19-15-00132 "Оценка возможности использования спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния тромбоцитов периферической крови для персонализации антиагрегантной терапии сердечно-сосудистых заболеваний", грант Совета по грантам Президента РФ для молодых кандидатов наук № МК-1056.2019.2 "Разработка физических основ создания биосовместимых и биodeградируемых «умных» наноконструкций для антитромбоцитарной терапии", проект по созданию центров математического превосходства НОМЦ «Северо-Западный центр математических исследований имени Софьи Ковалевской» (2021-2024 гг.).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Изменения биохимического состава клеточной мембраны тромбоцитов могут быть установлены на основе спектрального анализа с применением метода гигантского комбинационного рассеяния света на длине волны возбуждения 532 нм по изменениям в установленном наборе линий комбинационного рассеяния света – биохимических маркеров, специфичных для белков, липидов и аминокислот.
2. Биомаркеры метилированных ДНК и РНК, а также резистентности глутатиона и 5-метилцитозина могут служить потенциальными биомаркерами антибиотикорезистентности, идентифицируемыми посредством спектрального анализа с применением метода гигантского комбинационного рассеяния света на длине волны возбуждения 785 нм.
3. Биомолекулярная интерпретация результатов спектральных экспериментальных данных по комбинационному рассеянию света может быть улучшена с применением квантово-механического расчета методом DFT спектров, отражающих связывание элементов рецептора P2Y<sub>12</sub> и фермента COX-1 с тиоловым метаболитом клопидогреля и аспирином соответственно, а составляющих клеточной стенки микобактерии.
4. Биохимические маркеры антибиотикорезистентности, в том числе на уровне одиночных клеток, могут быть установлены методом спектральной дифференциации микобактерий туберкулеза с применением комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света при возбуждении на линиях 532 нм и 785 нм.

5. Диагностика физиологического состояния тромбоцитов может результативно проводиться с использованием классификатора на основе алгоритмов машинного обучения, примененного к массивам спектров комбинационного рассеяния света, полученных для тромбоцитов пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

### **Обоснованность и достоверность результатов работы**

Степень достоверности результатов исследования подтверждается воспроизводимостью полученных экспериментальных и теоретических данных, публикациями в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях, степенью глубокой проработки обозначенных в диссертации проблем.

### **Апробация результатов работы**

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на международных научно-технических конференциях и симпозиумах: SPIE Photonics Europe 2020 (Digital Forum, Страсбург, Франция, 2020), The International Society for Optical Engineering (Ханжоу, Китай, 2019, 2021, 2022, 2023, 2024), IV международный Балтийский морской форум (Калининград, 2016, 2017, 2020), VI Международная молодежная научная школа-конференция, посвященная 75-летию НИЯУ МИФИ и 95-летию академика Н.Г. Басова (Москва, 2017), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2019), XXX Симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2018, 2021, 2022, 2023, 2024), 23-я ежегодная конференция Saratov Fall Meeting SFM (Саратов, 2019, 2021, 2022), XXXI Международная школа-симпозиум по голографии, когерентной оптике и фотонике (Екатеринбург, 2019), 7 Урало-Сибирский семинар «Спектроскопия комбинационного рассеяния света» (Екатеринбург, 2021), XXXII международная школа-симпозиум по голографии, когерентной оптике и фотонике (Санкт-Петербург, 2022).

Автор был отмечен лучшим докладом (1 место) в секции «Физика» (подсекция «Оптика») на Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2019» (Москва, 2019), являлся лауреатом (2 место) секция «Физика и астрономия» III Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего - наука молодых», Лауреат конкурса молодых исследователей "Научная молодость" БФУ им. И. Канта (2017).

### **Публикации**

По результатам исследований в рамках темы диссертации опубликованы 56 исследовательских работ, из них 22 – статей в изданиях, входящих в международные базы данных Web of Science/Scopus, 19 работ опубликованы в сборниках трудов международных и всероссийских научных конференций и симпозиумов. Зарегистрировано 4 патента РФ на изобретение, 11 свидетельств о государственной регистрации программ ЭВМ и баз данных. Список публикаций по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, приведен ниже:

1. **Zyubin A.**, Rafalskiy, V., Lopatin, M., Demishkevich, E., Moiseeva, E., Matveeva, K., Kon I., Khankaev A., Kundalevich A., Butova V., Lipnevich L., Lyatun I., Samusev I. & Bryukhanov, V. Spectral homogeneity of human platelets investigated by SERS //PLOS ONE. – 2022. – T. 17. – №. 5. – C. e0265247. **K1**
2. Kundalevich, A., Kapitonova, A., Berezin, K., **Zyubin, A.**, Moiseeva, E., Rafalskiy, V., & Samusev, I. Raman spectra simulation of antiplatelet drug-platelet interaction using DFT //Scientific Reports. – 2024. – T. 14. – №. 1. – C. 1445. **K1**
3. Matveeva K., **Zyubin A.**, Demishkevich E., Rafalskiy V., Moiseeva E., Kon I., Kundalevich A., Butova V., Samusev, I. Spectral and time-resolved photoluminescence of human platelets doped with platinum nanoparticles //PLOS ONE. – 2021. – T. 16. – №. 9. – C. e0256621. **K1**
4. Matveeva K., **Zyubin A.**, Ognedyuk A., Demishkevich E., Kon I., & Samusev I. Photophysical properties of Au and Au@SiO<sub>2</sub> Nanoparticle-Dye Complexes in Mesoporous Silica Matrices for Theranostics Purposes //Romanian Journal of Physics. – 2021. – T. 66. – №. 7-8. **K1**
5. **Zyubin A.**, Kon, I., Tcibulnikova A., Matveeva K., Khankaev A. Numerical FDTD-based simulations and Raman experiments of femtosecond LIPSS //Optics Express. – 2021. – T. 29. – №. 3. – C. 4547-4558. **K1**
6. **Zyubin A.**, Rafalskiy V., Tcibulnikova A., Moiseeva E., Matveeva K., Tsapkova A., Lyatun I., Medvedskaya P., Samusev I., Demin M. Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment //Laser Physics Letters. – 2020. – T. 17. – №. 4. – C. 045601. **K1**
7. **Zyubin A.**, Rafalskiy V., Tcibulnikova A., Matveeva K., Moiseeva E., Tsapkova A., Samusev I., Bryukhanov V., Demin M. Dataset of human platelets in healthy and individuals with cardiovascular pathology obtained by Surface-enhanced Raman spectroscopy //Data in brief. – 2020. – T. 29. – C. 105145. **K1**
8. Lavrova A. I., **Zyubin A. Y.** Dogonadze, M. Z., Borisov, E. V., Samusev, I., & Postnikov, E. B. Surface-enhanced Raman spectroscopy reveals structure complexity difference in single extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis bacteria with different drug resistance //Results in Physics. – 2023. – T. 44. – C. 106106. **K1**
9. Byuchkova Y. A., **Zyubin A.Y.**, Rafalskiy V.V., Moiseeva E.M., Samusev I.G. Mathematical Analysis of Raman Spectra Data Arrays Using Machine Learning Algorithms //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2023. – T. 9. – №. 2. – C. 020308. **K1**
10. Rafalskiy, V. V., **Zyubin, A. Y.**, Moiseeva, E. M., Kupriyanova, G. S., Mershev, I. G., Kryukova, N. O., Igor I. Kon , Ilya G. Samusev , Yana D. Belousova and Svetlana A. Doktorova Application of vibrational spectroscopy and nuclear magnetic resonance methods for drugs pharmacokinetics research //Drug Metabolism and Personalized Therapy. – 2022. **K1**
11. Kon I., **Zyubin A.**, Samusev I. FDTD Simulations of Shell Scattering in Au@ SiO<sub>2</sub> Core-Shell Nanorods with SERS Activity for sensory purposes //Nanomaterials. – 2022. – T. 12. – №. 22. – C. 4011. **K1**

12. **Zyubin A.**, Lavrova A., Manicheva O., Dogonadze M., Belik V., Samusev I. Raman spectroscopy for glutathione measurements in Mycobacterium tuberculosis strains with different antibiotic resistance //Journal of Raman Spectroscopy. – 2021. – Т. 52. – №. 9. – С. 1661-1666. **K1**
13. Postnikov, E. B., Lebedeva, E. A., **Zyubin, A. Y.**, & Lavrova, A. I. The Cascade Hilbert-Zero Decomposition: A Novel Method for Peaks Resolution and Its Application to Raman Spectra //Mathematics. – 2021. – Т. 9. – №. 21. – С. 2802. **K1**
14. Kon I., **Zyubin A.**, Samusev I. FTDT simulations of local plasmonic fields for theranostic core-shell gold-based nanoparticles //JOSA A. – 2020. – Т. 37. – №. 9. – С. 1398-1403. **K1**
15. **Zyubin A.**, Lavrova, A., Manicheva, O., Dogonadze, M., Belik, V., Demin, M., Samusev, I. The cell-wall structure variation in Mycobacterium tuberculosis with different drug sensitivity using Raman spectroscopy in the high-wavenumber region //Laser Physics Letters. – 2020. – Т. 17. – №. 6. – С. 065602. **K1**
16. Rafalsky, V.V., **Zyubin, A.Yu.**, Moiseeva, E.M., Samusev, I.G. Prospects for Raman spectroscopy in cardiology //Cardiovascular Therapy and Prevention. – 2020. – Т. 19. – №. 1. – С. 70-77. **K1**
17. **Zyubin, A.**, Lavrova, A., Manicheva, O., Dogonadze, M., Belik, V., & Samusev, I. et al. Raman spectroscopy reveals M. tuberculosis strains with different antibiotic susceptibility //Laser Physics Letters. – 2019. – Т. 16. – №. 8. – С. 085602. **K1**
18. **Zyubin, A.**, **Lavrova, A.**, Manicheva, O., Dogonadze, M., & Samusev, I. Dataset of single Mycobacterium tuberculosis bacteria cells with different antibiotic susceptibility obtained by Raman spectroscopy //Data in brief. – 2018. – Т. 21. – С. 2430-2434. **K1**
19. **Zyubin, A. Y.**, Kon, I. I., Poltorabatko, D. A., & Samusev, I. G et al. FDTD simulations for rhodium and platinum nanoparticles for UV plasmonics //Nanomaterials. – 2023. – Т. 13. – №. 5. – С. 897. **K1**
20. Demishkevich, E., **Zyubin, A.**, Seteikin, A., Samusev, I., Park, I., Hwangbo, C. K., ... & Lee, G. J et al. Synthesis Methods and Optical ЛЧ-ТБing Applications of Plasmonic Metal Nanoparticles Made from Rhodium, Platinum, Gold, or Silver //Materials. – 2023. – Т. 16. – №. 9. – С. 3342. **K1**
21. **Zyubin A.**, Lavrova A, Dogonadze M, Borisov E, Postnikov EB. 2025. Single-cell analysis of Mycobacterium tuberculosis with diverse drug resistance using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) PeerJ 13:e18830. **K1**
22. Kundalevich, A., Kapitunova, A., **Zyubin, A.**, & Samusev, I. Raman spectra DFT simulation of M. Tuberculosis cell wall components //Journal of Molecular Structure. – 2025. – Т. 1326. – С. 141051. **K1**

### **Личный вклад автора**

Автором диссертационной работы лично было получено большинство экспериментальных результатов, в том числе в рамках сотрудничества при реализации грантов и научных проектов. Автор принимал непосредственное участие при выдвижении научных гипотез и их проверки, а также получал, обрабатывал, анализировал полученные данные, готовил публикации в

рецензируемых научных изданиях. Экспериментальные исследования проводились на базе научно-образовательного центра «Фундаментальная и прикладная фотоника», ресурсного центра «Оптические и лазерные методы исследования вещества» Санкт-Петербургского государственного университета. В теоретических исследованиях автор анализировал и интерпретировал данные расчетов соавторов статей с точки зрения биофизики. Теоретические исследования проводились на базе лаборатории математического моделирования оптических свойств наноструктур НОМЦ «Северо-Западный математический центр имени Софьи Ковалевской». Подготовка биологических образцов микобактерий осуществлялась соавторами-микробиологами на базе СПб НИИ Фтизиопульмонологии, а тромбоцитов на базе Центра клинических исследований БФУ им. И. Канта.

### **Структура и объём диссертационной работы**

Объём диссертационной работы составляет 248 страниц машинописного текста. Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов и приложений, включая 61 таблиц и 128 рисунков. Библиографический список включает 452 наименований цитируемой литературы.

### **Благодарности**

Искренне благодарю научного консультанта, доктора физико-математических наук, Анастасию Игоревну Лаврову за плодотворное участие в обсуждении задач, поддержку и ценные советы при выполнении диссертационной работы. Благодарю коллег РЦ «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и его руководителя Алексея Викторовича Курочкина за всестороннюю помощь при работе со спектральным оборудованием. Выражаю благодарность коллегам лаборатории экспериментального туберкулеза Минздрава РФ за пробоподготовку бактериальных клеток и совершенствование методик эксперимента. Выражаю благодарность научному руководству БФУ им. И.Канта за постоянную поддержку исследований, без которых достижение обозначенных результатов работы было бы невозможным. Выражаю большую благодарность научному коллективу НОЦ «Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанопотоника» за помощь в подготовке коллоидных наночастиц, структурированных поверхностей, проведении расчетов оптических свойств, математических расчетов спектров. Выражаю благодарность директору центра клинических исследований БФУ, доктору медицинских наук, профессору В.В. Рафальскому и его сотрудникам за интерес к физическим методам исследования вещества, многолетнее плодотворное сотрудничество, чрезвычайно важную возможность направить результаты многолетних фундаментальных разработок в практическое русло. Благодарю доктора физико-математических наук, профессора Курского государственного университета Евгения Борисовича Постникова за ценные советы, критический подход к анализу полученных результатов и весомый вклад в прояснение сущности полученных спектральных данных. Также благодарю научного сотрудника Ивана Игоревича Лятуна и лаборанта-

исследователя Медведскую Полину Николаевну Международного научно-исследовательского центра «Когерентная рентгеновская оптика для установок MegaScience» за помощь в осуществлении экспериментов сканирующей электронной микроскопии наночастиц и поверхностей. Благодарю старшего научного сотрудника НОЦ «Фундаментальная фотоника. Нанопотоника» Цибульникову Анну Владимировну за синтез и анализ морфологических и оптических свойств титановых поверхностей, как структурированных, так и анодированных. Благодарю сотрудников лаборатории математического моделирования оптических свойств наноматериалов Кундалевич Анну Анатольевну, Анастасию Ивановну Капитунову, Кона Игоря Игоревича за помощь в FDTD и DFT расчетах при проверке научных гипотез.

## **ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

Первая глава диссертационной работы представляет литературный обзор, сосредоточенный на биофизических аспектах и применении плазмонного эффекта, индуцированного вблизи металлических наночастиц. Особое внимание уделено роли этого явления в исследовании и моделировании сложных биологических систем. Рассматриваются основные направления контролируемого синтеза и оптические свойства наночастиц, а также их применение для изучения клеточных структур, включая эукариотические клетки и бактерии. Кроме того, обсуждается потенциал данного подхода в решении актуальных медицинских и биофизических задач. Отдельно рассмотрено применение методов на базе машинного обучения для решения подобного вида проблем. Обоснована новизна и актуальность выбранного направления исследований в части прояснения свойств биологических объектов, их молекулярной структуры.

### **1.1 Усиление оптических эффектов рассеяния света и флуоресценции металлическими наночастицами**

Одной из наиболее активно развивающихся областей современной физики является плазмоника, оперирующая колебаниями свободных электронов в металлических наноструктурах. Активно изучаются вопросы взаимодействия таких колебаний с атомами и молекулами для создания и применения оптических сенсоров и наноустройств. Поверхностный плазмон (ПП) представляет собой коллективные колебания свободных электронов на поверхности металла, когда действительная часть функции диэлектрической проницаемости металла отрицательна [1],[2]. В случае, если электромагнитная волна связана с коллективными электронными колебаниями, то индуцируется поверхностная плазмонная волна, распространяющаяся вдоль поверхности металла, а электрическое поле в направлении нормали к поверхности металла является безызлучательным и сильно локализовано на поверхности металла. Важным явлением в плазмонике является сильная пространственная локализация электронных колебаний на частоте плазмонного резонанса (ПР). Такая локализация приводит к значительному увеличению локальных электрических и магнитных полей. Локализованный поверхностный плазмонный резонанс (ЛППР) представляет собой коллективные колебания свободных электронов, подобные колебаниям поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [3],[4]. ЛППР индуцируется при взаимодействии света с металлическими наночастицами (НЧ) с размерами меньше длины волны падающего света, а такое колебание представляет собой стоячую волну электронной плотности, индуцированную вблизи частицы [5-7]. В последнюю декаду плазмонные металлические наночастицы вызывают большой интерес в сфере практических приложений, таких как оптические сенсоры, в частности основанные на эффектах усиления и преобразования оптического излучения. Такие частицы применяются в частности для методов: гигантского комбинационного рассеяния света, металл-усиленной флуоресценции, создания метаповерхностей и управление светом вблизи них, плазмонного катализа, плазмонной гипертермии, плазмонно-усиленной фотогальваники,

плазмонных наночастиц, субволновой плазмонной оптики, тераностики, и биомедицинской визуализации [8-13]. Свойства локализованных поверхностных плазмонов сильно зависят от формы, размера металлических наночастиц, что позволяет настраивать их резонансные частоты для эффективного взаимодействия света с элементарными квантовыми системами, такими как, например, молекулы и квантовые точки. В последние годы настройка ЛППР металлических наночастиц путем изменения их формы и состава была одним из самых надежных и многообещающих способов получения необходимых плазмонных характеристик для сенсорных приложений. Усиленные локальные поля вблизи наночастиц приводят к увеличению интенсивности комбинационного рассеяния до порядков  $10^{14}$ , что позволяет обнаруживать отдельные молекулы [14,15]. Локальные поля, усиленные плазмонами, могут привести к разработке методов определения структуры дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) без присоединения к ним маркеров [16]. Используя плазмонные наночастицы сложной структуры, можно одновременно усиливать как поглощение, так и испускание света и, таким образом, создавать эффективные флуорофоры и наноразмерные источники света [17]. Металлические наноструктуры использовались в приложениях оптического зондирования с плазмонным усилением, таких как гигантское комбинационное рассеяние света (ГКРС), металл-усиленная флуоресценция (MEF) и биомедицинская визуализация [3, 5, 18-20]. В качестве перспективных приложений могут быть рассмотрены фундаментальные и прикладные концепции, приложения оптического зондирования, методы синтеза плазмонных металлических наночастиц из родия (Rh), платины (Pt), золота (Au) и серебра (Ag). При взаимодействии световой волны с металлическими наночастицами оптическое поле модифицируется эффектами плазмонного резонанса, благодаря чему возникает плазмонное усиление вблизи металла. Такие эффекты могут быть объяснены электромагнитной теорией. Наноматериалы объясняются электромагнитной теорией. В длинноволновом пределе, где длина волны ( $\lambda$ ) падающего света намного больше диаметра частицы ( $R$ ), локальное электрическое поле вблизи частицы  $E_{loc}$  определяется выражением:

$$E_{loc}(x, y, z) = E_0 \hat{z} - \alpha E_0 \left[ \frac{\hat{z}}{r^3} + \frac{3z}{r^5} \vec{r} \right], \quad (1)$$

где  $r$  — радиальное расстояние от центра частицы,  $\vec{r} = x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}$  и  $\alpha$  - поляризуемость. Предполагается, что падающий свет является  $p$ -поляризованным  $E_{inc} = E_0 \hat{z}$ . Здесь  $E_0$  — интенсивность падающего электрического поля. Первый член в уравнении (1) — приложенное поле, второе - индуцированное дипольное поле. Поляризуемость описывает искажение электронного облака молекулы внешним электрическим полем и определяется соотношением [21-23]:

$$\alpha = g 4\pi \epsilon_d R^3 \quad (2)$$

где  $g$  определяется как:

$$g = \frac{\epsilon_m - \epsilon_d}{\epsilon_m + 2\epsilon_d} = \frac{(\epsilon_m(R_e) - \epsilon_d) + i\epsilon_m(Im)}{(\epsilon_m(R_e) + 2\epsilon_d) + i\epsilon_m(Im)} \quad (3)$$

Здесь  $\varepsilon_m$  и  $\varepsilon_d$  - диэлектрические проницаемости металлической наночастицы и окружающей диэлектрической среды соответственно.  $\varepsilon_{m(Re)}$  и  $\varepsilon_{m(Im)}$  - действительная и мнимая части комплексной диэлектрической проницаемости ( $\varepsilon_m$ ) наночастицы металла соответственно ( $\varepsilon_m = \varepsilon_{m(Re)} + i\varepsilon_{m(Im)}$ ). Максимальная величина поляризуемости получается, когда действительная часть знаменателя в уравнении (3) стремится к нулю, что соответствует диэлектрической проницаемости металла, действительная часть которой равна  $-2\varepsilon_d$ . Согласно теории рассеяния Ми, сечения рассеяния ( $\sigma_{sca}$ ) и поглощения ( $\sigma_{abs}$ ) сферических металлических наночастиц определяются как [18, 21, 23]:

$$\sigma_{sca} = \frac{8\pi}{3} k^4 R^6 \left[ \frac{\varepsilon_m - \varepsilon_d}{\varepsilon_m - 2\varepsilon_d} \right]^2 \quad (4)$$

$$\sigma_{abs} = 4\pi k R^3 \text{Im} \left( \frac{\varepsilon_m - \varepsilon_d}{\varepsilon_m + 2\varepsilon_d} \right) \quad (5)$$

где  $k = 2\pi/\lambda$ . Эффекты плазмонного резонанса возникают при рассеянии и поглощении при выполнении условия Фр еиха ( $\varepsilon_{m(Re)} = -2\varepsilon_d$ ) выполняется [21]. Этими резонансами обусловлено резонансное возбуждение дипольного поверхностного плазмона. Интенсивность флуоресценции или рамановского рассеяния может быть резко увеличена, если молекулы существуют вблизи металлических наночастиц. Эти явления приводят к ГКРС и MEF. Коэффициент усиления ГКРС ( $G$ ) определяется как [18, 24, 25]:

$$G = |E_{loc}(\omega_{Ex}, r)|^2 |E_{loc}(\omega_R, r)|^2 \quad (6)$$

где  $\omega_{Ex}$  и  $\omega_R$  — частота возбуждения и комбинационного рассеяния света соответственно. Активно  $E_{loc}(\omega_{Ex}, r)$  - локальное электрическое поле возбуждающего света вблизи металлических наночастиц.  $E_{loc}(\omega_R, r)$  - локальное электрическое поле комбинационного рассеяния света вблизи наночастиц. Предполагая небольшой частотный сдвиг между возбуждением и комбинационным рассеянием света ( $\omega_{Ex} \approx \omega_R$ ), эффективность рамановского усиления примерно пропорциональна четвертая степень локального электрического поля, так называемая  $|E|^4$  приближение [18, 24]:

$$G = |E_{loc}(\omega_R, r)|^4 \quad (7)$$

Металл усиленная флуоресценция (МУФ/MEF) возникает, когда флуорофоры и наночастицы металла расположены на нанометровых расстояниях (до 100 нм). MEF представляет собой сложный процесс связывания флуорофоров с металлом наноструктур, который приводит к модификации оптических эффектов ближнего и дальнего поля [26]. MEF также называют поверхностно-усиленной флуоресценцией (ПУФ). Предположим, что нет насыщения в возбужденном состоянии мощность излучения флуоресценции ( $P_{em}$ ) пропорциональна потоку фотонов возбуждения ( $F_{ex}$ ) [27].

$$P_{em} = Q \sigma_{abs} F_{ex} \quad (8)$$

где  $Q$  — квантовый выход флуорофора,  $\sigma_{abs}$  — сечение поглощения флуорофора. В присутствии металлических наночастиц локальный световой поток возбуждения ( $F_{loc}$ ) определяется как  $F_{loc} = (E_{loc}/E_{inc}) F_{ex}$ , где  $E_{loc}$  — локальное электрическое поле вблизи металла наночастицы [27]. Кроме того, излучение флуоресценции может быть усилено модификацией радиационная скорость

распада флуорофора за счет локальной модификации плотности фотонов состояний с повышенной скоростью излучения уменьшало время жизни флуорофора [27]. Интенсивность флуоресценции может быть увеличена до 100 раз за счет плазмонного усиления локального поля. В то же время свечение флуоресценции флуорофоров может тушиться при коротких расстояниях ( $< 5$  нм) от поверхности металла или при прямом контакте с поверхностью металла, где эффект тушения флуоресценции преобладает над эффектом усиления. Существует несколько подходов к описанию таких механизмов усиления флуоресценции и тушения, вблизи металлических наночастиц, однако точный механизм до сих пор неизвестен из-за сложности взаимодействия металл-флуорофор [26, 27]. Основы эффекта металл-усиленной флуоресценции его применения в биофизике были сформулированы и описаны в работах [28-30]. Разработаны подходы к флуоресцентному анализу белков на основе применения металл-усиленной флуоресценции и тушения. В частности, разработаны флуоресцентные метки с повышенным квантовым выходом на основе красителя флуоросцеин изотиоционат, метки для мечения ДНК, методы мультифотонного возбуждения биологических объектов. В качестве отдельного направления, разработаны методы регистрации pH среды на основе применения эффекта металл-усиленной флуоресценции и красителя SNAFL-2.

Традиционно для получения наночастиц используют благородные металлы, такие как Au, Ag и Cu наночастиц. [30, 57-64]. Применение этих наночастиц ограничено видимым и ближним инфракрасным (БИК) диапазонами длин волн. Разнообразие биологических веществ, которые имеют флуоресцентное излучение в УФ-диапазоне требует синтеза соответствующих средств усиления/тушения сигнала. Стоит отметить, что в области глубокого ультрафиолета отсутствует излучение флуоресценции, что позволяет эффективно применять метод УФ-ГКР для биомедицинского зондирования. Последние исследования показали, что Al, Ga, Mg и Rh являются перспективными материалами для УФ плазмоники [65,66]. В настоящее время алюминий активно используется для исследований в УФ и глубоком УФ диапазонах [67]. Алюминий довольно распространен и поэтому дешевле по сравнению с другими металлами. Однако алюминий имеет оксидную пленку, токсичен и чувствителен к температуре окружающей среды и температуре окружающей среды. Используя экспериментальный и теоретический подходы, авторы показали, что образование слоя оксида алюминия привело как к красному смещению, так и к ослаблению резонансных максимумов в наночастицах алюминия различной формы [68,69]. Магний также имеет максимум поглощения в УФ-области, но окисляется гораздо больше, чем алюминий, поэтому на нем сложнее реализовать УФ плазмонные применения. Однако, например, галлий не окисляется, стабилен и в широком температурном диапазоне сохраняет свою стабильность в течение нескольких лет; поэтому его можно использовать для таких исследований [70]. Платина и родий — одни из самых интересных металлов для исследований в области УФ плазмоники. Эти металлы обладают сильным плазмонным откликом в УФ-диапазоне и могут быть использованы для УФ плазмонных приложений [71]. Эти металлы не окисляются, т.е. они практически не имеют оксидной пленки. Родий также обладает преимуществами наличия высокого коэффициента

отражения и высокой химической стабильности. Биологические субстанции, такие как нуклеиновые кислоты, основания ДНК и аминокислоты, имеют полосы поглощения в УФ-области [72]. Тенденция к изучению биологических веществ привела к повышенному научному интересу к области УФ плазмоники [65,73]. Наночастицы металлов способны к индуцированию ЛППР в том числе на острых краях в широком диапазоне длин волн возбуждения. Таким образом, они подходят для создания очень чувствительных биосенсоров с плазмонным усилением. Использование флуоресценции и рамановской амплификации с методами МЭФ и ГКРС позволяет достичь пределов обнаружения на уровне одной молекулы [74,75]. Благодаря этой особенности возможна разработка сверхчувствительных биосенсоров на основе МЭФ и ГКР. В таких методах плазмонные металлические наноструктуры необходимы для усиления оптических сигналов для биологического обнаружения.

В последнее время исследовательский интерес сосредоточился на разработке субстратов ГКРС для решения разнообразных задач. ГКРС — это мощный метод, который увеличивает сигнал комбинационного рассеяния от аналитов на поверхности металла. Такие рамановские колебания молекул, как правило, неинтенсивны. Молекулы вблизи металлических наноразмерных поверхностей могут демонстрировать значительно повышенную интенсивность комбинационного рассеяния света по сравнению с отдельными молекулами. Усиление ГКРС связано с двумя эффектами: (а) электромагнитным эффектом, который связан с огромным увеличением локального электромагнитного поля вблизи поверхности металла [76], и (б) химическим эффектом из-за резонансного переноса заряда между молекулы и поверхность металла [77]. В этом случае химическое усиление связано с увеличением поляризуемости молекулы. RhNP использовались для изучения ГКРС [78]. Метиленовый синий (МС) был выбран для определения коэффициентов амплификации RhNP в эксперименте ГКРС. В качестве субстратов ГКРС использовали родиевые мультиподы [79]. Предыдущие исследования ГКРС на переходных металлах, таких как Rh, не продемонстрировали интенсивного комбинационного усиления [80]. Зетцу и др. сравнили ГКРС-активность подложек пленки RhNP, приготовленных из трех различных нанокристаллов Rh: (1) мультиподов, синтезированных в присутствии Ag, (2) мультиподов, синтезированных на воздухе, и (3) нанокубов [79]. Исследование нанокубов показало, что эти наночастицы с длиной ребра 9 нм имеют пик ППР при 250 нм. Однако в спектрах поглощения мультиподов с длиной плеча 11 нм обнаружены пики ППР при 360 нм (мультиподы, синтезированные на воздухе) и 380 нм (мультиподы, синтезированные в Ag). Было обнаружено, что обе мультиподные пленочные подложки с пленками, модифицированными 4-меркаптопиридином (4-МП), дают более интенсивные спектры КР, в то время как RhNP-подложки, приготовленные из нанокубов, имеют довольно слабый спектр КР [79]. Мультиподы, приготовленные в присутствии Ag, показали наибольшую ГКРС-активность и показали в 19 раз более сильный рамановский сигнал, чем у нанокубов, что указывает на то, что красное смещение пика ППР для мультиподов привело к рамановскому усилению. Авторы предположили, что острые кончики многоножек обеспечивают

дополнительное усиление сигнала ГКРС [79]. Хуньяди Мерф и др. изучали ГКРС 1,4 мМ 4-меркаптофенола (4-mPh) с использованием биметаллических наночастиц Ag–Rh [81]. Спектры ГКР демонстрировали основные пики 4-mPh. КР-пики 4-mPh были обнаружены только в присутствии биметаллических наноструктур Rh-Ag. Сангита и др. исследовали ГКРС красителя MB с использованием RhNPs@DNA с молярными соотношениями 0,08 М, 0,085 М и 0,09 М [82]. В отсутствие RhNPs@ДНК-субстрата спектры комбинационного рассеяния молекулы зонда показали, что только MB с концентрацией  $10^{-3}$  М имеет слабые пики комбинационного рассеяния при  $445\text{ см}^{-1}$ ,  $1391\text{ см}^{-1}$  и  $1620\text{ см}^{-1}$ . В присутствии RhNPs@DNA сигналы ГКРС от MB появлялись при еще более низких концентрациях вплоть до  $10^{-6}$  М. Это доказывало наличие значительного усиления полос КР при  $445\text{ см}^{-1}$ ,  $1391\text{ см}^{-1}$  и  $1620\text{ см}^{-1}$ . 0,08 М RhNPs@DNA демонстрировали максимальное усиление (EF) до  $10^5$  [82]. Такие же данные были получены в исследовании ГКРС группы Kumaravel et al. [83]. Показано, что в ближайшем будущем катализаторы RhNPs@DNA можно будет использовать в других исследованиях, связанных с фотоникой и электроникой. Для исследования МEF-эффекта RhNP-подложки различной плотности были изготовлены методом электронно-лучевого осаждения [84].

Последние исследования в области оптического зондирования на основе RhNP относятся к применению на основе NP ядро-оболочка [85]. Авторы синтезировали наноцветы, включающие в себя ядро Au–оболочка Rh (НЧ Au@Rh), состоящие из сферического ядра AuNP и оболочки, содержащей ответвления Rh. Они использовали такой материал в качестве модельной системы, чтобы исследовать, как возбуждение ЛППР от AuNP может привести к повышению каталитической активности оболочек Rh. Другим перспективным направлением для производства оптических сенсоров является использование наночастиц платины (PtNP). Такие частицы все чаще используются для расширения возможностей современных сенсорных технологий. Исследовано использование наноструктур Pt для реализации метода УФ-МЭП [86]. В присутствии наноструктур Pt гуанозинмонофосфат проявлял более высокую интенсивность флуоресценции (примерно в 20 раз) по сравнению с контрольными образцами на кварцевой подложке. Создан оптический сенсор для определения концентрации кислорода на основе комплекса Pt(II) и покрытых металлом наночастиц SiO<sub>2</sub>, внедренных в золь-гель-матрицу [87]. Характеристики ГКРС изучались с использованием PtNP различной морфологии, полученных методами химического восстановления [88] и физической абляции [89]. Поверхности PtNP для нанесения ГКРС стабилизировали двумя типами укупорочных агентов (ПВС и цитрат) [90]. Краситель родамин 6G использовали для определения эффективности различных PtNP для ГКРС. Спектры ГКР 10 мкМ водных растворов родамина 6G были получены с использованием различных типов PtNP в качестве субстратов ГКР [90]. Усиление комбинационного рассеяния также было продемонстрировано для наночастиц, полученных методами химического восстановления. Защищенные ПВА и непокрытые наночастицы приводили к более слабым эффектам ГКРС с более низким отношением сигнал/шум. Характеристики комбинационного рассеяния PtNP с усилением

щели изучали с использованием 4-аминобензолтиола (4-АБТ), расположенного в промежутке между плоским Ag-субстратом и PtNP размером 20–150 нм [91]. В отсутствие PtNP пики КР 4-АБТ, помещенного на Ag-подложку, не идентифицировались. Однако присоединение PtNP к выступающим аминогруппам привело к возможности обнаружения пиков комбинационного рассеяния аналита. Более высокий сигнал ГКРС был получен в присутствии более крупных PtNP, независимо от длины волны возбуждения. PtNP диаметром 28–105 нм были получены с использованием многостадийного метода выращивания затравки. Были исследованы спектры ГКРС их агрегаций [92]. Полоса поглощения PtNP в пленочном состоянии появлялась при ~330 нм независимо от размера PtNP. Пленка, полученная методом самосборки из более крупных НЧ Pt, имела более высокий коэффициент поглощения. Так, при более коротковолновом возбуждении адсорбатов на пленке Pt, состоящей из НЧ Pt размером 105 нм, наблюдалось более интенсивное комбинационное рассеяние света. Синтез НЧ Pt некоторых форм, в том числе сферы, октаэдра, октапода и тетрапода, осуществляли, варьируя концентрацию  $\text{NaNO}_3$  в сольвотермическом процессе [93].  $\text{NaNO}_3$  играет важную роль в синтезе PtNP различной формы. Эти PtNP были самостоятельно собраны на стеклянных подложках для исследования влияния морфологии частиц на рамановское усиление. В качестве молекулы аналита был выбран 4-меркаптопиридин. Тетраподы Pt продемонстрировали улучшенные свойства ГКРС по сравнению с частицами другой формы. Этот эффект обусловлен усиленным эффектом локального поля вокруг острых углов и краев. УФ-ГКР аденина и СХН исследовали путем синтеза различных наночастиц платины и палладия, а именно наносфер Pt, нанокубов Pt и наночастиц  $\text{Au}@Pt$  или  $\text{Au}@Pd$  с различной толщиной оболочки [94]. Эти исследователи исследовали УФ-ГКРС-активность, зависящую от качества кристаллов. Нанокристаллы высокого качества необходимы для более высокого усиления, но низкокачественные нанокристаллы могут оказаться неэффективными для ГКРС [94]. В одном исследовании описан метод получения структурированных пленок Pt, которые использовались для создания ГКРС-активных субстратов со значительным рамановским усилением из бензолтиола [95]. Структурированные поверхности были однородными, гладкими и стабильными. Преимущество структурированных поверхностей заключается в том, что характеристики подложек ГКРС можно регулировать, изменяя как диаметр сферы шаблона, так и толщину пленки [95]. Кроме того, в некоторых случаях эти поверхности можно использовать повторно после очистки. Четыре различных типа PtNP размером 29, 48, 73 и 107 нм были исследованы в качестве потенциальных субстратов УФ-ГКР для обнаружения меламина [96]. Полосы поглощения всех этих PtNP находятся в УФ-диапазоне (около 200 нм). Лазерный луч с длиной волны 244 нм использовался в качестве возбуждающего света для экспериментов УФ-ГКР. 29-нм PtNP продемонстрировали наибольшую ГКРС-активность. Примерно такое же увеличение интенсивности ГКР демонстрируют PtNP размером 48–73 нм. 107-нм PtNP показали наименьшую ГКРС-активность. Потенциал Pt-наноструктур для приложений ГКРС оценивали с использованием родамина 6G в качестве молекулы-зонда [97]. Практически все моды КР

наблюдались при использовании наноструктуры Pt. Однако кремниевая подложка без наноструктуры Pt не показала какого-либо заметного сигнала комбинационного рассеяния. Самый последний прогресс в области оптического зондирования на основе Pt относится к созданию наночастиц ядро-оболочка и двумерных поверхностей. Фан и др. синтезировали НЧ Au-core, Pt-shell (Ag@Pt) и использовали для плазмонного катализа [98]. Биметаллические нанокатализаторы из двух металлических элементов используются в качестве многообещающего метода для достижения высокой каталитической эффективности, основанной на синергетических эффектах. Панг и др. использовали НЧ Ag@Pt в качестве ферментативного репортера для идентификации микроцистинов.

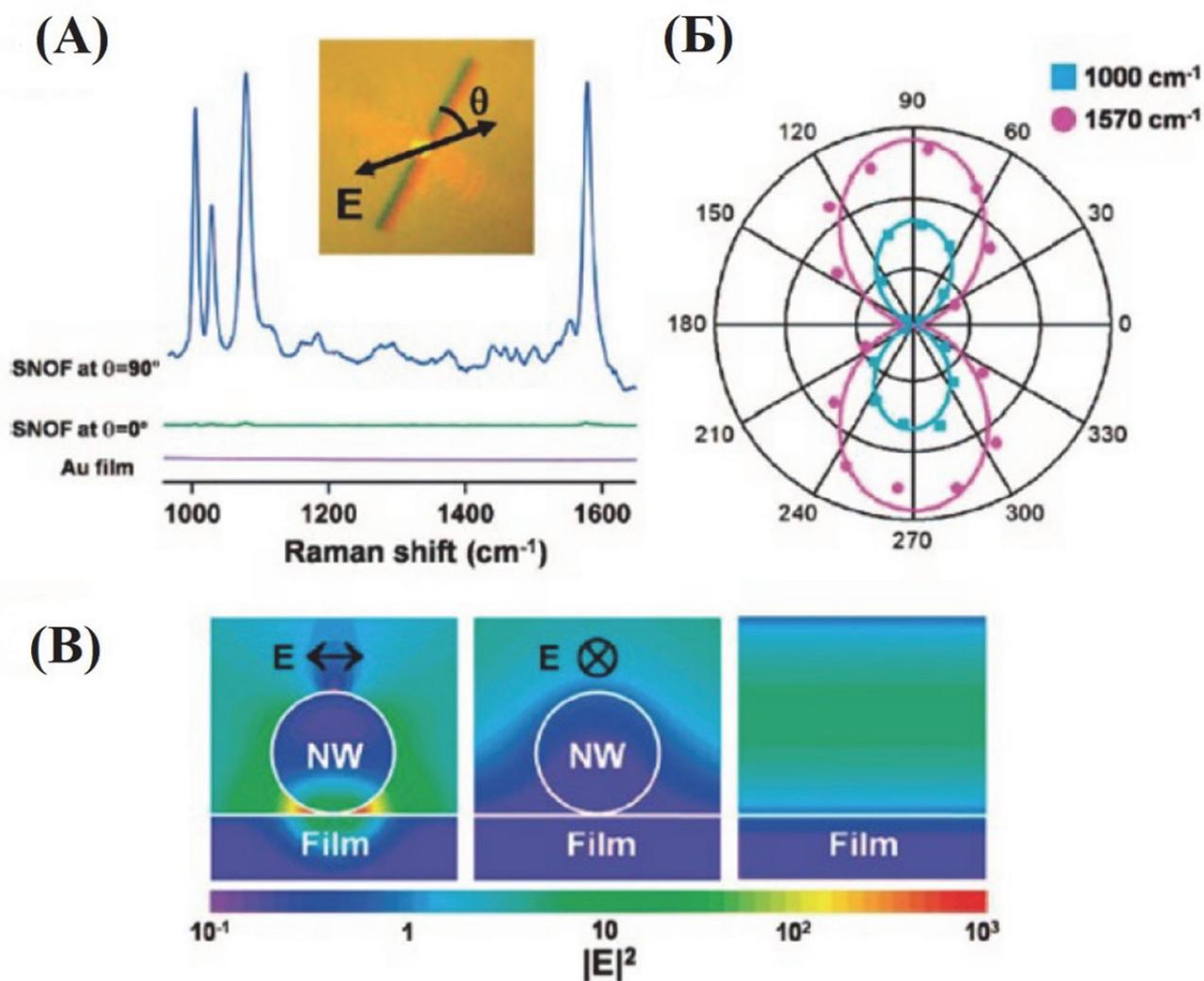


Рис. 1. (а) Поляризационно-зависимые спектры ГРП бензолтиола (БТ) для одиночной золотой нанопроволоки на золотой пленке. Следы с поляризацией возбуждающего света (синий) перпендикулярно и (зеленый) параллельно нанопроволоке были измерены в одном и том же месте на нанопроволоке. Фиолетовый след был измерен для плоской пленки Au в качестве контроля. (б) Полярные графики интегральных интенсивностей полос комбинационного рассеяния света  $1000\text{ см}^{-1}$  (голубой квадрат) и  $1570\text{ см}^{-1}$  (пурпурный кружок) БТ в зависимости от  $\theta$  (угол между поляризацией возбуждающего света и осью нанопроволоки Au) (в). Расчетные распределения

локальной напряженности электрического поля  $|E|^2$  для нанопроволоки Au на пленке Au с поляризацией возбуждающего света (слева) перпендикулярно и (посередине) параллельно оси нанопроволоки и (справа) для гладкой пленки Au [102].

С другой стороны, Юн и др. изучали ГКР бензолтиола (БТ) одиночной золотой нанопроволокой на золотой пленке (Au/Au SNOF) [104]. Золотые нанопроволоки были синтезированы на сапфировой подложке в системе горизонтальной кварцевой трубчатой печи с использованием метода переноса паров. На Рис. 1 представлены поляризационно-зависимые спектры ГКР БТ, адсорбированного на Au/Au SNOF. Сигнал ГКРС регистрировался в зазоре между нанопроволокой Au и пленкой Au, когда на нанопроволоку Au падал перпендикулярно поляризованный возбуждающий свет (синий), но это усиление не наблюдалось под параллельно поляризованным возбуждающим светом (зеленый). В отсутствие нанопроволоки Au или пленки Au рамановские пики БТ не наблюдались. Эти результаты подтверждают, что сигналы рамановского рассеяния были вызваны усилением локального поля из-за ЛППР. Для сравнения экспериментальных результатов с теоретическими ожиданиями авторы рассчитали пространственное распределение интенсивности вблизи нанопроволоки Au с использованием трехмерного метода FDTD. Расчеты FDTD подтверждают, что сигналы ГКРС наблюдались в зазоре между нанопроволокой Au и пленкой Au для возбуждения поперечной плазмонной моды. Ранджан и др. изучали анизотропный ГКР нанопроволок и массивов наночастиц [103]. При возбуждении в продольном плазмонном режиме золотые нанопроволоки ведут себя как объемный металл, в то время как при возбуждении в поперечном плазмонном режиме локальное усиление поля происходит за счет ЛППР. Между тем, для массивов наночастиц более высокая интенсивность ГКРС обнаруживается вдоль цепочки частиц. Интенсивность ГКРС для света, поляризованного вдоль цепочки частиц, намного выше, чем интенсивность для света, поляризованного в перпендикулярном направлении. Группа Nam изучала ГКРС с использованием ДНК-адаптируемых AuNP [104]. Интенсивность ГКРС пропорциональна концентрации зонда, и ГКРС показал предел обнаружения вплоть до концентрации зонда 10 мкМ. Интенсивность комбинационного рассеяния с усилением зазором в тенаощели имела коэффициент усиления выше  $1,0 \times 10^8$ , что было достаточно для однократного обнаружения молекул. В этих исследованиях рамановское усиление объяснялось эффектом плазмонного резонанса нанопроволок Au. В работе сообщалось, что коэффициенты комбинационного усиления были порядка  $10^{14}$ – $10^{15}$  для одной молекулы родамина 6G, адсорбированной на выбранных AgNP [105]. Группа Кнейппа изучала ГКРС в одиночной живой клетке с использованием AuNP [105,106].

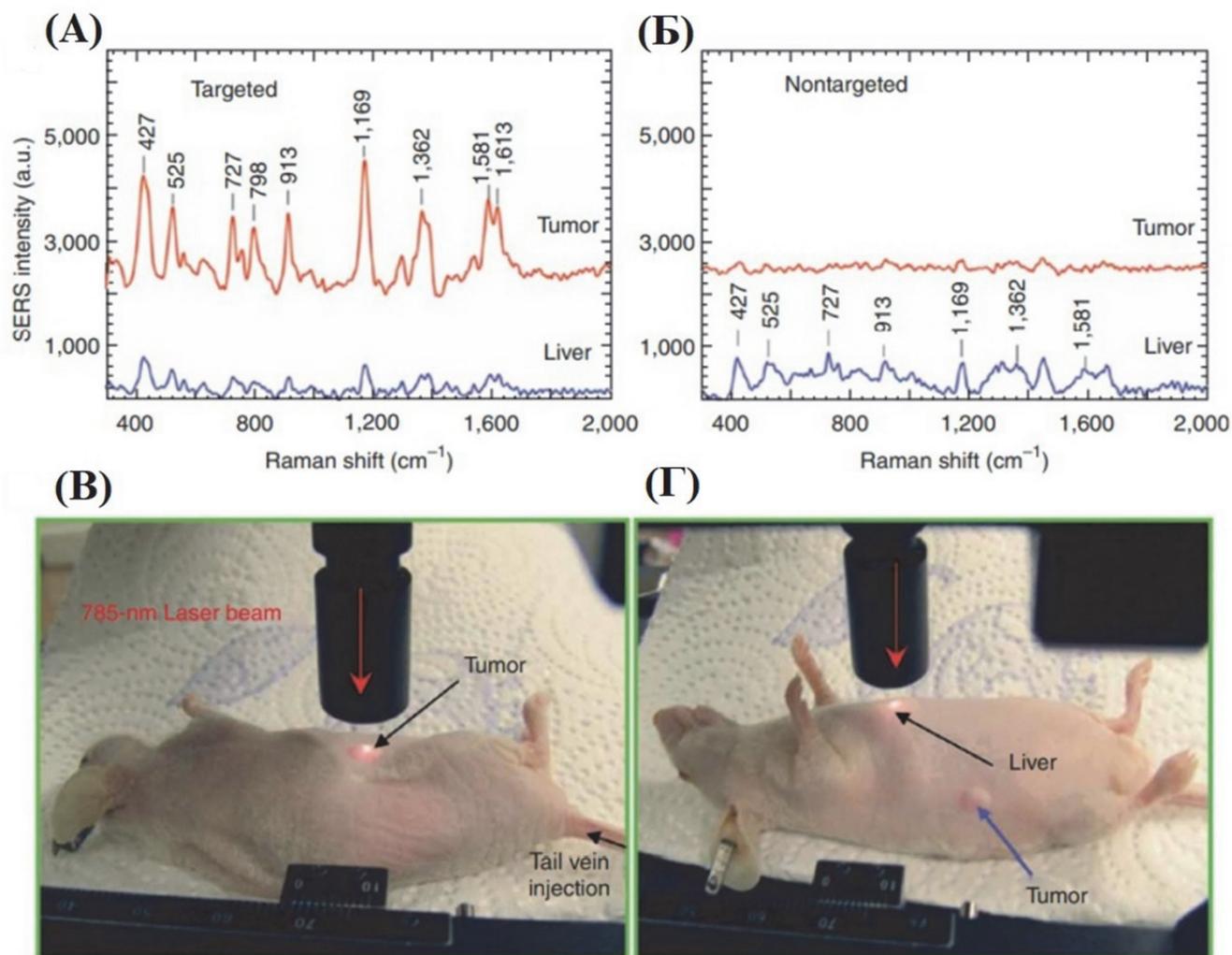


Рис. 2. (а, б) спектры ГКРС опухоли и печени, полученные с использованием (в) адресного (г) прямого сенсинга с использованием наночастиц золота. Фотографии лазерного луча с длиной волны 785 нм, сфокусированного на участках опухоли или на анатомическом расположении печени. Спектры были вычтены из фона и сдвинуты для лучшей визуализации [108].

Активность AuNP, усиленная плазмонами ГКРС, может быть применена для различия нормальных клеток и раковых клеток. Цянь и др. изучали нацеливание на опухоль *in vivo* и обнаружение ГКРС с использованием AuNP, конъюгированных с одноцепочечным варибельным фрагментом (scFv) [108]. Конъюгированные с антителами scFv AuNP могут идентифицировать рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) опухолевых клеток. На рис. 2(а, б) показаны спектры ГКР участка опухоли (красный) и участка печени (синий), полученные с использованием лазера с длиной волны 785 нм в качестве возбуждающего света. Спектры ГКРС получали через 5 ч после введения наночастиц. Мощность возбуждающего света и время интегрирования рамановского сигнала составляли 20 мВт и 2 с соответственно. В качестве активной молекулы был выбран краситель малахитовый зеленый. Сигналы ГКРС в области опухоли были значительно усилены для целевых наночастиц, что указывает на то, что scFv-конъюгированные AuNP были способны обнаруживать EGFR-положительные опухоли *in vivo* [108]. Райченга и др.

продемонстрировали методы синтеза, факторы контроля и приложения для оптического зондирования (ГКРС; SEF; управление светом с помощью плазмонных антенн) AgNP [109]. Он и др. нанесли монослой AgNP на предметное стекло, функционализированное (3-аминопропил)триэтоксисиланом (APTES) [110]. Их эффективность ГКРС была изучена с использованием родамина 6G в качестве целевого аналита. Эти авторы изучали влияние размера AgNP на усиление сигнала ГКРС.

Группа Московича исследовала ГКРС с использованием пучков нанопроволок Ag в качестве эффективной платформы ГКРС [92]. Ни и Эмори изучали обнаружение одиночной молекулы родамина 6G с помощью ГКРС на основе AgNP [111]. Фан и др. изучали обнаружение квазидиночной молекулы с помощью AgNP, самособирающихся на предметном стекле, функционализированном 3-меркаптопропилтриметоксисиланом (MPTMS) [112]. В качестве молекул-зондов использовали нильский синий А и оксазин 720. Гопал и др. оценивали свежесть фруктов и овощей с помощью ГКРС AgNP и AuNP, нанесенных на графеновые нанолиты [113]. Были исследованы фрукты и овощи, такие как восковое яблоко, лимон, помидор, красный перец и морковь. Эти авторы использовали спектроскопию КРС усилением от графена в качестве неразрушающего инструмента для диагностики свежести фруктов и овощей.

Практическое применение наночастиц, индуцирующих эффект плазмонного резонанса изучается достаточно интенсивно. Craig et al. продемонстрировали использование ГКРС в качестве надежного инструмента для различения пищевых патогенных микроорганизмов, включая обнаружение бактерий, спор и вирусов [121]. Синг и др. рассмотрели применение металлических наночастиц в области пищевых технологий, упаковки пищевых продуктов и продовольственной безопасности [96]. Терри и др. описали применение ГКРС в мониторинге загрязнителей окружающей среды [123]. Авторы исследовали методы ГКРС для обнаружения неорганических, органических и биологических загрязнителей, включая тяжелые металлы, пластиковые частицы, красители, фармацевтические препараты, пестициды, вирусы, бактерии и микотоксины. В последнее время появилось много сообщений о плазмонных метаповерхностях, использующих самосборку или произвольные структуры металлических наночастиц [124–127]. Метаповерхности могут управлять распространением света, изменяя его фазу, амплитуду, поляризацию или спектр. Плазмонные метаповерхности могут использоваться в различных приложениях, таких как широкополосный поглотитель/отражатель, металинза, голограмма, наноантенны, фотогальваника, поверхностно-усиленная флуоресценция, ГКРС и биозондирование.

## 1.2 Методы математического моделирования оптических свойств наноструктур

Для различных наноразмерных материалов, таких как наносферы, нанооболочки, наноэллипсоиды, нанокубы и многие другие, существует несколько численных инструментов для расчета и моделирования пространственного распределения локальной напряженности электрического поля вблизи металлической наночастицы. Наиболее распространенным является

метод конечной разности во временной области (FDTD) [31]. Решение уравнений Максвелла с помощью конечно-разностной схемы - аппроксимация во времени и пространстве (как в FDTD) — широко используемый метод при изучении электромагнитных волн и света, распространяющихся в среде. Методы, основанные на FDTD особенно полезны для изучения оптических свойств различных наночастиц [32–35] и имеет перспективы для исследования ближнепольных оптических свойств наноразмерных материалов [36], зондирования [37], плазмонных биосенсоров на основе рефлектометрии [38], решений для повышения эффективности солнечных батарей [39,40] и для ГКРС [41]. Еще один полезный и часто используемый численный метод — это метод конечных элементов (МКЭ), который является численным методом и решает дифференциальные уравнения с частными производными, а также интегральные уравнения, возникающие при решении физических задач. Общеизвестно, что МКЭ более эффективен для электромагнитных проблем со сложными наноструктурами [42,43]. Он использовался для изучения дальнего и ближнего поля оптических свойств металлических наноструктур сложной геометрии [44,45], а также для разработки структуры наночастиц для металл-усиленной флуоресценции [46,47] и SERS [48]. Существуют волноводы в виде структуры металл-изолятор-металл (MIM) для приложений измерения показателя преломления [49], а также биологических приложений, например, используемые в гипертермии [50], фототермической терапии [51,52] и гидролизе [53]. Существует также метод дискретных диполей, где наночастицы металлов рассматриваются как наборы крошечных диполей, для которых рассчитывается их оптическое рассеяние и абсорбционные свойства [54]. Известен и квантово-механический подход, основанный на теории функционала плотности (DFT), который также может быть использован для исследования оптических, оптоэлектронных, каталитических и магнитных свойств наночастиц [55]. Данный подход особенно полезен для изучения электронной структуры металлических наночастиц, которые трудно моделировать с помощью классических методов [55]. В принципе, важно выбрать подходящий метод, учитывая характер проблемы, чтобы подобрать необходимую точность вычислений, которая должна быть достигнута.

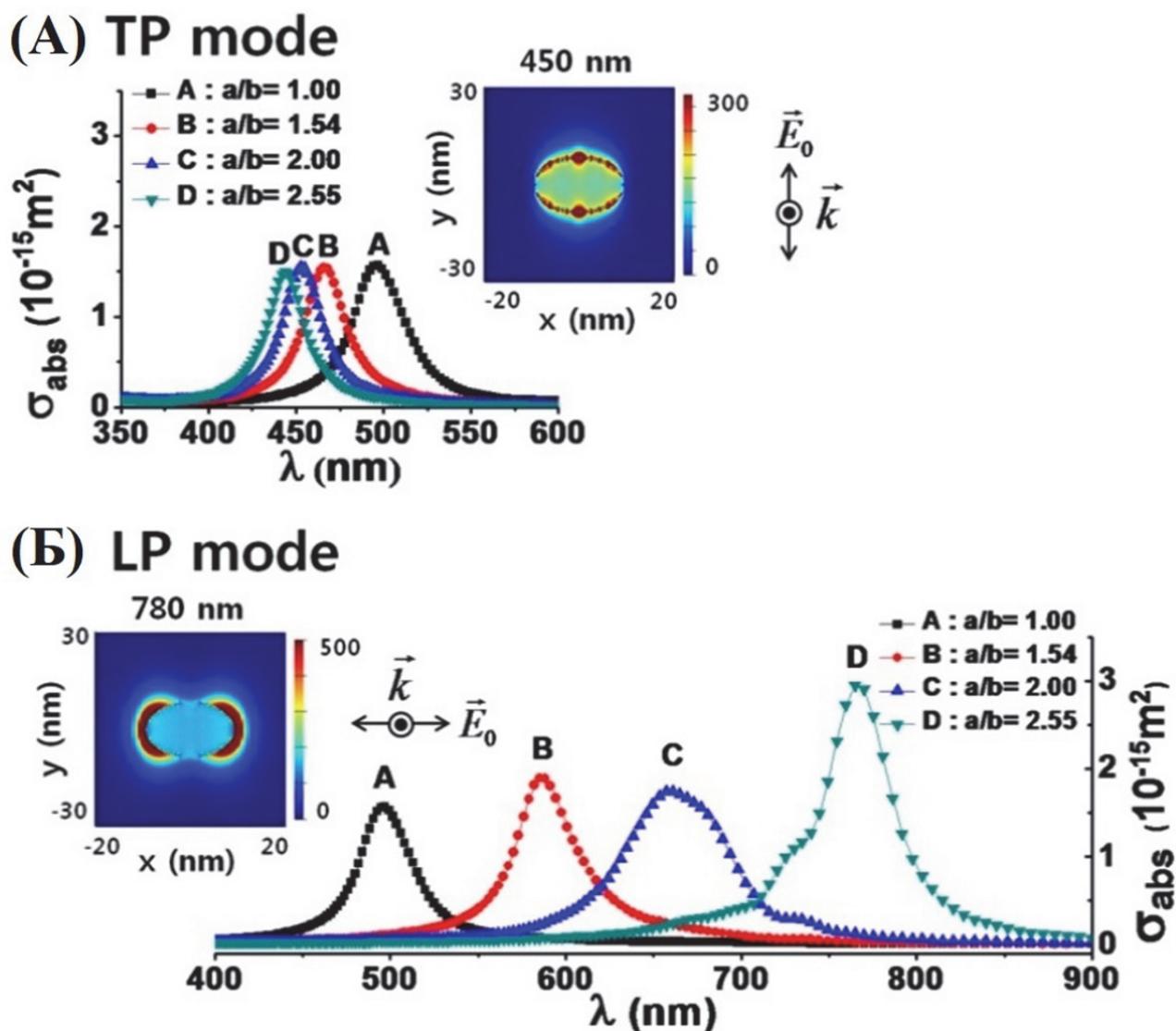


Рис. 3. Спектры поглощения поперечного плазмона (TP) (а) и продольного плазмона (LP) (б) для серебра наноэллипсоида с четырьмя различными соотношениями сторон.. На вставках показано пространственное распределение оптической интенсивности для наноэллипсоида с аспектным отношением 2,55. Объемы четырех разных наноэллипсоиды были эквивалентны наносфере диаметром 15 нм [34]

### 1.3. Наночастицы благородных металлов: методы получения и области применения

Как правило, наноразмерные методы изготовления делятся на две основные категории, т. е. методы «сверху вниз» и «снизу вверх» в соответствии с процессами, связанными с созданием наноразмерных структур. Подход «сверху вниз» создает наноразмерные структуры путем контролируемого удаления материалов из более крупных или объемных твердых тел [128]. Напротив, подходы «снизу вверх» строят молекулярные или атомарные компоненты в наноразмерные сборки, основанные на сложных механизмах и технологиях [128]. Экспериментально металлические наночастицы могут быть изготовлены с помощью химического, физического и зеленого методов синтеза, как видно из Таблицы 1 [129-132]. Физический метод —

это нисходящий подход. С другой стороны, химические и биологические методы используют восходящий подход. Создание металлических наночастиц с контролируемой морфологией привлекает растущий исследовательский интерес, поскольку они обладают технологическим потенциалом в фотонике, сенсорах и биомедицине благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам [133,134].

Таблица 1. Методы синтеза металлических наночастиц

Тип	Вид синтеза
Физический синтез	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Напыление</li> <li>• Электронно-лучевое испарение</li> <li>• Термическое испарение</li> <li>• Радиолиз</li> <li>• Плазменный синтез</li> <li>• Лазерная абляция</li> <li>• Ультразвук</li> <li>• УФ-фотолиз</li> <li>• Лазерный пиролиз</li> <li>• Распылительный пиролиз</li> <li>• Механическое фрезерование</li> <li>• Литография</li> </ul>
Химический синтез	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Химическое восстановление солей металлов</li> <li>• Синтез полиолов</li> <li>• Золь-гель синтез</li> <li>• Метод транспортировки паров</li> <li>• Химическое осаждение из паровой фазы</li> <li>• Плазменное химическое осаждение из паровой фазы</li> <li>• Электрохимический синтез</li> <li>• Фитохимический синтез</li> <li>• Синтез микроэмульсии</li> </ul>
Зеленый синтез	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Синтез с использованием растительных экстрактов <ul style="list-style-type: none"> <li>- Листья, цветы, плоды, корни</li> </ul> </li> <li>• Синтез с участием микроорганизмов <ul style="list-style-type: none"> <li>- Грибы, дрожжи, бактерии, вирусы, актиномицеты</li> </ul> </li> <li>• Синтез на основе водорослей</li> </ul>

### 1.3.1 Физические методы синтеза наночастиц

Для биофизических, биомедицинских и каталитических применений химически синтезированные наночастицы требуют дополнительных процессов очистки с целью удаления избытка поверхностно-активных веществ и остаточные реагенты. В этом случае необходимо использовать альтернативные методы синтеза наночастицы. Интерес вызывает импульсная (фемто и нано) лазерная абляция в жидкости без использования химических реагентов и растворителей, применяемая для изготовления чистых наночастиц благородных металлов для биомедицины и катализ [152]. Лазерная абляция в жидкости применяется для создания металлических наночастиц путем облучения, как правило, металлической пластины лазерным импульсом, при этом такая пластина погружена в воду или водный раствор. Лазерные взаимодействия с веществом и последующая абляция сильно зависят от характеристик лазерного луча (мощности лазера, плотности энергии, длительности импульса и условий лазерной фокусировки), параметров цели (формы, плотности, компактности) и фоновых условий жидкости (температура и pH). Лазерный синтез металлических наночастиц с использованием высокомоощных лазерных источников представляет собой отдельную химическую задачу, а высокая степень чистоты этого процесса делает его перспективным для промышленного производства функциональных наноматериалов [153]. Создание наночастиц с помощью лазерной абляции все еще имеет некоторые проблемы, такие как получение наночастиц определенной морфологии, низкой полидисперсности и низкой продуктивности [154]. В области УФ-плазмоники, наночастицы RhNP были получены путем лазерной абляции Rh-мишени, погруженной в чистую воду (W-Rh-НЧ) или этанол (E-Rh-НЧ) [136]. Коллоидные RhNP были получены согласно типичная процедура жидкостной лазерной абляции. Во время синтеза 1064-нм лазерный пучок с шириной импульса 6 нс и плотностью энергии 7,6 Дж/см<sup>2</sup> был нацелен на объемную пластину Rh, которую погружали в воду или этанол. В обоих случаях наночастицы имели правильную сферическую форму. Средние диаметры RhNP составили 28 ± 14 нм для W-Rh-NP и 14 ± 11 нм для E-517. Rh-NP. Меньший средний размер наблюдался и при лазерной абляции с длиной волны 532 нм [137]. В этом случае наночастицы диспергируются в слое жидкости над мишенью, в результате чего получаются наночастицы меньшего размера, чем те, которые сделаны с использованием импульсов NIR. Кишида и др. продемонстрировали, что монодисперсные оболочечные RhNP были получены гидролизом тетраэтилортосиликата в присутствии RhNP с последующим нагреванием пригодны для целей терапии [138]. В результате были получены микроэмульсии RhNP, покрытые кремнеземом. Такие микроэмульсии включают RhNP размером 4 нм, расположенные в центре частицы кремнезема. Селективные по размеру RhNP были впервые синтезированы с использованием простого пути УФ-облучения способом [59]. Синтез осуществляли взаимодействием соли Rh(III) со щелочным 2,7-дигидрокси-нафталина на ДНК-скаффолдах в течение 5 ч при комнатной температуре и в условиях окружающей среды условия.

### 1.3.2. Физический синтез наночастиц платины

К физическим методам синтеза PtNP относятся шаровая мельница, ионное распыление, физическое осаждение из паровой фазы и лазерная абляция [132,139,140]. Например, сообщалось что слои НЧ Pt толщиной 2,5–3,3 нм формируются поверх кремния, покрытого оксидом алюминия карбидные ( $Al_2O_3@SiC$ ) прямоугольные пластины при нагревании платинохлористоводородной кислоты в муфельной печи при температуре 350°C [141]. Частицы размером 8–9 нм были получены с помощью лазера абляция лазером на неодим-иттрий-алюминиевом гранате (Nd-YAG) [142]. Полидисперсные коллоидные наночастицы Pt разного размера были получены путем абляции Pt-мишени с помощью наносекундного лазера [143]. Другие лазеры (266, 532 и 1064 нм) использовались в эксперименте по абляции, а также использовались несколько стабилизаторов, а именно цитраты и ПВП, Полимеры ПЭГ, ПВС. Лазерная абляция производится в видимом и ИК-диапазоне привела к образованию аморфного PtNP сферы. Распределение этих частиц по диаметру имело максимум в диапазоне 5–10 нм, а также имело плечо, простирающееся до 25 нм. Мелкие кристаллические наночастицы (1–4 нм в диаметре), а более крупные частицы (6–8 нм) получали с помощью лазерной абляции с длиной волны 266 нм, который описан здесь впервые. Мафун и др. синтезировали PtNP методом лазерной абляции металлической пластины Pt в водной среде раствор додецилсульфата натрия (ДСН) [70]. Полученные наночастицы имеют частицу размером 1–7 нм в диаметре. Спектры поглощения PtNP практически не различаются из приготовленных химическим способом. Мафун и др. сообщили, что 6-нм PtNP были полученный с использованием источника излучения с длиной волны 355-нм лазерной абляцией раствора прекурсора Pt при заданной концентрации ДСН [144]. Наночастицы Pt размером 5–20 нм также были получены методом физического осаждения из газовой фазы при 551°C. температура 700°C [145]. PtNP были синтезированы плазменной обработкой Pt проволоки в чистой воде. Плазма-индуцированные электроны и радикалы бомбардировали поверхность Pt, высвобождая атомы Pt, давая высокодисперсные PtNP размером 2 нм [146].

### 1.3.3. Химические методы синтеза наночастиц

Химические методы синтеза наночастиц Rh и Pt основаны на восстановлении из солей металлов. Создание, рост и форма наночастиц регулируются изменением концентрации восстановителя, стабилизатора, pH среды и температуры. Такой метод включает использование солей-предшественников для их восстановления до мономеров металлов. Затем начинается процесс зарождения. Рост наночастиц автоматически прекращается, когда они образуют кластер восстановленных атомов металла. Таким образом, рост контролируется восстановителем. Таким образом, частицы достигают стабильного размера и формы. Для синтеза наночастиц металлов могут быть использованы различные методы химического синтеза. Для синтеза используют

различные составы и условия реакции. Преимуществами химических методов являются экономичность, простота обработки, высокий выход, термическая стабильность контроля размера частиц и гомогенная дисперсия.

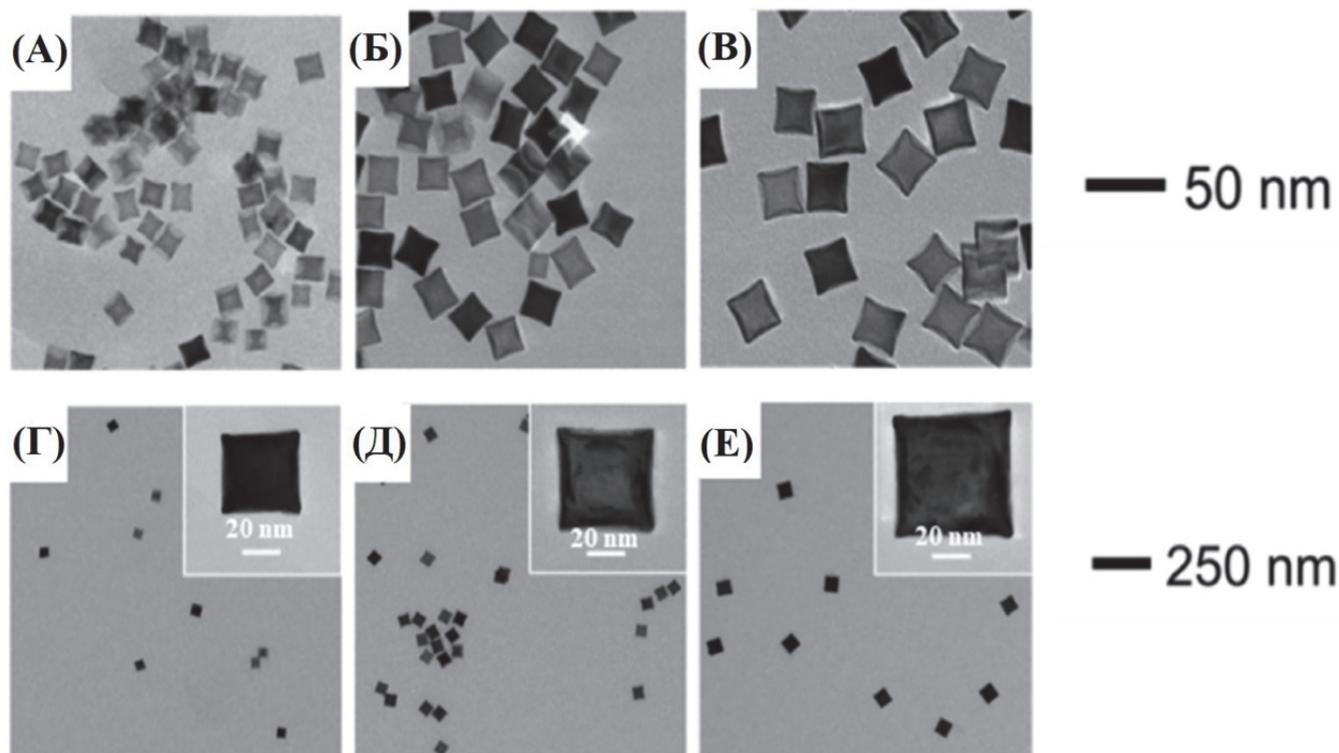


Рис. 4. ПЭМ-изображения наночастиц Rh, полученных методами медленного введения, с соответствующими средними длинами краев (а) 15 нм, (б) 21 нм, (в) 27 нм, (г) 39 нм, (д) 47 нм, и (f) 59 нм [116]

Создавать наноструктуры, наиболее подходящие для конкретных научных задач, можно, изменяя форму и размер наночастиц в процессе синтеза. В одном сообщении были определены методы синтеза RhNP на основе мокрой химии, включая синтетические подходы и специальные средства контроля формы и размера [116] (Рис. 4). Тошима и его коллеги впервые объявили о своем исследовании нанокристаллов Rh в конце 1980-х [117]. Позже был описан полиольный синтез разветвленных нанокристаллов Rh [60]. Нанокристаллы Rh были получены восстановлением  $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в этиленгликоле. Локеш и др. продемонстрировали одностадийный путь синтеза RhNP, где в качестве стабилизатора использовали макроциклический комплекс аминфталоцианина кобальта [118]. Исследования с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показали, что наночастицы имеют сферическую форму со средним диаметром от 3 до 5 нм. В модифицированном полиольном методе RhNP, стабилизированные ПВП, получали восстановлением  $\text{RhCl}_3$  в этиленгликоле при  $160^\circ\text{C}$  с использованием  $\text{AgNO}_3$  [119]. Биметаллические наночастицы Rh–Pt [120] были созданы для контроля каталитического окисления CO. Состав биметаллических наночастиц Rh–Pt изменялся при размере частиц  $\sim 9$  нм. Для контролируемого синтеза использовали  $\text{AgNO}_3$ . Существуют различные типы морфологии

таких наночастиц, включая кубы, октаэдры, кубооктаэдры, тетраэдры и другие правильные и неправильные формы. Морфологию наночастиц можно контролировать при восстановлении  $\text{RhCl}_3$  в этиленгликоле и ПВП. В целом механизмы их зародышевого образования и роста описываются химическим восстановлением солей металлов или химическим разложением комплексов металлов с образованием атомов металлов [121]. Был продемонстрирован метод синтеза икосаэдров Rh размером до  $12,0 \pm 0,8$  нм с использованием  $\text{Rh}_{(\text{acac})_3}$  в качестве прекурсора, ПВП (молекулярная масса  $\approx 40\ 000$ ) в качестве восстановителя и бензилового спирта в качестве коллоидного стабилизатора [122].

Предложен метод синтеза RhNP химическим восстановлением с использованием  $\text{NaBH}_4$  в качестве восстановителя [63]. Полученные RhNPs@DNA имели средний размер частиц  $\sim 5$  нм и использовались для катализа и экспериментов ГКРС. RhNP также можно синтезировать методом медленного введения полиола. Для синтеза монодисперсных нанокубов Rh использовали незатравочный (предварительно синтезированные зародыши Rh не добавляли) и затравочные (предварительно синтезированные зародыши Rh добавляли) методы медленной инъекции [123]. В этом случае раствор KBr в этиленгликоле выдерживали при  $160\ ^\circ\text{C}$ , а затем в него по отдельности вводили растворы  $\text{RhCl}_3$  и ПВП с малой скоростью с помощью двухканального шприцевого насоса. Были получены контролируемые размер нанокуба и длина волны ЛППР в УФ-диапазоне. Наночастицы Rh, Ag и Rh-Ag были изготовлены полиольным методом [62]. Такие наноматериалы были получены путем совместного восстановления предшественников металлов полиолом при повышенной температуре. Тщательный подбор соотношения между реагентами и температуры реакции можно использовать для регулирования размера и морфологии наноматериала. Наночастицы Rh-Ag имеют плазмонную полосу около 410 нм. Она отличается от полосы ППР, ожидаемой от отдельных монометаллических коллоидов. Этот спектральный сдвиг длины волны плазмонного резонанса указывает на то, что полученные наноматериалы являются биметаллическими. Для УФ-плазмоники плоские штативы 8-нм RhNP имели полосу ЛППР около 330 нм при синтезе модифицированным методом восстановления полиолов [124]. При присоединении п-аминотиофенола было обнаружено усиление комбинационного рассеяния света и флуоресценции. Интенсивность флуоресценции увеличивалась за счет переноса заряда. Усиление локального поля и перенос заряда представляют собой важные шаги на пути к применению УФ-плазмоники и фотокатализа. Декаэдрические нанокристаллы Rh были синтезированы с чистотой почти 90% путем систематического регулирования концентрации предшественника металла  $\text{Rh}_{(\text{acac})_3}$ , молекулярной массы и количества поли(винилпирролидона) и длины цепи полиола для благоприятного контроля гомогенный процесс зародышеобразования [125]. Ли и др. описали однореакторный метод, основанный на восстановлении полиолов, для легкого синтеза декаэдрических нанокристаллов Rh высокой чистоты с размерами менее 20 нм [125]. Исследованы также процессы зарождения и роста при синтезе коллоидных металлических наночастиц различной формы [126].

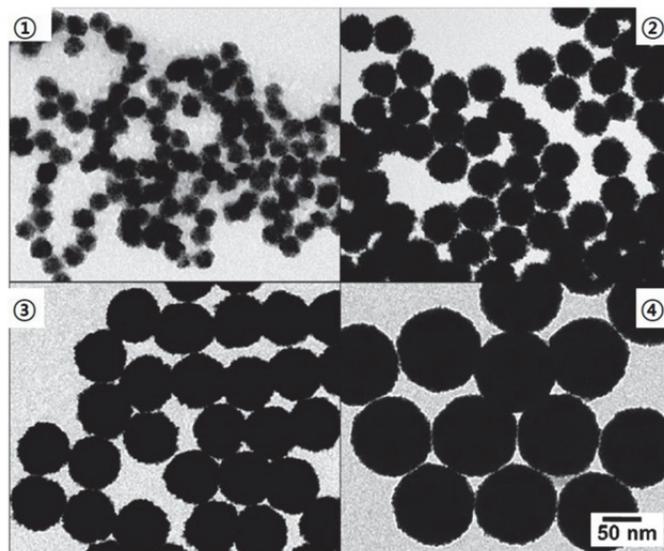


Рис. 5. ПЭМ-изображение монодисперсных наносфер Pt со средним диаметром 29–107 нм и малым стандартным отклонением 3%. (1) 29 нм, (2) 48 нм, (3) 73 нм и (4) 107 нм. [69].

Самый простой способ получения PtNP — постепенное добавление платинохлористоводородной кислоты ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ ) к поли(винилпирролидон)–этиленгликолю (ПВП–ЭГ) при нагревании до  $120^\circ\text{C}$ . Наночастицы размером 3–8 нм получали, регулируя количество прекурсора Pt [127]. Дальнейшие модификации метода позволили контролировать морфологию наночастиц. Так, Koebel et al. получили тетраэдрические и октаэдрические наночастицы в этиленгликоле с использованием ПВП в качестве стабилизатора. Для получения такой формы частиц также использовали нитрат натрия [128]. Был представлен простой метод синтеза монодисперсных Pt-сфер диаметром до 107 нм и чрезвычайно малыми стандартными отклонениями 3% [69] (Рис. 5). Реакция протекает в водном растворе с использованием многостадийного затравочного подхода. Лонг и др. успешно синтезировали PtNP в виде нанокубов и наноктоаэдров с контролируруемыми размерами 5–7 и 8–12 нм соответственно [129]. Усовершенствованный метод полиолов был реализован путем добавления  $\text{AgNO}_3$ , а молярное соотношение растворов  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  было изменено для синтеза PtNP с контролируемой морфологией. PtNP получали нагреванием водного раствора, содержащего  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ , поливиниловый спирт и поливинилацетат [130]. Методом термической обработки получены стабильные защищенные полимером PtNP диаметром 2–7 нм. Здесь поливинилацетат служит как восстановителем, так и защитным агентом. Помимо получения PtNP полиольным методом, применялись также методы синтеза PtNP фазовой конденсацией распыленного атомарного пара в инертном газе [131] и гальваническим вытеснением [132].

#### 1.4. Зеленый синтез наночастиц родия и платины

Синтез биогенных наночастиц вызвал большой интерес из-за их биосовместимости и потенциального применения в сборе энергии, катализаторах, антимикробных агентах, генной терапии и сенсорах. Разнообразные биомолекулы и микроорганизмы использовались в качестве шаблонов для создания наноразмерных материалов. Синтез биогенных наночастиц имеет ряд

преимуществ. Например, этот метод прост, экономичен и снижает химическую нагрузку на окружающую среду [147]. Различные типы микроорганизмов, включая грибы, бактерии и дрожжи, могут восстанавливать соли металлов до наночастиц [113, 147, 148]. В случае зеленого синтеза можно заменить дорогостоящие химические восстановители биомолекулами. Таким образом, наночастицы, синтезированные биологическим методом, дешевле, чем наночастицы, синтезированные физическими и химическими методами (Рис. 6). Липидный бислой, содержащийся во многих биогенных наночастицах, делает такие наночастицы более стабильными и обеспечивает лучшую физическую растворимость. Такие наночастицы больше подходят для биомедицинских приложений. Кроме того, морфологию наночастиц можно регулировать, изменяя различные параметры реакции, такие как pH, доступность субстрата и время реакции [149].

Таким образом, биогенный синтез наночастиц стал экологически чистой, экономичной альтернативой физико-химическим методам синтеза наночастиц металлов. Тамаоки и др. продемонстрировали метод синтеза биогенных наночастиц с использованием водоросли *Shewanella SM1*, которая восстанавливает ионы металлов [150]. RhNP откладывались внутриклеточно в водорослях. Биогенный синтез наночастиц Rh, Ag, Pd, Fe, Ni, Co, Ru, Pt и Li при комнатной температуре проводили с использованием *Pseudomonas aeruginosa SM1* без добавления стабилизаторов наночастиц или контроля pH и температуры [151]. Биологические методы синтеза наночастиц платины включают несколько микроорганизмов, таких как водоросли, грибы, бактерии и актиномицеты. Таким образом, исследователи заинтересованы в синтезе наночастиц на основе растительных экстрактов, которые проще в использовании. Экстракт травы *Fumariae Dobruscka* использовали для получения пентагональной и гексагональной форм PtNP [152]. Синтез проводили при 50° С в течение 4 часов. Наблюдали изменение цвета с желтого на коричневый. Для исследования морфологии наночастиц использовались передовые аналитические методы, такие как ПЭМ, СЭМ, атомно-силовая микроскопия (АСМ) и инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR). Полученные наночастицы представляли собой неправильные стержни размером около 4 нм. Имелись также сгруппированные наночастицы размером около 10 нм. PtNP также были синтезированы с использованием *Azadirachta indica* [153]. Изображения ПЭМ показали образование сферических наночастиц размером 5–50 нм. Экстракты фиников использовали для биогенного синтеза PtNP [154]. Полученные размеры НЧ Pt варьировали от 1,3 до 6 нм, а наночастицы представляли собой однородные небольшие шарики. В качестве восстанавливающих и блокирующих агентов использовали флаванолы. Полученные наночастицы проявляли антибактериальное действие в отношении *E. coli* и *B. subtilis*. Экстракты листьев *Lantana camara L.* использовали для приготовления PtNP [155]. Было определено, что наночастицы имеют сферическую форму и размер 35 нм. Описан также синтез сферических PtNP с использованием экстракта камеди *Prunus yedoensis* [156]. Полученные наночастицы продемонстрировали эффективность против патогенных грибов. Описан синтез PtNP из экстракта листьев *Barleria prionitis* [157]. Экстракт *B. prionitis* использовали для получения монодисперсных

наночастиц размером 1–2 нм. Синтезированные PtNP продемонстрировали ингибирующее действие на клетки рака молочной железы MCF-7. Существует множество научных работ, описывающих синтез наночастиц платины с использованием различных растительных экстрактов, таких как *Cochlospermum gossypium* [158], *Anacardium occidentale* [159], *Diopyros kaki* [160], *Cacumen platycladi* [161] и *Punica granatum* [162]. Несмотря на эти значительные достижения, зеленый синтез PtNP не получил широкого распространения.

### 1.5. Синтез наночастиц серебра и золота

Наночастицы золота (Au) и серебра (Ag) получают с использованием как химических, так и физических методов. К ним относятся термическое испарение [163, 164], пиролиз распылением [165], лазерная абляция [166], цитратное восстановление солей металлов-предшественников [167–169], восстановление этих солей с помощью микроволнового излучения [170], воздействие гамма-излучения [171] и применение плазмы [172–174]. Среди этих методов широко используется метод восстановления цитрата (называемый методом Туркевича) из-за его простоты, высокого выхода, однородной дисперсии и низкой стоимости [167, 168, 174–176, 178]. После восстановления предшественника золота  $\text{HAuCl}_4$  с использованием цитрата при температуре кипения раствор, изначально бесцветный, приобрёл красный оттенок. Это связано с переходом ионов золота в нульвалентное состояние и образованием наночастиц [175–178]. Добавление боргидрида натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) к методу Туркевича может упростить синтез металлических наночастиц за счет исключения процесса нагревания [178–180]. Сеней и др. синтезировали наночастицы серебра путем водного восстановления  $\text{AgNO}_3$  боргидридом натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) и исследовали ГКРС-активность наночастиц серебра с использованием транс-1,2-бис(4-пиридил)этилена (BPE) в качестве рамановской метки [181].

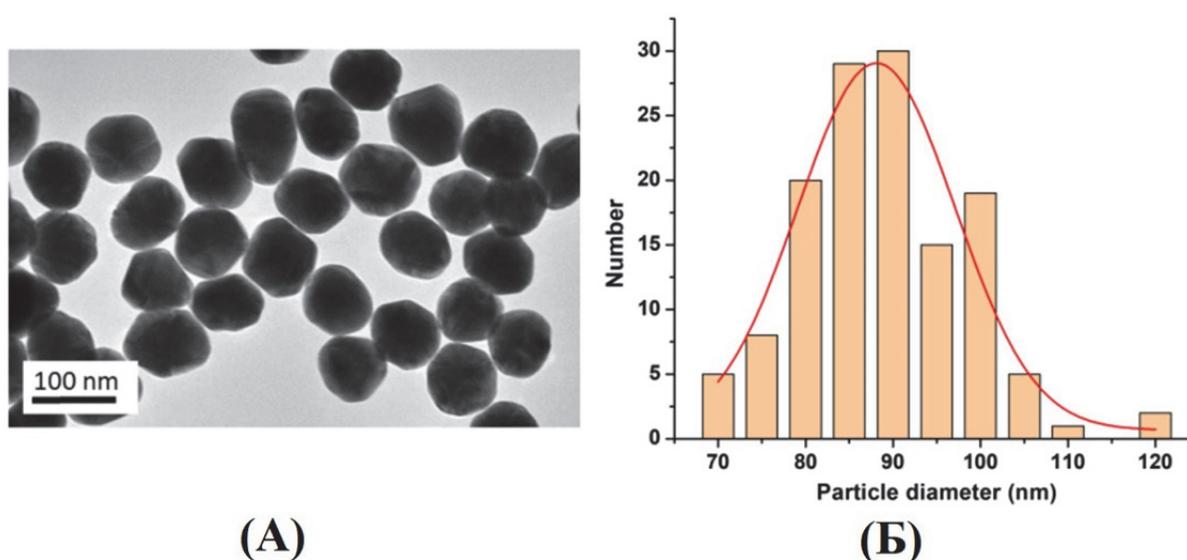


Рис. 6. (а) ПЭМ-изображение и (б) распределение по размерам наночастиц золота, полученных методом восстановления цитрата [177].

Ли и др. продемонстрировали, что AuNP были успешно получены методом восстановления цитрата (рис. 6) [177]. Полученные НЧ Au имели монодисперсную сферическую форму со средним диаметром 89 нм. Эти авторы исследовали ГКРС и хироптические характеристики хирально-ахиральных полимерных смесей, используя эффекты поверхностного плазмонного резонанса наночастиц золота [177].

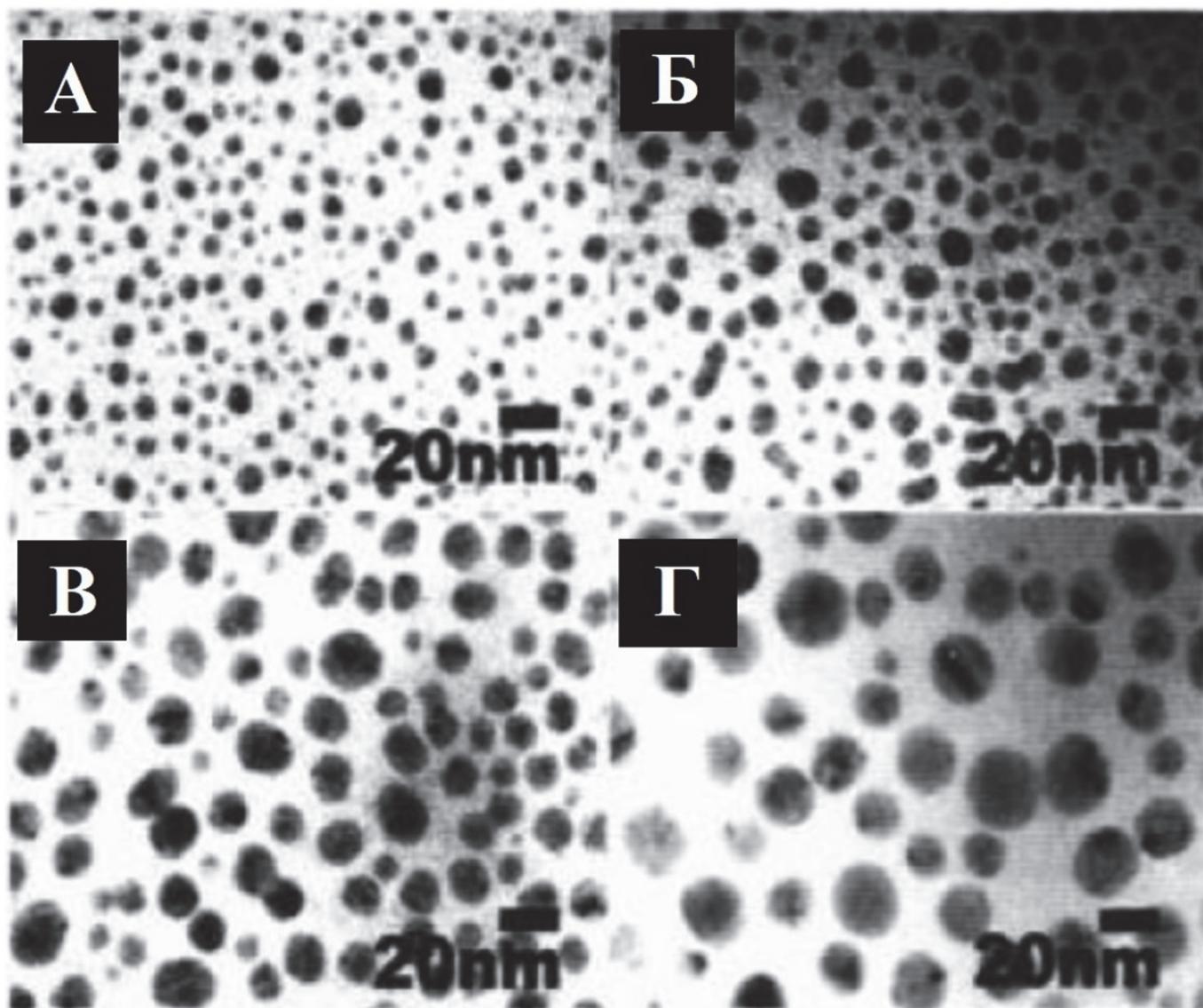


Рис. 7. ПЭМ-изображения наночастиц серебра, полученных путем отверждения образцов PI/Ag/PI: (а) 2,5, (б) 5, (в) 10 и (г) 15 нм пленки Ag [163]

Лим и соавторы описывают получение наночастиц серебра путем размещения тонкой серебряной пленки между двумя слоями прекурсора полиимида (PI) с последующим отверждением структуры PI/Ag/PI при 400°C в течение 1 часа в вакууме (Рис. 7) [163]. У Шунерица и коллег плёнки золотых nanoостровков на подложке из оксида индия и олова были получены методом термического испарения золотых плёнок толщиной 2–6 нм и последующего термического отжига (в течение 12 часов при 150°C или 1 минуты при 500°C) [182]. Эти авторы изучили чувствительность ЛППР золотых nanoостровков к биотинилированному альбумину бычьей сыворотки (биотин-БСА).

Биллот и соавторы получили золотые наноструктуры заданной формы, размера и расположения на стеклянных подложках, используя метод электронно-лучевой литографии (ЭЛЛ) и технологию отрыва [183]. В экспериментах с (4-пиридил)этиленом (ВРЕ) в качестве возбуждающего источника применялась линия 632,8 нм гелий-неонового лазера. Тан и коллеги создали периодические массивы золотых наночастиц с помощью метода центрифугирования полистирольных наносфер, электронно-лучевого осаждения золотых пленок, литографии наносфер и последующего термического отжига [184].

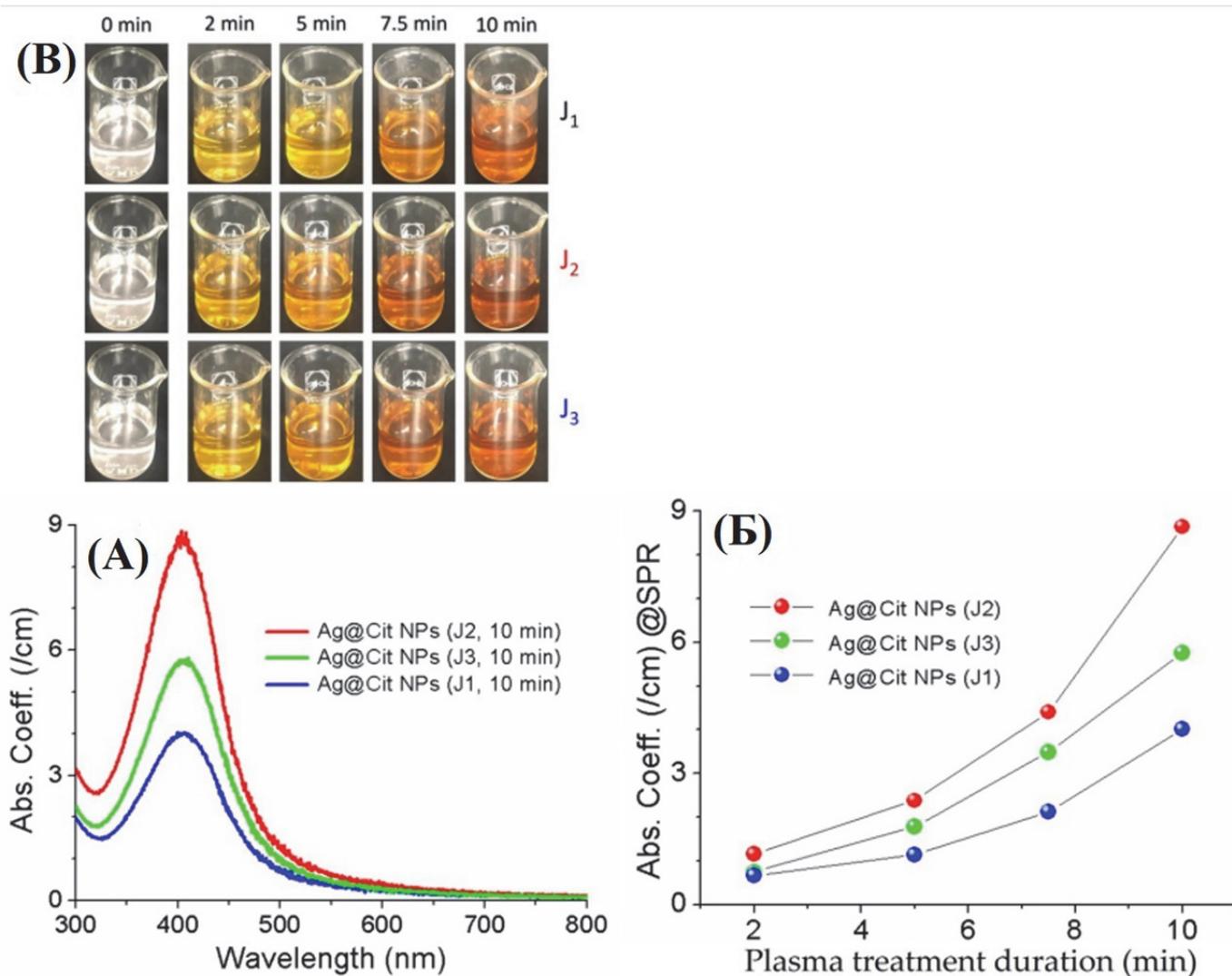


Рис. 8. (а) Спектры поглощения растворов наночастиц серебра, полученных при обработке  $\text{AgNO}_3$ -TSC-DW струями J1, J2 и J3. (б) Пиковая интенсивность ППР растворов наночастиц серебра в зависимости от продолжительности плазменной обработки. (в) Изменение окраски растворов наночастиц серебра в течение времени обработки плазмой до 10 минут [187]

Микроволны [170], гамма-лучи [171], импульсные лазеры [185] и плазма [172–174] использовались для физического синтеза металлических наночастиц, поскольку они могут работать с небольшим количеством химикатов и более коротким временем обработки по

сравнению с химическим синтезом. Плазменный синтез наночастиц металлов относительно прост, недорог и эффективен. В частности, плазменные струи атмосферного давления (ПСАД) вызвали большой интерес как многообещающий метод синтеза металлических наноматериалов [172, 186]. ПСАД могут синтезировать наночастицы металлов за более короткое время обработки. На рис. 8(а) представлены спектры поглощения растворов AgNP, образующихся в ПСАД с длинами плазменного факела 2,5, 8,5 и 12,5 см [187]. Создание наночастиц серебра было подтверждено изменением цвета с бесцветного на темно-желтый (рис. 8(с)). Большее количество наночастиц серебра было получено при большей продолжительности плазменной обработки. При продолжительности плазменной обработки 10 мин коэффициенты поглощения наночастиц серебра в пиках ППП составили 4,0/см, 8,6/см и 5,8/см для струй J1, J2 и J3 соответственно (рис. 8(б)). Николов и др. создали наночастицы Ag и Au путем импульсной лазерной абляции мишеней Ag и Au, погруженных в бидистиллированную воду [185]. Мишени облучали в течение 20 мин лазерными импульсами длительностью 15 нс на основной ( $\lambda = 1064$  нм) и второй гармонике (ВВГ) ( $\lambda = 532$  нм) Nd–YAG-лазера. Инь и др. синтезировали крупномасштабные и регулируемые по размеру наночастицы серебра путем обработки водного раствора нитрата серебра и цитрата натрия микроволнами [170]. В качестве стабилизатора и восстановителя использовался формальдегид. Эйса и др. получены нанокомпозиты поливиниловый спирт (ПВС)/серебро путем восстановления ионов серебра гамма-облучением [171]. Эти авторы сообщили, что монодисперсные наночастицы серебра гомогенно встроены в матрицу ПВС, и полученные наночастицы имеют однородную форму и очень узкое распределение по размерам со средним размером 17 нм.

Было описано применение оптического зондирования наночастиц Rh и Pt с помощью УФ-плазмоники, такой как УФ-МЭФ и УФ-ГКРС. Наночастицы Au и Ag вызвали большой интерес из-за различных приложений, таких как оптические датчики, химические датчики, биосенсоры, мониторинг безопасности пищевых продуктов и здоровья, обнаружение патогенов, диагностика рака и биомедицина. Эти наночастицы являются наиболее чувствительными для обнаружения широкого спектра аналитов из ионов, биомолекул, макромолекул и микроорганизмов. Они обеспечивают многообещающую платформу для высокочувствительного обнаружения анализируемых материалов и раковых клеток. Оптические и биосенсорные приложения основаны на плазмонном усилении локальных электрических полей вблизи металлических наночастиц. Сильная пространственная локализация электронных колебаний на частоте плазмонного резонанса приводит к огромному увеличению локального электрического поля. Плазмонное усиление вблизи металлических наноматериалов объясняется электромагнитной теорией и подтверждается расчетами FDTD. Несмотря на множество значительных достижений в области синтеза и применения плазмонных наночастиц металлов, в методах синтеза и применениях металлических наночастиц для оптического зондирования все еще существует много сложных проблем. По сравнению с полупроводниковыми наночастицами плазмонные металлические наночастицы

имеют преимущества и ограничения [188]. Преимуществами металлических наночастиц являются их высокая чувствительность, простота процесса изготовления, регулируемая форма и регулируемый размер.

### **1.6. Применение наночастиц металлов в задачах биофизики**

Наночастицы на основе золота и других металлов привлекают все большее внимание исследователей из-за возможности функционализации поверхности, отличной специфичности к опухолям, высокой способности загружать лекарства и их биосовместимости [89,189]. Наночастицы платины и родия перспективны для применения в ГКРС в области глубокого УФ, терапии, диагностике [190,191]. Плазмонные наночастицы используются для обнаружения отдельных молекул и отдельных клеток [87,192]. Плазмонные наночастицы могут быть чрезвычайно полезны для обнаружения патогенов [95, 193] и внутриклеточных компонентов [194]. ГКРС-зондирование на основе металлических наночастиц широко используется в мониторинге загрязнения окружающей среды [97]. Другой сложной и не менее интересной, разрабатываемой в настоящее время проблемой является использование металлических наночастиц в качестве наноносителей для систем доставки лекарств [195]. Разработка частиц для тераностики является перспективным но сложным направлением и включает в себя в том числе методы плазмонного резонанса и колебательной спектроскопии [419]. Такие частицы широко используются для исследований в онкологии [423-429]. Ученые создают наноконструкции на основе таких частиц, позволяющие реализовывать несколько функций одновременно. Известны работы [430] по инкапсуляции доксирубина на поверхность таких наночастиц и контролируемое их высвобождение. При синтезе таких частиц особое внимание уделяется их оптическим [206,431-433] и морфологическим свойствам [94]. Контролируемый синтез золотых ядер тераностических НЧ сферической формы в настоящее время осуществляется по методу Туркевича (для частиц более размером более 20 нм) и Броста (для частиц размером менее 10 нм) [434; 435], наностержней – методом зародышевой кристаллизации с контролем отношения размеров путем варьирования концентрации прекурсора [436], нанокубов – методом полиольного синтеза с последующей фильтрацией [437]. Нанокубы могут быть синтезированы с последующим созданием пустот для инкапсуляции лекарственного средства. Функционализация наноконструкции (НК) олигонуклеотидами, пептидами, белками, липидами используется для реализации «умного» прикрепления НК к мишени и повышения эффективности терапевтического эффекта [438]. Поверхность частицы функционализуется биологическими и химическими молекулами с помощью ковалентной [439; 440] и нековалентной привязок [441]. Исследователями на данном этапе вырабатывается дизайн частицы, в зависимости, определяются его составляющие (оболочки, инкапсулируемое лекарственное средство, элементы для функционализации). Самые последние достижения в тераностике для целей основаны на реализации «умных» НК в реальном времени для выполнения сенсорных, терапевтических, диагностических функций [442; 443]. Исследования

направлены на разработку новых и совершенствование уже имеющихся методов инкапсуляции, доставки лекарственных препаратов, а также разработку методик избирательного связывания НК с мишенью [444], адресной доставки, биовизуализации [445-447]. Однако авторы проекта не обнаружили работ по созданию комплексов для одновременного усиления действия ФДТ-эффекта, спектрального зондирования и доставки экстракта в клетку. Данные разделы обзора были опубликованы в статьях [410-411,418,414].

### **1.7. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света в исследованиях тромбоцитов и их мембран**

В основе патогенеза многих сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) лежит атеротромбоз, представляющий собой адгезию и агрегацию тромбоцитов на месте нестабильной атеросклеротической бляшки с внутрисосудистым тромбом и нередко вызывающий фатальные осложнения [196]. Активация тромбоцитов является ключевым моментом в патогенезе сердечно-сосудистых осложнений; поэтому наиболее полное подавление функций тромбоцитов является важнейшей задачей в лечении и профилактике осложнений. Ингибирование агрегации тромбоцитов в настоящее время является ключевым терапевтическим подходом в лечении и профилактике ССЗ атеросклеротического генеза. Крайне важно, чтобы антитромбоцитарные эффекты были не только мощными, но и работали в течение достаточно длительного времени [197]. В последнее время все больше внимания уделяется вопросу варибельности ответа на антиагрегантную терапию [198, 199]. Высокая реактивность тромбоцитов увеличивает риск коронарных и цереброваскулярных ишемических событий [200]. В настоящее время исследователи ищут новые методы, позволяющие оценить функцию тромбоцитов и эффективность антитромбоцитарной терапии на молекулярном уровне, а также получить точную спектральную информацию о молекулярных изменениях тромбоцитов. Одним из таких методов исследования компонентов и биомолекул крови является ГКРС. ГКРС активно используется во всем мире для экспресс-детекции малых одиночных биомолекул и исследования их структуры [201, 202]. Изучение биомолекул с использованием активных сред ГКРС позволяет проводить быстрый, безметочный, неинвазивный и точный [203-206] анализ. Метод ГКРС успешно применяется для лекарственного мониторинга [207], анализа раковых клеток [208, 209] и клеточных структур [210]. Разработаны экспериментальные условия получения разрешенного сигнала биомолекул и показана применимость эффекта плазмонного резонанса на плоской поверхности для идентификации биологических структур. Попытки применения метода КР-спектроскопии в биомедицинских исследованиях интенсивно проводятся только последние декады [219].

В области ССЗ интенсивно ведутся активные попытки использования метода комбинационного рассеяния и ГКРС в биомедицинских исследованиях тромбоцитов [211,221-223]. Затем авторы усовершенствовали методику, сфокусировав внимание на выборе стратегий

классификации тромбоцитов. В позднее время метод КР-спектроскопии тромбоцитов использовался для исследования болезни Альцгеймера, но все пробы были взяты на животных. В исследовании болезни Альцгеймера авторы [212] также применили метод КРС спектроскопии для анализа тромбоцитов. В работе [213] с помощью рамановской спектроскопии были изучены механизмы регуляции конформационных изменений интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  на тромбоцитах. Авторы [214] использовали спектроскопию комбинационного рассеяния и FTIR-ATR для исследования тромбоцитов как у здоровых людей, так и у лиц с артериальной гипертензией. Выявлены спектральные различия в валентных колебаниях C–C липидов и полосе Амида I. Эффект ГКРС реализуется за счет важной функции наночастиц (НЧ) (и ГКРС-активных поверхностей), а именно способности генерировать поверхностные плазмоны (ПП). Для тромбоцитов выбирали стратегии создания ГКРС-активных частиц, обеспечивающие их связывание с интегринами тромбоцитов (GPIIb-IIIa, GPIaIIa, GPVI, GPIb-IX-V) и другими рецепторами. НЧ различной конфигурации успешно применяются для диагностики и терапии стенозов [215], заболеваний периферических артерий [216], аневризм и тромбозов аорты [217]. Авторы [218] представили результаты исследования структуры тромбоцитов и эритроцитов на шероховатых субстратах из синтезированного золота. В литературе, несмотря на отсутствие информации о системных и негаузианских спектрах колебаний резонанса тромбоцитов большинства животных, включая человека, и других клеток крови, таких как эритроциты и лейкоциты [220], есть отдельные произвольные упоминания отдельных исследований. В работах [228, 229] приводятся результаты исследования по малярийным заболеваниям с использованием методов колебательной спектроскопии. В гематологических исследованиях крови периферических лейкоцитов коллективом [230] использован метод комбинационного рассеяния. Указанное исследование показывает потенциальные возможности данного метода для диагностики патологических состояний, таких как лейкемия. Важным аспектом является также возможность использования КР-спектроскопии для мониторинга клеточного ответа на терапию, включая низкодозную химиотерапию. Это позволяет оценивать эффективность лечения на клеточном уровне, что может быть критически важным для персонализированной медицины. Исследование дозозависимого клеточного ответа помогает определить оптимальные дозы препаратов, минимизируя побочные эффекты и повышая эффективность терапии.

В целом, полученные результаты подчеркивают, что установленные протоколы для безметочного анализа лейкоцитов, лейкоэмических клеток и их последующее воздействие химиотерапией могут быть значительно расширены. В 2007 году, механизмы регуляции конформационных изменений в тромбоцитарном интегрине  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  были изучены при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния. Использован недавно разработанный протокол моделирования, чтобы рассмотреть роль диалога тиол-дисульфид в этих изменениях, которые кажутся модификации исходной структуры дисульфидных связей благодаря эндогенной катализактивности тиоизомеразы. Известны единичные работы, посвященные применению ГКР-

спектроскопии для изучения тромбоцитов, а также эритроцитов [232]. Также, в настоящее время ведутся работы по созданию нагруженных клопидогелем наночастиц серебра [233], а также нагруженных аспирином наночастиц золота [234], однако, рассматриваемые наночастицы являются нефункционализированными, немультимодальными. Кроме того, серебро, используемое в качестве основы, токсично для тромбоцитов и требует создания иных структур. Других работ, описывающих применение КР и ГКР спектроскопии для характеристики тромбоцитов периферической крови не опубликовано.

### **1.8. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света и ее применение для анализа клеток микобактерий туберкулеза**

В последние десятилетия спектроскопия КРС и спектроскопия ГКРС в частности активно применяется в мировой науке для экспресс-детекции и исследования биомолекул [235-237]. Исследование биомолекул с использованием сред усиления сигнала КР на базе эффекта плазмонного резонанса, основанных на взаимодействии лазерного излучения с веществом, позволяет исследователям быстро [238-239], безметочно [240], неинвазивно [241-242] и точно [243], получать спектральную информацию, в том числе от биологических объектов макроскопического масштаба - бактериальных клеток [244].

Метод успешно применяется для терапевтического мониторинга, анализа раковых клеток и изучения клеточных механизмов [245-247]. ГКР-спектроскопия используется для анализа бактериальных клеток [248-249], включая изучение отдельных клеток, что делает актуальным поиск новых методик [250] и способов усиления ГКР-эффекта [251-253]. В последние годы предпринимаются попытки применения ГКР-спектроскопии для исследования микобактерий туберкулёза, преимущественно с целью дифференциации штаммов (чаще всего с различной лекарственной резистентностью), выявления их межвидовых различий штаммов и сравнительного анализа с другими бактериальными штаммами. Научной группой, под руководством J.Popp ведутся исследования микобактерий туберкулеза в университете Фридриха Шиллера (г. Йена, Германия). В работе [254] предложен подход к дифференциации туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий с помощью комбинированной методики lab-on-chip-ГКР. Авторы работы провели исследование более 2100 ГКР спектров MbT, определили спектральные различия. В работе [255] были проведены исследования MbT двух видов в стадии роста. Спектроскопия КР применялась для анализа единичных бактериальных клеток и слоя миколовых кислот в них во временном диапазоне роста (0-72 часа). Были установлены спектральные различия в липидном составе на поздней стадии роста – в диапазоне 48 - 72 часа. В продолжение исследований, в работе [256] было зарегистрировано более 8800 спектров туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий, создана спектральная библиотека. С применением хемометрических методов дифференциации спектров достигнута точность определения видов – 94%. Авторами также были проведены исследования штаммов различных видов с варьируемой лекарственной

чувствительностью. Во всех работах авторов основной проблемой являлось низкое усиление спектрального сигнала, которое не позволило выявить меж- и внутриштаммовые различия в пределах одного вида, различной лекарственной чувствительности. В работе [257] авторами использовался мультимодальный подход на базе MALDI-TOF масс-спектрометрии, ГКР-спектроскопии и классических микробиологических методик для анализа единичных туберкулезных клеток в различных стадиях роста. Также, в данной работе [257] исследовались бактерии *Mycobacterium smegmatis*, иммобилизованные на гидрофобной поверхности стекла. С помощью предложенного подхода авторам удалось идентифицировать вид и особенности живой бактериальной клетки в различных стадиях роста. Ряд исследований проводится в США (Университет Юты, государственный университет Колорадо, Массачусетский технологический институт и др.). В работе [258] было проведено комплексное исследование миколовых кислот, выделенных от туберкулезных и нетуберкулезных штаммов микобактерий с помощью методов ядерного магнитного резонанса, хроматографии, ГКР-спектроскопии. С использованием многокомпонентного статистического анализа штаммы были спектрально дифференцированы с точностью 100%. Спектральные различия в миколовых кислотах для определения межвидовых различий штаммов являлось основной гипотезой исследований, которая была подтверждена в работе. В работе [259] был предложен новый метод диагностики туберкулезного менингита на основе спектроскопии КРС. Были анализированы спектры слюны, выделены колебательные полосы, специфичные для случаев патологии. Авторы работы [260] использовали сочетание методов ГКР-спектроскопии, плазмон-усиленной ИК-спектроскопии, численных методов для исследования лекарственного препарата изониазида и его роста в виде тонких слоев на серебре. В работе [261] с помощью флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии КР были исследованы связи «кислота-спирт» в ферментах СУР51, равномерно замещенные гистидином. Бактерия *Mycobacterium tuberculosis* была использована в качестве модельной системы для исследования роли этих связей в тонкой настройке конформации гема, состояния вращения железа, а также образования и распада оксиферозного фермента. В работе [262] объектом изучения стал липоарабиноманнан, покрытый маннозой (ManLAM), — компонент микобактерии туберкулеза. Целью применения ГКР-спектроскопии было установление возможности использования этого соединения в качестве спектрального маркера наличия туберкулезной инфекции в биологических жидкостях пациентов. Однако предложенная гипотеза не получила подтверждения, поскольку авторам не удалось добиться необходимой воспроизводимости результатов. В исследовании [263] в качестве биомаркера рассматривался липоарабиногалактан — структурный элемент клеточной стенки микобактерий. Для его анализа была применена специально разработанная авторами усиленная ГКРС-поверхность, обеспечивающая повышение чувствительности метода. Методика была отработана на пробах человеческой сыворотки с различными концентрациями, что позволило получить спектры с приемлемым уровнем разрешения. В продолжение исследований [264] данный компонент изучался с помощью резонансной спектроскопии ГКР. Авторами, посредством разработанной методики

иммуноанализа, было проведено исследование биомаркера - липоарабиногалактана микобактерии. Было установлено, что применение резонансного ГКР показывает лучшие результаты чем ГКР. В работе [265] представлены результаты ГКР-исследований патогенных и непатогенных *MbT*. Из бактерий выделялись миколовые кислоты, после чего их основные формы: альфа-, метокси- и кетомиколовые кислоты были анализированы с помощью ГКР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Слой миколовых кислот был использован в качестве биомаркера для выявления спектроскопических особенностей патогенных и непатогенных *MbT*. В работе [266] проводилось исследование поверхностей, покрытых слоем шероховатого серебра для достижения эффекта ГКР. Авторы работы апробировали поверхности для определения 4,4-бипиридина, аденина, входящего в состав ДНК. В результате исследований удалось получить разрешаемый сигнал ГКР аденина. Авторы работы полагают, что сигнал аденина может служить биомаркером для определения таких патогенов как *Plasmodium spp.* и *Mycobacterium tuberculosis*. В работе [267] был предложен быстрый метод определения туберкулезных ДНК с помощью сенсора ДНК на основе аптамеров. Специализированные электроды-подложки модифицировались серебряными НЧ, которые, в свою очередь, модифицировались аптамерами для определения ДНК туберкулезных бактерий. В работе [268] был предложен метод для детектирования штамма *Mycobacterium smegmatis*, на основе реакции серебряного зеркала, созданного непосредственно на поверхности бактерии. Бактерия непосредственно помещалась в раствор соли  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{NaOH}$ , затем добавлялся гидроксид аммония до тех пор, пока нитрат серебра не растворялся окончательно. Затем бактерии наносились на полипропиленовую поверхность, и выполнялась ГКР-спектроскопия. Такой подход позволил идентифицировать патогены *M. Bovis BCG*, *M. Tuberculosis*, *Staphylococcus Aureus*, *S. Epidermis*, *Bacillus* и *Escherichia coli*. В работе [269] приводятся результаты исследований по реализации ГКРС детекции микобактерий туберкулеза с применением наностержней золота, встроенных в графеновые 3D матрицы. Было показана возможность детекции элементов ДНК в фемтомолярных концентрациях. В работе [270] была показана возможность ГКРС идентификации бактериальных штаммов с помощью реакции серебряного зеркала. Авторы предложили сенсор, способный детектировать *M. bovis* количественно, с нижним порогом детекции до 100 бактерий в пробе.

В последнее время существует достаточное количество работ, направленных на применение ГКРС и наночастиц в идентификации патогенов, подавлении их роста и выявлении различий в резистентных и чувствительных к лекарственным препаратам штаммов. В работе [271] отражены результаты применения варьируемых концентраций наночастиц оксида никеля ( $\text{NiO}_2$ ) для ингибирования роста наночастиц. В работе представлена методика синтеза таких частиц и результаты воздействия таких частиц на штамм *Mycobacterium phlei*. Были апробированы различные концентрации частиц для ингибирования микобактерий и подобраны концентрации, оказывающие ингибирующее их рост действие. Коллектив [272] разрабатывает подходы, основанные на идентификации патогенов с применением спектроскопии комбинационного рассеяния света и РСА-анализа. Показана перспективность комплексного подхода для

идентификации патогенов. Коллективом [273] был предложен теоретический подход к моделированию спектров антибактериального агента РУСА с помощью методов DFT и теоретически обсуждены сайты связывания в процессе воздействия РУСА на микобактерию *E. Coli* и *Mycobacterium stegmatis*. Также было выполнено моделирование электронных спектров и ЯМР спектров. Также были анализированы центры связывания противобактериальных препаратов с помощью молекулярного докинга. Коллектив [274] ведет исследования двух штаммов туберкулеза *Mycobacterium indicus pranii* (MIP) и *Mycobacterium intracellulare*, наблюдаемых у пациентов в том числе с ВИЧ. Коллеги, как и авторы проекта, делают упор на выявлении различий в миколовых кислотах клеточной стенки микобактерии и картеноидах, для чего применяют КР-спектроскопию.

Однако авторы проекта не проводили выявления различий антибиотикочувствительности внутри одного бактериального штамма. В работе [275] проводилось детальное теоретическое исследование производных пиразола методом DFT с целью выявления особенностей молекулярной динамики и молекулярного докинга на центры связывания белков микобактерии. Авторы провели моделирование колебательных мод и выявили характеристические максимумы, выявляющие связывания производных пиразола и микобактерии. В работе [276] выполнено квантово-механическое моделирование спектральных и энергетических характеристик PCINH, которое затем было соотнесено с экспериментальными результатами КР, ИК, ЯМР спектроскопии и спектроскопии поглощения. Была показана перспективность теоретического подхода для оценки антибактериального воздействия PCINH на микобактерии штамма H37Rv. Подобные теоретические подходы были отражены в работах [277-278]. Самые свежие единичные работы в области применения подходов спектроскопии комбинационного рассеяния света и гигантского комбинационного рассеяния света направлены на разработку методов быстрой диагностики антибиотикорезистентности. В частности, в работе [279] рассматривается применение методов машинного обучения для классификации спектров в подходах ГКР спектроскопии. Была показана успешная дифференциация штаммов *Micobacterium tuberculosis* (*Mtb*) с лекарственной устойчивостью и без нее (5-кратная перекрестная точность проверки = 94,32%). Между тем, штаммы *Mtb*, выделенные из легочных и внелегочных образцов, были эффективно разделены (5-кратная точность перекрестной проверки = 99,86%). Более того, штаммы *Mtb* с различными профилями лекарственной устойчивости также были выделены (5-кратная точность перекрестной проверки = 99,59%).

## **1.9. Математические подходы к различению массивов сложных спектральных данных и выделения характеристических колебательных полос**

Анализ биофизических данных, особенно спектральных, представляет сложную задачу, требующую передовых методов обработки. Визуальный анализ и базовая обработка сигнала зачастую недостаточны для выявления тонких спектральных изменений, указывающих на

состояние биологической системы или наличие специфических веществ. Это обусловлено высокой размерностью данных, шумами и перекрытием сигналов от разных компонентов. Колебательная спектроскопия предоставляет обширные спектральные профили, содержащие информацию о химическом составе, структуре и динамике анализируемого материала. Однако их обработка осложняется многомерностью данных и высокой корреляцией спектральных полос, что требует применения специализированных методов анализа.

Существует множество вариаций, одной из наиболее распространенных моделей ML, используемой в биомедицине, является метод главных компонент – линейный дискриминантный анализ (PCA-LDA). PCA уменьшает размерность данных и устраняет некоторый шум; затем LDA изучает критерий, по которому можно разделить данные как принадлежащие к одному из нескольких классов, на основе обозначенных примеров. Важным аспектом того, насколько хорошо работает модель ML, является то, как она справляется с ранее неклассифицированными данными в клинических условиях и невыявленными корреляциями, определяя их. Одной из наиболее популярных и часто применяемых моделей является комбинация методов главных компонент и линейного дискриминантного анализа, известная как PCA-LDA. Эта методика совмещает в себе преимущества двух разных подходов. Сначала с помощью метода главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) происходит снижение размерности исходных данных. Этот этап крайне важен, так как в биомедицинских исследованиях данные зачастую содержат большое количество параметров, часть из которых может оказаться избыточной или зашумленной. PCA помогает выделить наиболее информативные признаки и тем самым уменьшить вычислительную сложность анализа, одновременно снижая влияние случайного шума на результат обработки. После того как данные были преобразованы с точки зрения их размерности, на помощь приходит линейный дискриминантный анализ (Linear Discriminant Analysis, LDA). Эта техника основывается на идее разделения данных по классам, используя заранее размеченные примеры. LDA ищет такое линейное преобразование, которое максимально увеличивает расстояние между классами при минимизации внутриклассовых рассеяний. Такой подход позволяет не только классифицировать данные, но и выявлять скрытые закономерности, которые могут иметь важное значение для диагностики заболеваний или прогноза их развития. Однако один из ключевых показателей эффективности любой модели машинного обучения – это её способность обобщать полученные знания на ранее неклассифицированных данных. В клинических условиях это приобретает особое значение, поскольку реальная медицинская практика часто сталкивается с новыми, ранее не встречавшимися случаями данных. Если модель слишком точно подстраивается под тренировочный набор данных, она может запоминать все его детали вместо того, чтобы учиться выявлять общие закономерности – эта ситуация известна как переобучение (overfitting). В таком случае, несмотря на высокую точность при тестировании на известных данных, модель может оказаться неэффективной при работе с новыми данными. Для оценки обобщаемости модели производительность проверяется на недавно созданном наборе данных, который не использовался

при обучении. Однако в биомедицинских исследованиях сбор новых данных зачастую сопряжён с рядом практических сложностей. Процесс получения качественной клинической информации может быть, как дорогостоящим, так и требующим значительного времени, а порой и этических согласований. Более того, новые данные могут быть ограничены по объёму, что ещё больше усугубляет задачу проверки моделей на невидимых примерах. В связи с вышеуказанными ограничениями принято использовать методику разделения исходного набора данных на обучающую и тестовую выборки. На обучающем наборе модель настраивается, а тестовый имитирует сбор нового набора данных для оценки производительности модели. При этом необходимо учитывать, что выделение значительной части данных для тестирования может привести к уменьшению качества обучения, особенно если исходный объём данных невелик. В качестве одного из решений данной проблемы часто применяется метод перекрёстной проверки (cross-validation, CV), который позволяет более эффективно использовать доступные данные. Перекрёстная проверка подразумевает многократное разделение доступных данных на обучающую и тестовую выборки. Каждый раз модель обучается на одной части данных и тестируется на другой, что позволяет получить несколько независимых оценок её производительности. Такая стратегия позволяет снизить риск переобучения и обеспечивает более стабильную оценку общего качества модели. Существует несколько вариантов организации перекрёстной проверки, среди которых наибольшей популярностью пользуются k-fold CV и Leave-One-Out Cross-Validation (LOO-CV). К примеру, в k-fold CV данные делятся на k равных частей, после чего модель обучается k раз, при этом каждый раз одна из частей используется для тестирования, а остальные – для обучения. Подобную стратегию можно применять даже при достаточно небольших наборах данных, что является существенным преимуществом в клинических исследованиях. Один из вариантов перекрёстной проверки, известный как Leave-One-Out (LOO-CV), становится особенно актуальным при крайне малых выборках. В данном методе на каждом шаге из набора данных исключается всего один пример, который используется для проверки качества модели, а оставшиеся данные – для обучения. Такой подход позволяет максимально эффективно использовать все доступные данные, однако требует значительных вычислительных ресурсов при большом объёме исходной информации. В дополнение к описанным методам, современная биомедицинская статистика активно внедряет и другие алгоритмы машинного обучения, такие как случайный лес (Random Forest), метод опорных векторов (Support Vector Machine, SVM) и нейронные сети, способные работать с большими объёмами данных благодаря улучшенным алгоритмам обучения и адаптивным механизмам настройки параметров. Каждый из этих алгоритмов может использоваться отдельно или в комбинации с техниками снижения размерности, подобными PCA, в зависимости от специфики задачи и доступных экспериментальных данных. Также важно отметить, что для эффективного применения подобных моделей критически важно правильное предварительное изучение данных. Этап предобработки включает очистку данных, нормализацию, устранение пропусков и

применение методов отбора признаков для последующего анализа. Независимо от выбранного алгоритма, успех биомедицинского анализа во многом зависит от качества входных данных и от того, насколько точно происходят этапы как подготовки данных, так и последующего обучения модели. Помимо этого, современные исследования все чаще используют методы интерпретируемости моделей машинного обучения. Такие подходы, как Shapley Additive Explanations (SHAP) или Local Interpretable Model-agnostic Explanations (LIME), позволяют объяснить модель и проанализировать вклад каждого признака в итоговое решение. В условиях биомедицины, где объяснимость модели имеет первостепенное значение для врачей и исследователей, применение этих методов помогает не только улучшать надежность диагностических алгоритмов, но и предоставляет ценную информацию о том, какие биомаркеры или признаки имеют решающее значение для различения патологий.

Еще один аспект, требующий внимания – этические вопросы применения машинного обучения в медицине. Разработка и внедрение подобных моделей должны сопровождаться строгими протоколами проверки, чтобы избежать нежелательных последствий, связанных с неправильной интерпретацией данных. Большое внимание уделяется прозрачности алгоритмов и их способности объяснять свои выводы, поскольку любая ошибка может привести к серьезным последствиям для здоровья пациентов. Именно поэтому в последние годы наблюдается усиление сотрудничества между разработчиками алгоритмов, специалистами в области медицины и этическими комитетами, что помогает гарантировать, что модели машинного обучения работают на благо пациентов и способствуют развитию персонализированной медицины. Таким образом, использование метода PCA-LDA и других алгоритмов машинного обучения в биомедицине представляет собой мощный инструмент для анализа сложных данных, способный помочь в диагностике, прогнозировании и лечении заболеваний. Тем не менее, эффективность этих методов напрямую зависит от правильной организации обучения, применения перекрестной проверки для оценки обобщаемости, а также от широкой поддержки специалистов, адаптирующих модели под реальные клинические сценарии. Продолжающееся развитие статистических методов, повышение вычислительной мощности и улучшение качества исходных данных создают благоприятные условия для внедрения технологий машинного обучения в повседневную медицинскую практику, позволяя не только улучшать точность диагностики, но и существенно повышать качество лечения пациентов [448]. В этом случае предсказаний, суммируется общее количество ошибок, и эта ошибка используется для оценки качества модели. В дополнение к разделению на обучение/тест, иногда выполняется дополнительное разделение, называемое набором проверки. Набор проверки используется для оптимизации гиперпараметров модели (или даже для определения выбора модели ML): выбор модели, который делает исследователь, влияет на ее способность к классификации. Подобно тому, как модель может чрезмерно соответствовать данным, гиперпараметры могут быть выбраны таким образом, чтобы она хорошо работала для данного набора тестов, но не могла хорошо обобщать. Это было описано как чрезмерная подгонка на

втором уровне вывода. Набор проверки предоставляет дополнительный набор, позволяющий оптимизировать пространство гиперпараметров, сохраняя при этом набор тестов для менее предвзятой оценки обобщаемости.

В дополнение к разделению на обучающую и тестовую выборки, иногда выполняется дополнительное разделение, называемое набором проверки. Набор проверки используется для оптимизации гиперпараметров модели (или даже для определения выбора модели ML): выбор модели, который делает исследователь, влияет на ее способность к классификации. Подобно тому, как модель может чрезмерно соответствовать данным, гиперпараметры могут быть выбраны таким образом, чтобы она хорошо работала для данного набора тестов, но не могла хорошо обобщать. Это было описано как чрезмерная подгонка на втором уровне вывода. Набор проверки предоставляет дополнительный набор, позволяющий оптимизировать пространство гиперпараметров, сохраняя при этом набор тестов для менее предвзятой оценки обобщаемости.

Обычное CV разделяет данные таким образом, что одни и те же тестовые данные никогда не используются дважды. Повторяющийся CV повторяет этот процесс несколько раз, так что используется множество перестановок возможных наборов тестов (набор тестов состоит из нескольких выборок, за исключением LOOCV). Обычно он не используется, поскольку требует больших вычислительных затрат, хотя может уменьшить дисперсию расчетной производительности модели при небольших размерах выборки.

Метод опорных векторов (SVM, от английского Support Vector Machine) представляет собой одну из самых современных технологий контролируемого обучения, активно применяемую как для задач классификации, так и для регрессии. Однако, стоит отметить, что основное применение SVM сосредоточено именно на задачах классификации в области машинного обучения. Суть алгоритма заключается в нахождении оптимальной границы, которая разделяет различные классы в  $n$ -мерном пространстве. Эта граница, известная как гиперплоскость, играет ключевую роль в процессе классификации. Алгоритм SVM стремится максимизировать расстояние между гиперплоскостью и ближайшими точками данных, которые называются опорными векторами. Опорные векторы являются критически важными для построения модели, так как они определяют позицию гиперплоскости и, следовательно, влияют на качество классификации.

SVM выбирает крайние точки / векторы, которые помогают в создании гиперплоскости. Репрезентативные данные, которые находятся ближе всего к поверхности принятия решения, называются опорными векторами, и, следовательно, алгоритм называется методом опорных векторов. Модели SVM тесно связаны с классическими многослойными нейронными сетями персептрона. SVM вращаются вокруг понятия "границы" — любой стороны гиперплоскости, разделяющей два класса данных. Было доказано, что максимизация запаса и, таким образом, создание максимально возможного расстояния между разделяющей гиперплоскостью и экземплярами по обе стороны от нее уменьшает верхнюю границу ожидаемой ошибки обобщения.

SVM нуждается как в положительном, так и в отрицательном обучающем наборе, что необычно для других методов классификации. Опорные векторы играют ключевую роль в определении этой гиперплоскости, так как именно они влияют на её положение и ориентацию. Удаление данных, не относящихся к опорным векторам, не влияет на производительность классификации SVM, поскольку эти точки не участвуют в формировании решения. Это означает, что модель становится более устойчивой и менее подверженной переобучению, так как она фокусируется только на наиболее значимых данных.

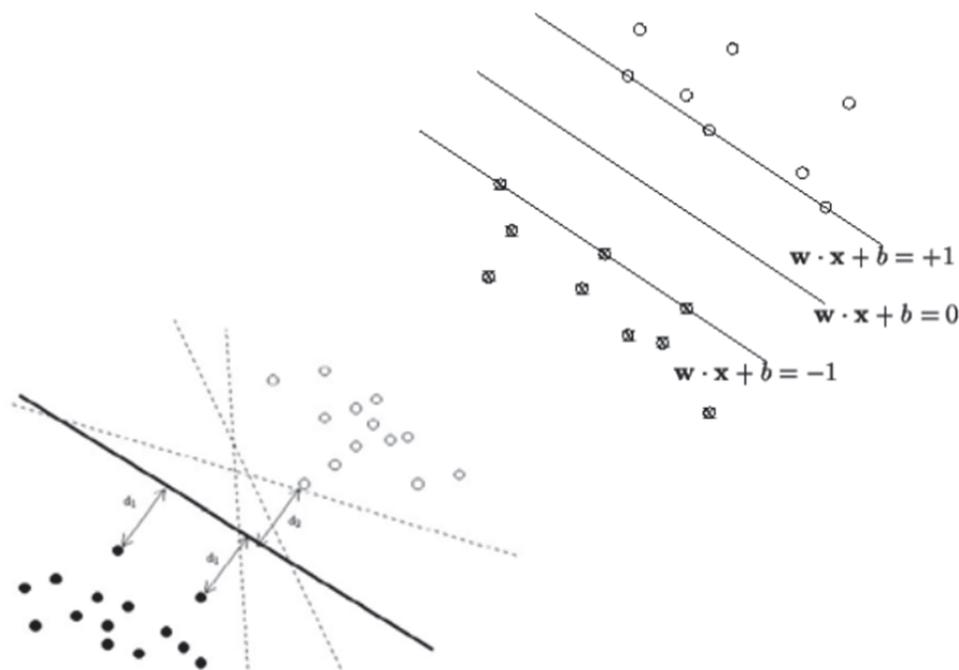


Рис. 9. Пример оптимального разделения гиперплоскостей

Ся и соавт. [280] исследовали ткани языка с помощью волоконно-оптического рамановского спектрометра и разработали сверточную нейронную сеть CNN-SVM для бинарной классификации. Эта модель заменяет конечный плотный слой типичного CNN-SVM, сочетая мастерство первого в выборе объектов с классификационными способностями второго. SVM могут использовать ряд функций ядра для лучшего моделирования нелинейностей в данных. CNN-SVM показал наилучшие результаты по сравнению с использованием других моделей с точностью 99,54%

Наивный байесовский классификатор представляет собой один из самых простых и в то же время эффективных методов классификации, который основан на применении теоремы Байеса. Основная идея этого подхода заключается в том, что он использует вероятностные методы для предсказания принадлежности объекта к определенному классу на основе его признаков. [281]. Извлечение объектов, как распространенный метод уменьшения размерности, преобразует входное пространство в низкоразмерное подпространство, которое сохраняет большую часть релевантной информации. Среди этих методов анализ наименьших квадратов (PLS) реализует

уменьшение размерности путем рассмотрения взаимосвязи между двумя блоками данных в одной и той же выборке. Он не только фиксирует большое отклонение в наборе спектральных данных, но также фиксирует взаимосвязь между набором спектральных данных и категорией выборки [282]. Поэтому можно выбрать метод извлечения функций PLS для уменьшения размера данных. Этот процесс использует функции в качестве входных данных, уменьшает ошибки, вызванные избыточностью данных и случайным шумом, и повышает точность модели.

Тем не менее, необходимо учитывать ряд методологических ограничений, которые могут влиять на результаты исследования. Одним из основных факторов является склонность моделей глубокого обучения к переобучению, особенно когда речь идет о небольших наборах данных. Это делает необходимым использование различных методов регуляризации и валидации для обеспечения обобщающей способности модели [399].

Исследования ML, особенно глубокого обучения, часто критикуют за недостаточную интерпретируемость. Можно предположить, что модель ML основывает свою классификацию на тех признаках, которые можно обнаружить на глаз при просмотре усредненных спектров, которые могут быть достоверными, а могут и не быть. Более сложный метод используется, когда статистически сравниваются пики комбинационного рассеяния света из разных классов или когда биохимический состав образцов оценивается с помощью таких методов, как метод наименьших квадратов с ограничением на неотрицательность коэффициентов (NNLS). Независимо от этого, эти методы могут предоставить описание только постфактум, которое может отражать, а может и не отражать, какие спектральные характеристики модель использовала для управления классификацией. В общем, не очевидно, какие особенности использует CNN для составления классификаций [448].

Рива и др. идентифицировали 19 комбинационных сдвигов как биохимически относящиеся к классификации с помощью градиентного бустинга, поскольку метод включает в себя этап выбора интерпретируемого признака [283]. Аналогичным образом смогли идентифицировать релевантные функции благодаря компоненту генетического алгоритма их модели [284]. Эти и другие традиционные модели ML имеют преимущество перед моделями глубокого обучения, которые печально известны своей непрозрачностью.

Историю искусственных нейронных сетей (ANNs и глубокого обучения (DL) можно проследить до первых описаний искусственных нейронов, называемых пороговыми логическими блоками, предложенными Уорреном Маккалохом и Уолтером Питтсом в 1943 году, и персептрона Розенблатта в 1958 году. Важные вехи в обучении и проектировании сетевых архитектур включают алгоритм обратного распространения, изобретенный в 1986 году, и появление сверточных нейронных сетей (CNNS) в 1989 году. Дальнейшее развитие привело к революции искусственного интеллекта (AI) в классификации и описаниях на основе изображений.

В классических ANNS все блоки одного слоя соединены со всеми блоками в последующем слое. Такие модели часто называют многослойными персептронами (MLP), полностью

подключенными сетями прямой связи или просто набором плотных слоев, включенных в качестве модулей в более сложную сетевую архитектуру. Ключевой частью ANNs является функция активации, которая модулирует выходные данные слоев. Функция активации обычно нелинейна, что дает сети возможность представлять сложные нелинейные взаимосвязи между входными и выходными данными. Популярной альтернативой функции активации является выпрямленная линейная единица.

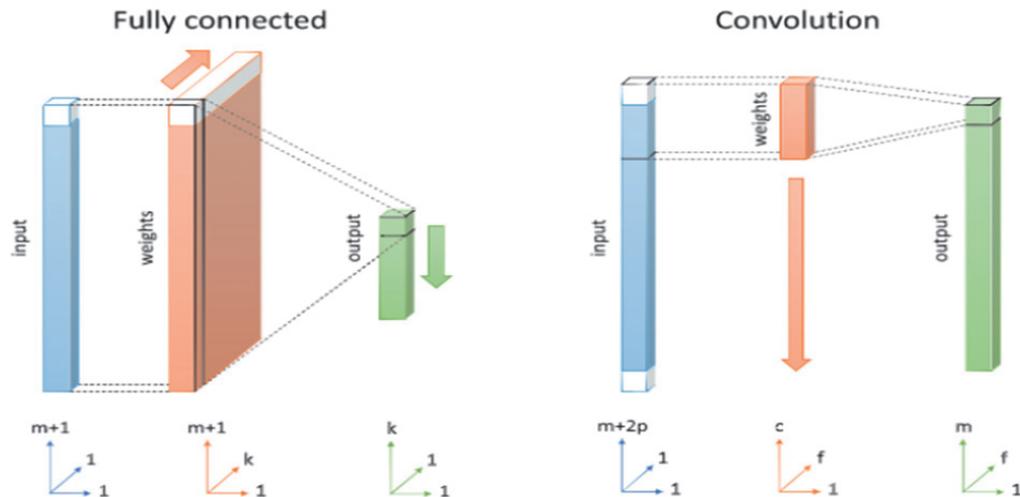


Рис.10 Иллюстрации плотной и сверточной связи в одномерной искусственной нейронной сети (ANN)

Полностью связанный слой слева содержит  $k$  скрытых блоков (нейронов), где белые части входных данных и веса представляют единицы смещения. Проиллюстрированный сверточный слой справа содержит  $f$  фильтров, каждый из которых включает  $c$  весов. Белые части входного слоя сверточной нейронной сети (CNN) представляют собой заполнение нулями.

Различное расположение межнейронных соединений и количество уровней (глубина сети) дают различные варианты архитектуры сети. В своей работе Хелин и соавт. [285] рассматривают как MLP, так и CNN, характеризующиеся использованием сверток, представляющих связи между слоями. Первоначально разработанные для решения задач распознавания 2D-изображений, CNNs включают в себя ряд сверточных фильтров на каждом уровне, каждый со своим собственным набором весов модели. Ключевым свойством CNNs является разреженная связь между слоями, что означает, что входные данные для каждого узла одного уровня ограничены выходами из узлов в локальной окрестности (определяемой размером фильтра) предыдущего уровня. Кроме того, каждый фильтр смещается по входному сигналу (спектру), чтобы позволить использовать одни и те же параметры фильтра в разных местах входного сигнала. Последнее также известно, как совместное использование параметров. Рис. 10 иллюстрирует различия между полностью подключенным и сверточным слоем. Ограничение соседства и совместное использование параметров сокращают количество сетевых параметров по сравнению с полностью подключенной архитектурой и, следовательно, являются более эффективными в вычислительном отношении при

обучении модели CNN. Размер фильтра определяет так называемое поле восприятия слоя и позволяет сети учитывать пространственные соотношения во входных сигналах. Это свойство оказалось чрезвычайно полезным в задачах, связанных с обнаружением объектов на изображениях, таких как распознавание цифр, написанных от руки [286].

Использование ANNS со спектроскопическими данными было исследовано в работе [287] с акцентом на приложения в ближнем инфракрасном диапазоне (NIR). Более поздние исследования, в которых используются CNN, включают Liu и соавт. [288], чья нейронная сеть достигла превосходных результатов классификации минеральных видов на основе их комбинационных спектров по сравнению с другими популярными методами машинного обучения, такими как К-ближайший сосед (KNN), SVMs и случайный лес. Акварелли и соавт. [289] предложили простую архитектуру CNN, которая превосходит популярные линейные модели в хемометрии на основе коллекции популярных наборов данных.

Надо отметить, что первым шагом построения модели глубокого обучения является подготовка данных. Это может включать стандартизацию входных данных, преобразование их в формат, подходящий для модели, и разделение их на обучающие и тестовые наборы.

При анализе спектров комбинационного рассеяния света используется множество методов предварительной обработки, таких как коррекция базовой линии, сглаживание и нормализация. Однако одно из предполагаемых преимуществ CNNS заключается в том, что они могут автоматически выполнять выбор объектов и предварительную обработку одновременно. Поиск наилучшего метода предварительной обработки и параметров часто является методом проб и ошибок или опорой на то, что хорошо работало в прошлом. Хотя существуют более систематические подходы, такие как поиск с помощью генетического алгоритма [290], удаление этого шага является привлекательным.

Два основных варианта предварительной обработки достигаются за счет включения обучаемых слоев нейронной сети. Этот подход объединяет этапы предварительной обработки и прогнозирования задачи анализа данных в одну унифицированную модель. Идея была впервые предложена Донгом и соавт. [291], которые представили модель под названием Raman-CNN для классификации образцов крови на основе их спектров комбинационного рассеяния. Первый вариант предварительной обработки основан на их работе, при этом два слоя ANN были тщательно разработаны для обработки шумоподавления и коррекции базовой линии соответственно. Вторая альтернатива - это новый дизайн слоя нейронной сети, способного выполнять метод спектральной предобработки (EMSC) путем разработки соответствующего эталонного спектра-кандидата в процессе обучения. Мы будем называть эти альтернативы нейросетевым шумоподавлением и коррекцией базовой линии (NN-NoiseBase) и нейросетевым EMSC (NN-EMSC) соответственно. Общим для этих подходов являются их обучаемые веса на уровнях предварительной обработки. Выходные данные полностью обученных ANNS, включая уровни предварительной обработки, могут рассматриваться непосредственно как предсказания

модели, где шаг предварительной обработки и модель прогнозирования объединены в единую модель. Кроме того, выходные данные слоев предварительной обработки можно рассматривать как предварительно обработанные (скорректированные) входные данные, также доступные для других вариантов моделирования прогнозирования, включая традиционные линейные модели, такие как PLS.

В работе Хелина и соавт. [292] предлагаемая NN-NoiseBase имеет два сверточных слоя с дополнительными ограничениями на веса фильтров свертки. Ограничения требуют неотрицательных весов  $w = [w_1, w_2, \dots, w_k]^T$ , (где  $k$  - размер фильтра).

Эти ограничения гарантируют, что слои действительно могут эволюционировать в значимые фильтры, выполняющие шумоподавление и коррекцию базовой линии. Каждый из двух слоев состоит из одного фильтра. Шумоподавление достигается с помощью сглаживающего фильтра, представляющего локальное средневзвешенное значение, и размер фильтра должен быть выбран экспериментально достаточно большим, чтобы удалить высокочастотный шум из спектров, не влияя на значительные тенденции в спектрах. После этого коррекция базовой линии достигается за счет использования более широкого ядра сглаживания для захвата основных тенденций спектров с уменьшенным шумом, которые далее вычитаются для получения данных с исправлением базовой линии. С помощью  $h(\cdot)$ , обозначающего ядро сглаживания, скорректированные спектры могут быть выражены следующим образом:

$$X_{corrected} = X - X_{smoothed} = X - X * h(\cdot) = X * (I - h(\cdot)),$$

где  $I$  - это спектр идентичности. В таком случае ядро  $(I - h(\cdot))$  является ядром коррекции базовой линии. То есть веса должны суммироваться до 0, и каждый вес должен быть меньше, чем ядро идентификации  $I$ .

Одним из методов спектральной обработки может являться прием увеличения данных - это метод, с помощью которого количество спектров увеличивается путем добавления реплицированных спектров к данным и добавления к ним шума и/или других изменений.

Это метод, используемый в глубоком обучении, как для увеличения размера выборки, так и для внесения шума в данные, чтобы модель с меньшей вероятностью соответствовала обучающему набору. Это не только увеличивает размер выборки, что важно для глубоких моделей с большим объемом данных, но и делает модель устойчивой к нерелевантным особенностям в данных, заставляя ее обращать внимание на то, что не искажается. Это приводит к упорядочению данных, сглаживая процесс обучения. Оно хорошо зарекомендовало себя и широко используется в других областях, использующих глубокое обучение, в частности распознавание изображений. Этот процесс не направлен на моделирование биологических вариаций, но полезен как метод регуляризации, который уменьшает тенденцию модели чрезмерно соответствовать данным. Следовательно, увеличение не может быть использовано для компенсации отсутствия биомедицинского разнообразия в данных.

Дополнение традиционно выполняется только для обучающих данных, поскольку безграничное увеличение данных и эффект их упорядочивания уместны только во время обучения.

Существует метод, называемый увеличением времени тестирования, который становится все более распространенным, особенно с небольшими наборами данных. Было показано, что это повышает производительность модели [293]. Это позволяет выполнять несколько прогнозов по одному и тому же тестовому спектру, увеличенных в несколько раз, из которых можно получить среднее значение — по сути, создавая бэггинг.

Если исходные данные КРС спектроскопии используются для прямой классификации, объем вычислений велик, и сам расчет является дорогостоящим. Одним из вариантов действий в данном случае является применение метода извлечения признаков. PLS выбирается для выполнения извлечения признаков из исходных данных рамановской спектроскопии после разделения образца. Возможный недостаток подхода, использующего часть обученной нейронной сети перед моделью PLS заключается в том, что ошибки прогнозирования модели PLS не влияют на обновление весов на уровне предварительной обработки нейронной сети. При правильном выборе NN-архитектуры этот подход может повысить производительность прогнозирования последующей PLS-модели. Однако процесс выбора модели и валидации для этого подхода требует гораздо больше времени, чем для традиционных методов предварительной обработки в сочетании с обычным моделированием PLS.

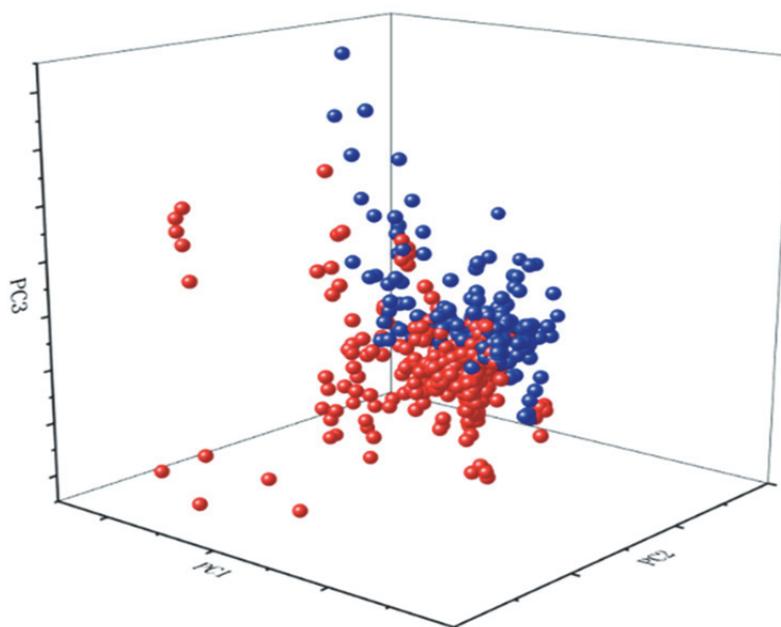


Рис.11. Трехмерная диаграмма рассеяния трех основных компонентов спектра комбинационного рассеяния.

Обучение модели глубокого обучения включает в себя выбор соответствующей архитектуры (например, сверточной нейронной сети, рекуррентной нейронной сети и т.д.) и обучение ее на основе спектральных данных. Во время обучения модель учится извлекать релевантные функции из входных данных. Выбор архитектуры модели DL часто является сложной задачей. Количество слоев и количество узлов на слой, как правило, зависят от проблемы,

основаны на опыте и часто определяются методом проб и ошибок. Выбор архитектуры обычно основывается на обзорах литературы, простой структуре и тестировании на предварительных экспериментах. В работе Хелина и др. [306] были рассмотрены две разные архитектуры ANN, иллюстрация этих архитектур приведена на Рисунке 12.

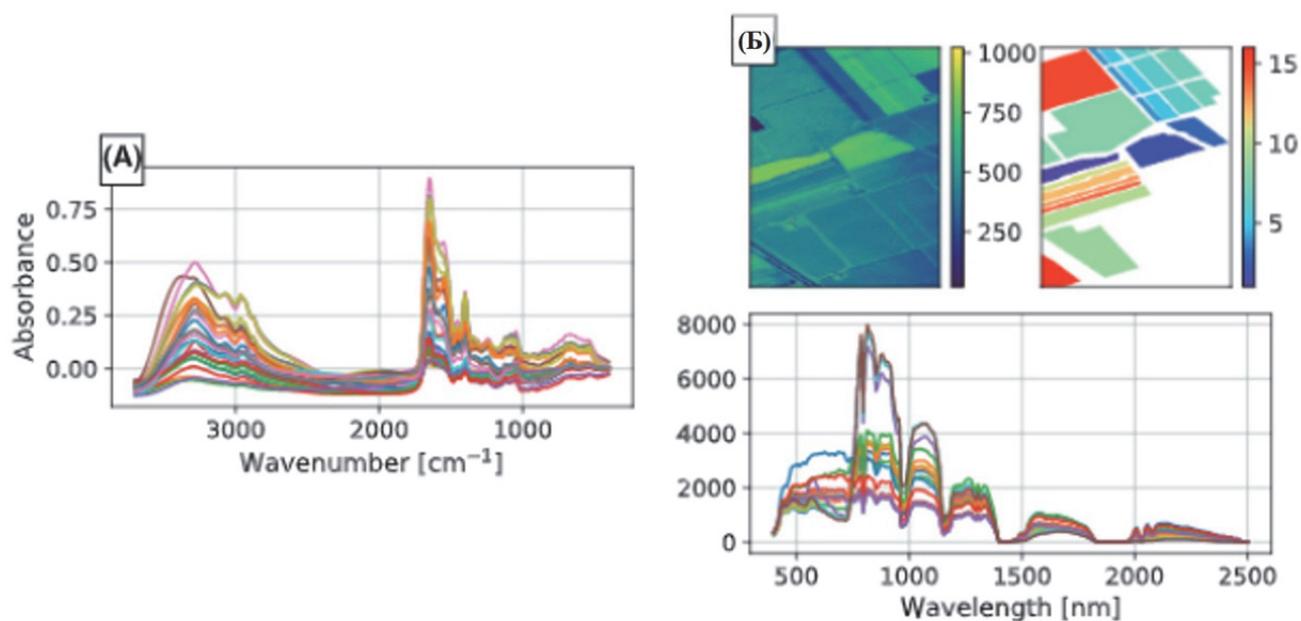


Рис.12. Примеры из двух наборов данных.

Здесь на рисунке (A) один спектр для каждого класса ферментативных материалов в наборе данных инфракрасного преобразования Фурье (ИК-Фурье) перед предварительной обработкой. (B) показывает набор данных дистанционного зондирования. На верхнем ряду мы можем наблюдать образец изображения одной спектральной полосы ( $1153 \text{ cm}^{-1}$ ) с соответствующей маской метки. Внизу образец одного спектра из каждого из 16 классов.

Разделение данных проводится с целью получения обучающих, тестовых и, в некоторых случаях, валидационных наборов. Теоретически LOOCV должен обеспечивать производительность с наименьшим смещением, поскольку он включает в себя наибольшее количество обучающих данных с наименьшей дисперсией, поскольку он сдвигает только одну выборку по сгибам [294]. Однако это предполагает, что CV усредняет независимые оценки, но на самом деле выборки могут быть сильно коррелированными. Далее LOOCV с трудом обнаруживает нестабильности модели, вызванные изменением набора данных, поскольку одновременно меняется только одна выборка. Следовательно, стратегия k-кратного CV может быть предпочтительнее, хотя точное количество k зависит от ряда взаимодействующих факторов, таких как размер выборки, отношение сигнал/шум данных и используемая модель, которые нелегко согласовать. Когда размер выборки невелик, было показано, что LOOCV имеет высокую предвзятость и дисперсию, в то время как k-кратные стратегии имели низкую предвзятость, и их дисперсию можно дополнительно уменьшить, выполнив повторные разбиения [295]». Проверка с

одним разделением относится к методу разделения данных на разные наборы только один раз, в отличие от методов CV, которые итеративно разделяют данные для получения нескольких оценок производительности. В качестве показателя для оценки можно использовать среднеквадратичную ошибку (RMSE) для задачи регрессии и точность классификации для задачи классификации. На рисунке 13 показан пример разделения данных для различных этапов анализа. Для проверки результатов используются 75% данных на этапе выбора параметров (синий цвет), остальные 25% служат в качестве тестового набора на этапе выбора модели (оранжевый цвет). Кроме того, на этапе выбора параметров 2/3 данных (Train data1) для оценки оптимального количества компонентов PLS и нейронных сетей кросс-валидация будет неоднократной. Заключительная 1/3 обучающих данных (валидационные данные) используется для вычисления ошибок прогнозирования. При вычислении ошибок прогнозирования все выборки, использованные при кросс-валидации (Train data1), требуются для соответствия моделям для прогнозирования. На этапе выбора модели все выборки с этапа выбора параметров (Train data 1 + данные валидации) использованы в неоднократной перекрестной проверке для оценки оптимального количества компонентов PLS и эпох нейронной сети. Для соответствия новым моделям при вычислении ошибок прогнозирования все выборки из кросс-валидации повторно используются аналогично этапу проверки параметров. Ошибки прогнозирования для каждого конвейера вычисляются на основе 25% ранее не использовавшихся данных (тестовые данные). Оценка конвейеров основана на этих ошибках прогнозирования. Использование k-кратной кросс-валидации не является наиболее распространенным методом проверки ANNS, где обычно в качестве набора проверки используется одно разделение. Большинство приложений, использующих модели DL, располагают большим количеством доступных данных; таким образом, для точной проверки моделей часто достаточно одного разделения проверки. Подход кросс-валидации дает более стабильные и репрезентативные оценки, но обходится в обучение нескольких сетей вместо одной. На практике эти дополнительные вычислительные затраты не представляют проблемы для анализа, если общее количество выборок в каждой из нейронных сетей относительно небольшое, а время обучения соответственно короче.

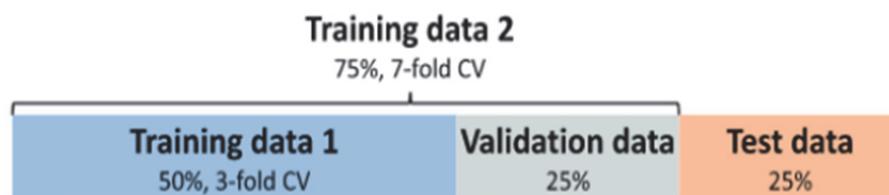


Рис. 13. Схема разделения данных для двух этапов анализа.

“Training data 1” и “Validation data” используются для выбора параметра. “Training data 2” и “Test data” используются для выбора модели. Обратите внимание, что

$$\text{"Train data 2"} = \text{"Train data 1"} \cup \text{"Validation data"}.$$

На рисунке 14 показан процесс рамановской спектроскопии в сочетании с PLS-Gaussian-CNN для быстрого обнаружения глиом [296]. Нормализованные спектральные данные делятся на обучающий набор и тестовый набор. После уменьшения размера с помощью PLS были получены матрицы данных, а затем обучающий набор был расширен с использованием метода увеличения данных. Наконец, данные были введены в три точно настроенных CNN AlexNet, ResNet и GoogLeNet, чтобы найти наиболее эффективную вспомогательную диагностическую модель.

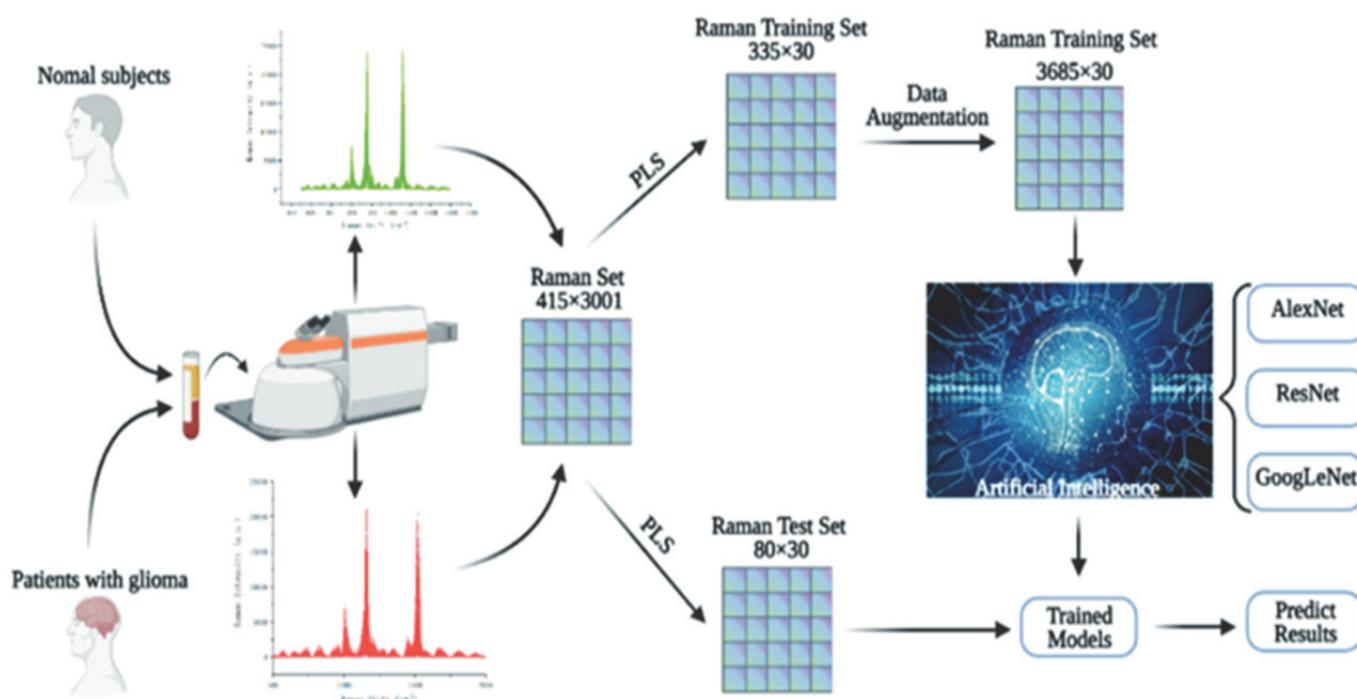


Рис. 14. Блок-схема установки спектроскопии КРС на примере обнаружения глиомы (объяснения в тексте).

Иногда спектры берутся из одного и того же образца, а иногда у одного и того же субъекта берутся несколько образцов. Это вводит иерархическую структуру данных с объектами сверху, за которыми следуют образцы, а затем сами спектры. Это усложняет медицинские наборы данных комбинационного рассеяния света, которые необходимо принимать во внимание. Например, возникает вопрос о том, на каком уровне разделять данные: спектры, образец или объект исследования. Если разделить на уровне спектров, это может означать, что спектры, принадлежащие одному и тому же образцу и/или субъекту, присутствуют как в обучающем, так и в тестовом наборе. Это может привести к чрезмерно оптимистичным оценкам универсальности модели, поскольку это нереалистичная оценка модели, которая классифицировала бы спектры образцов в клинических условиях. Особого внимания заслуживает исследование Ву и др., единственное рецензируемое исследование, в котором сравнивались методы разделения одного и того же набора данных. Они обнаружили снижение производительности на 12,5% в общей точности, когда расщепление на уровне образца по сравнению с уровнем спектров [297]. Это

согласуется с выводами Гуо и соавт., которые подробно исследовали разницу в уровне разделения при CV с линиями опухолевых клеток, придя к выводу, что при разделении данных следует использовать самый высокий иерархический уровень набора данных [298].

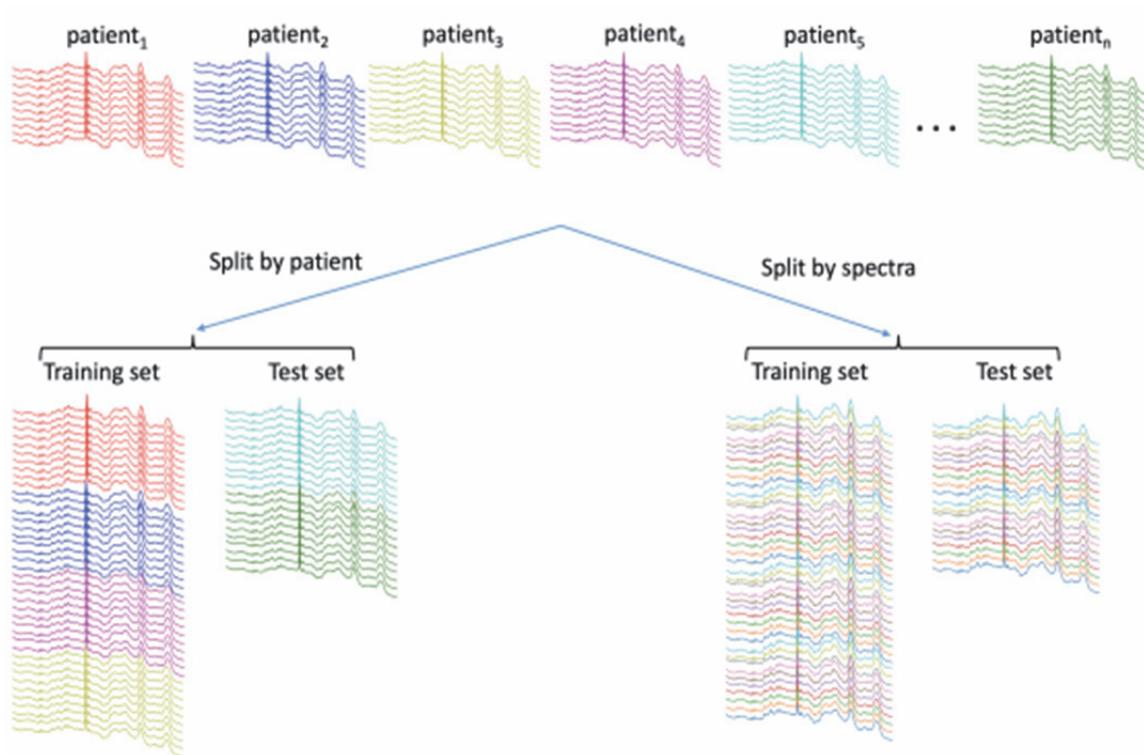


Рис.15. Разделение спектров по сравнению с данными о пациентах [298].

На Рисунке 15 набор тестов при разделении по спектрам включает некоторые спектры от всех пациентов, содержащихся в наборе тренировочных данных.

Этап выбора параметров включен в качестве шага, призванного снизить сложность полного поиска модели. На этом этапе обучение всех моделей нейронной сети ограничено количеством эпох, чтобы завершить поиск параметров в приемлемые сроки. Это не гарантирует конвергенции каждой модели, но можно увидеть основные тенденции и различия. Для каждого метода предварительной обработки выполняется поиск по сетке по ряду выбранных гиперпараметров. Для метода NN-NoiseBase размеры двух фильтров предварительной обработки являются гиперпараметрами. Различные спектральные данные содержат пики разной ширины. ANN - это стохастическая модель с большой долей случайности. Начальные веса сети задаются случайно, а обучение носит стохастический характер, так как обновление весов основано на случайных подмножествах данных. Дополнительную случайность вносит использование отсеиваемых слоёв. Это помогает избежать локальных минимумов и находить оптимальные веса, но приводит к вариативности результатов при повторных запусках на одном и том же наборе данных, особенно при небольшом объёме выборки. Для снижения этой вариативности прогнозируемая ошибка пересчитывается несколько раз для каждого набора гиперпараметров с разными инициализациями весов, а их среднее значение используется для выбора оптимальных параметров. Оптимально,

чтобы модели ANN, используемые во время перекрестной проверки, также были дополнены дополнительными инициализациями веса, но, учитывая размер поиска по сетке, это может быть слишком затратно с точки зрения вычислений.

Основная оценка различных методов предварительной обработки, использующих либо PLS, либо ANN для прогнозирования, основывается на результатах этапа выбора модели. На этом этапе нужно использовать оптимальные гиперпараметры, найденные для каждого из конвейеров на этапе выбора параметров, и проверять методы предварительной обработки на большем количестве данных. Кроме того, можно позволить ANNs тренироваться в течение большего количества эпох. Сначала многократно вычисляют ошибки прогнозирования, изменяя случайную инициализацию весов, как при выборе параметров. Чем больше вычислений, тем точнее оценка.

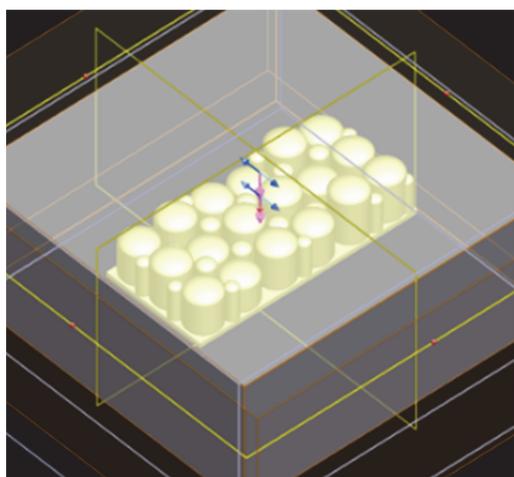
В заключение можно отметить, что в настоящее время в мире ведутся отдельные попытки применения спектроскопии КРС и ГКРС для задач поиска спектральных биомаркеров биологических объектов, связанных с исследованием тромбоцитов, микобактериальных клеток. В последние годы активно применяются алгоритмы машинного обучения для широкого круга биофизических задач. По результатам данного литературного обзора продемонстрировано, что выбранные направления исследований в ключе поставленных целей диссертации являются актуальными и новыми. Показана как перспективность применения оптических сенсоров на базе плазмонного эффекта для различения клеток в различных состояниях, так и разработка новых методов для дифференциации спектральных данных для таких задач.

## ГЛАВА 2. МЕТОДИКА И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

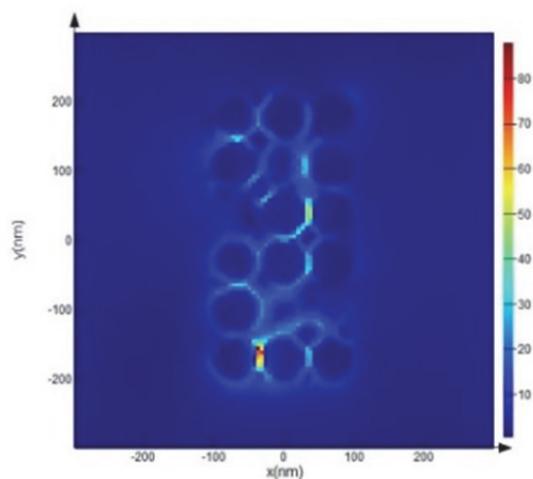
### 2.1 Расчет оптических свойств коллоидных и планарных наночастиц

Для подбора оптимальных оптических параметров, было выполнено моделирование оптических свойств наночастиц металлов, варьируемой формы, после чего были определены параметры для последующего синтеза наночастиц, при которых достигается наибольшее усиление ГКРС. Для проведения моделирования использовался пакет Ansys Lumerical FDTD Solutions через коэффициент  $|E|^4$ , который подробно описан в [303-304]. В случае моделирования сферических частиц и частиц с оболочкой моделирование проводилось по следующему алгоритму, по схеме, обозначенной в нашей работе [305]. Нижеобозначенные результаты опубликованы в работе [405].

В процессе работы была проведена теоретическая оценка коэффициента ГКРС для выделенной морфологии поверхности золота для фемтосекундного лазерного структурирования, опубликованные в работе [318]. Для проведения моделирования были выбраны наиболее подходящие различные структурные элементы, такие как цилиндры, сферические сегменты и острые конусы. Для «кругов» (рис. 16а) и «сеток» (рис. 17а) размер основания поверхности в области моделирования задавался следующим образом:  $x - 200$  нм,  $y - 400$  нм,  $z - 10$  нм. В случае «кругов» поверхность состояла из большого («L»), среднего («M»), и малого («S») цилиндров со сферическими сегментами на их вершине. Цилиндры «M» располагались между цилиндрами «L», а цилиндры «S» располагались по периферии. Размеры моделирующих морфологических элементов подробно описаны в Таблице 2.

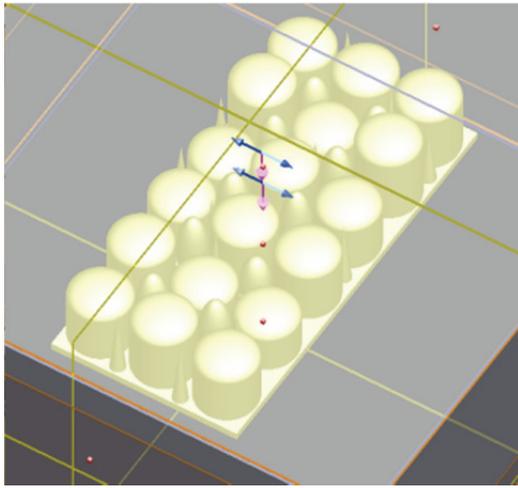


А)

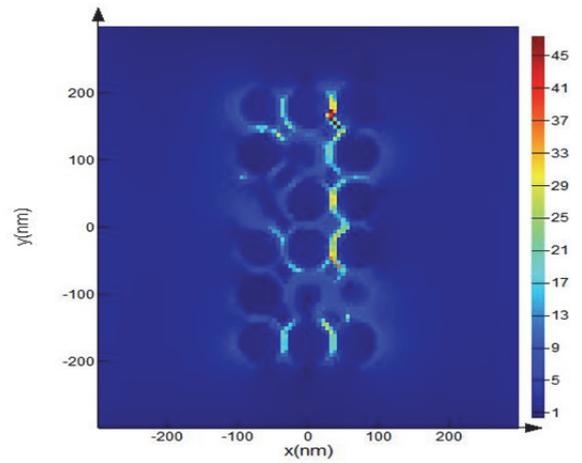


Б)

Рис. 16. Область модели FDTD с геометрией поверхности «круг» (а) и распределением электрических искажений (б).



А)



Б)

Рис. 17. Область модели FDTD с геометрией поверхности «сетка» (А) и распределением значения напряженности  $E$  (Б).

Таблица 2. Параметры морфологии для геометрии «круг»

«Круг»			
Морфологические элементы	Параметры		
	Радиус цилиндрического/сферического сегмента $r_0$ , нм	Высота сферического сегмента $h_0$ , нм	Общая высота $h$ , нм
«L» цилиндры со сферическими сегментами	32	16	75
			80
			85
			90
			95
			100
			105
			110
«M» цилиндры со сферическими сегментами	16	10	115
			120
			65
			70
			75
			80
«S» цилиндры со сферическими сегментами	12	8	85
			85
			90
			85
			95

В случае рассмотрения геометрии «сеть» (Рис. 17а) поверхность состояла из «L»-цилиндров со сферическими сегментами на вершине. В систему между «L»-цилиндрами добавлены сегменты эллипсоида вращения. Конусы располагались по периферии в качестве третьего элемента. Параметры объектов моделирования подробно описаны в Таблице 3.

Таблица 3. Морфологические параметры для геометрии поверхности «сеть»

«Сеть»			
Морфологические элементы	Параметры		
L-цилиндры со сферическими сегментами	Радиус цилиндрического/сферического сегмента $r_0$ , нм	Высота сферического сегмента $h_0$ , нм	Общая высота $h_0$ , нм
	32	16	75
			80
			85
			90
			95
			100
			105
			110
115			
120			
Сегменты эллипсоида вращения	Радиус $r_0$ , нм	Высота $h_0$ , нм	
	8	43	
		44	
		45	
		47	
		48	
		52	
		53 (×2)	
		54	
58			
Конусы	Базовый радиус $r_0$ , нм	Высота $h_0$ , нм	
	10	100	

## 2.2 Физический синтез сред коллоидных наночастиц золота и структурированных поверхностей, исследование оптических свойств

С учетом результатов проведенных расчетов, были получены абляционные наночастицы золота, диаметром до 100 нм были синтезированы методом фемтосекундной лазерной абляции золотой пластины в дистиллированной воде на установке TETA-X, (AVESTA, Россия) (длительность импульсов 280 фс, частота 25 кГц) при различной энергии лазерного излучения. Для получения наночастиц с размером 20-100 нм энергия лазера варьировалась в диапазоне  $E = 10-25$  мкДж. Объем воды в кювете с мишенью составлял 1,2 мл, толщина слоя растворителя над золотой поверхностью – 1 мм. Время абляции составляло 4 минуты. Кювета с образцом помещалась на вращающуюся систему позиционирования, таким образом, чтобы в процессе абляции лазерный пучок фокусировался в новом месте пластины. Наночастицы, полученные в кювете, в результате абляции, впоследствии помещались в колбу, а процедура синтеза повторялась, пока объем полученных частиц не составлял 5 мл. Таким образом, была отработана методика получения наночастиц различного радиуса в зависимости от энергии фемтосекундного лазера.



Рис. 18. Установка фемтосекундной лазерной абляции с системой фокусировки луча на поверхности металлической пластины.

В результате проведения работ были синтезированы наночастицы методом фемтосекундной лазерной абляции золотой пластины в дистиллированной воде на установке TETA-X, (AVESTA, Россия) (длительность импульсов составляла 280 фс, частота падающего излучения составляла 25 кГц). Энергия подаваемого на пластину лазерного излучения варьировалась в диапазоне  $E=10-25$  мк Дж. Объем воды в кювете с мишенью составлял 1,2 мл, толщина слоя растворителя над золотой поверхностью – 1 мм. Время абляции было 4 минуты. Кювета с образцом помещалась на вращающуюся систему позиционирования, таким образом, чтобы в процессе абляции лазерный пучок фокусировался в новом месте пластины. Наночастицы, полученные в кювете, в результате абляции, впоследствии помещались в колбу, а процедура синтеза повторялась, пока объем полученных частиц не составлял 5 мл. После синтеза наночастицы золота использовались для осаждения на титановые поверхности и экспериментов в коллоидных растворах.

Другим методом синтеза наночастиц золота являлся синтез наночастиц золота с помощью наносекундной лазерной абляции. Такой синтез был выполнен на установке LQ 629 (SOLAR LS, Беларусь) в режиме Q-switch (длительность импульсов 10 нс, частота 12 Гц) в дистиллированной воде. Для получения наночастиц с размером 20-100 нм были использованы аналогичные параметры синтеза. Энергия лазера так же варьировалась в диапазоне  $E=15-25$  мДж. Объем воды в кювете с мишенью составлял 1.2 мл, толщина слоя растворителя над золотой поверхностью – 1,2 мм. Наночастицы, полученные в кювете, в результате абляции, впоследствии помещались в колбу, а процедура синтеза повторялась, пока объем полученных частиц не составлял 5 мл. Таким образом, была отработана методика получения наночастиц различного радиуса в зависимости от энергии наносекундного лазера. С использованием фемтосекундного лазера ТЕТА-Х были получены наночастицы золота размером 8-80 нм.

### **2.3 Химический синтез сред коллоидных наночастиц золота и структурированных поверхностей, исследование оптических свойств**

С учетом результатов математического моделирования были определены размеры нанозвезд, демонстрирующих наибольшую напряженность электрического поля вблизи поверхности. Для проведения экспериментальной части были получены наночастицы (НЧ) золота разной геометрической формы (звезда). Синтезирование НЧ было произведено химическим методом с использованием «семян роста». Для реализации химического синтеза использовались следующие химические реактивы:  $\text{HAuCl}_4$  (тетрахлороаурат(III) водорода), ЦТАБ/СТАВ ( $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ , цетилтриметиламмоний бромид),  $\text{NaBH}_4$  (борогидрид натрия), АА ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , L-аскорбиновая кислота),  $\text{HCl}$  (соляная кислота),  $\text{Na}_3\text{Cit}$  (цитрат натрия),  $\text{NaOH}$  (гидроксид натрия), TEOS (тетраэтоксисилан), АРТЕS (3-Аминопропил)триэтоксисилан). Все химические реактивы имели степень чистоты х.ч или ос.ч. Растворы были приготовлены с использованием химически чистой воды 1 типа (Milli-Q). Для химического синтеза золотых нанозвезд был осуществлен двухстадийный метод синтеза. В качестве «зародышевого раствора» использовали коллоид, приготовленный по стандартному цитратному методу [307]. Для синтеза зародышей брали 20 мл раствора, содержащего  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{Na}_3\text{Cit}$  с концентрациями  $2,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л и  $10^{-4}$  моль/л соответственно. Затем при умеренном перемешивании быстро добавляли свежеприготовленный  $\text{NaBH}_4$  (0,1 моль/л, 60 мкл). Раствор сразу же становился коричнево-розовым и постепенно в течение суток приобретал окончательный красный цвет. Для синтеза нанозвезд был приготовлен раствор СТАВ (15 мл, 7,33 моль/л), к которому добавляли 640 мкл  $\text{HAuCl}_4$  (0,01 моль/л) и 96 мкл  $\text{AgNO}_3$  (0,01 моль/л). Затем при интенсивном перемешивании вводили 110 мкл АА (0,1 моль/л). Сразу после обесцвечивания раствора добавляли 12 мкл «зародышевых частиц» и перемешивали еще 2 минуты. В течение этого времени раствор постепенно становился синим. Синтезированные коллоиды представлены на Рисунке 19.

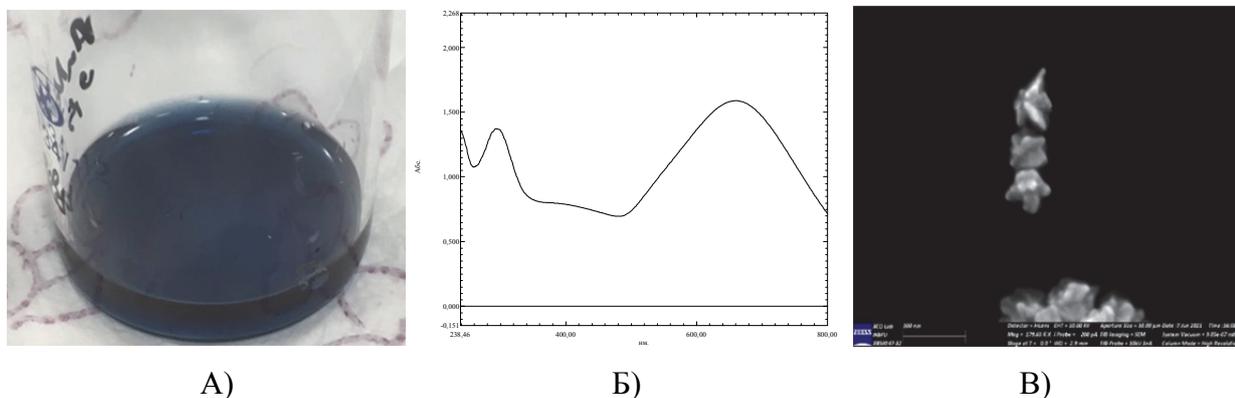


Рис. 19. Фотографии синтезированных золей нанозвезд (а), спектры поглощения (б), СЭМ изображения нанозвезд (в).

Для контроля положения плазмонного максимума были сняты спектры поглощения нанозвезд. Такие спектры снимали в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм с использованием двухлучевой спектрофотометра Shimadzu UV-2600 со спектральным диапазоном 200-800 нм. На рисунке 19б представлены спектры поглощения золотых наностержней и нанозвезд. Видно, что максимум поглощения нанозвезд лежит в нужной нам ближней ИК-области. Для подтверждения различной морфологии наночастиц использовался метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Данное исследование было осуществлено с помощью двухлучевой электронно-ионной системы сверхвысокого разрешения Zeiss Cross Beam XB 540. На фотографиях (рис. 19в), полученных с помощью двухлучевой электронно-ионной системы, наблюдаются золотые нанозвезды. Наблюдаются как чёткие, так и не до конца сформировавшиеся вершины. Для модификации прототипа были также приготовлены золотые нанозвезды, в два с этапа с использованием зародышевых частиц. Для синтеза зародышей сначала готовили 20 мл раствора, содержащего золотохлористоводородную кислоту и цитрат натрия с концентрациями соответственно  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М и  $10^{-4}$  М. Затем при умеренном перемешивании быстро добавляли свежеприготовленный ледяной борогидрид натрия (0,1 М, 60 мкл). Раствор сразу же становился коричнево-розовым и постепенно в течение суток приобретал окончательный красный цвет. Для синтеза нанозвезд готовили 15 мл 7,33 мМ раствора СТАВ (0,125 г СТАВ на 46,88 мл воды). К этому раствору добавляли 640 мкл 0,01 М р-ра  $\text{HAuCl}_4$  и 96 мкл 0,01 М  $\text{AgNO}_3$ . Затем при интенсивном перемешивании приливали 110 мкл 0,1 М аскорбиновой кислоты. Сразу после обесцвечивания р-ра добавляли 12 мкл р-ра зародышевых частиц и перемешивали еще 2 минуты. На Рисунке 20 представлена электронная микрофотография золотых нанозвезд. Их средний размер около 50 нм. Большинство из представленных нанозвезд обладают пятью лучами. Также на фотографии можно видеть несколько сферических наночастиц, которые являются зародышами.

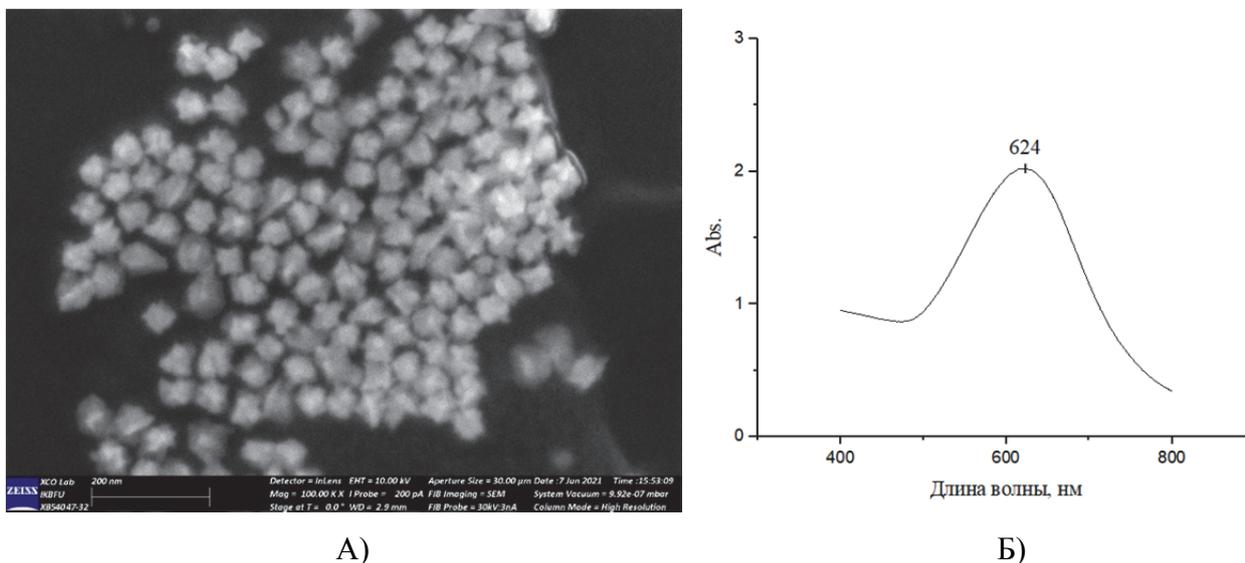


Рис. 20. Электронная микрофотография золотых нанозвезд (а) и их спектры поглощения с характерным максимумом 624 нм (б).

Был также проведен синтез оболочечных нанозвезд с целью повышения биосовместимости создаваемого сенсора. Раствор золотых нанозвезд центрифугировали 10 мин при 10000 g, затем разбавляли в 0,001 М растворе СТАВ. К 10 мл полученного раствора добавляли 10 мкл 0,1 М водного раствора NaOH при интенсивном перемешивании для достижения pH 10-11. После этого добавляли по 20 мкл 20%-го раствора TEOS в метаноле с интервалами в 30 минут при бережном перемешивании. Реакция протекала в течение 2 дней. По истечению этого времени, полученный раствор центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут и диспергировали в метаноле. Далее исследовались спектральные свойства и размеры наностержней. По данным фотонной корреляционной спектроскопии (Рис. 21) средний размер нанозвезд в оболочке (85,3 процента частиц) составляет  $33,460 \pm 9,842$  нм. Это больше, чем до покрытия кремнеземом ( $24,73 \pm 6,47$  нм), что говорит об успешном синтезе оболочечных частиц. Наличие 13,3 процентов наночастиц с радиусом 5,448 можно объяснить наличием отдельных кремнеземных наночастиц.

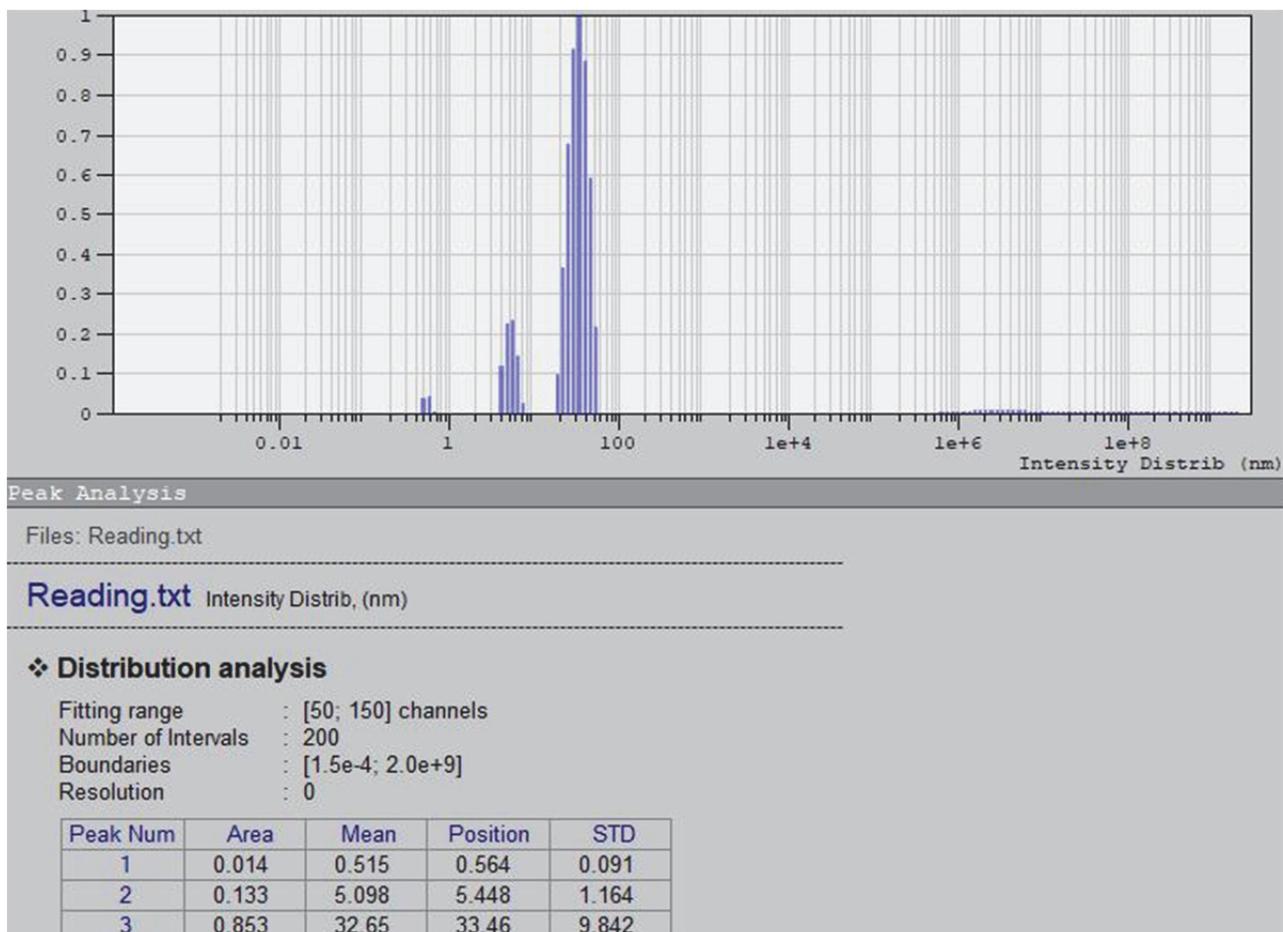


Рис. 21. Данные фотонной корреляционной спектроскопии для звездообразных наночастиц в кремнеземной оболочке.

На рисунке 22 представлена электронная микрофотография золотых нанозвезд в кремнеземной оболочке. Толщина полученной оболочки – около 20 нм. Помимо нанозвезд кремнеземом покрылись остаточные зародышевые частицы, а также образовалось незначительное количество отдельных кремнеземных наночастиц.

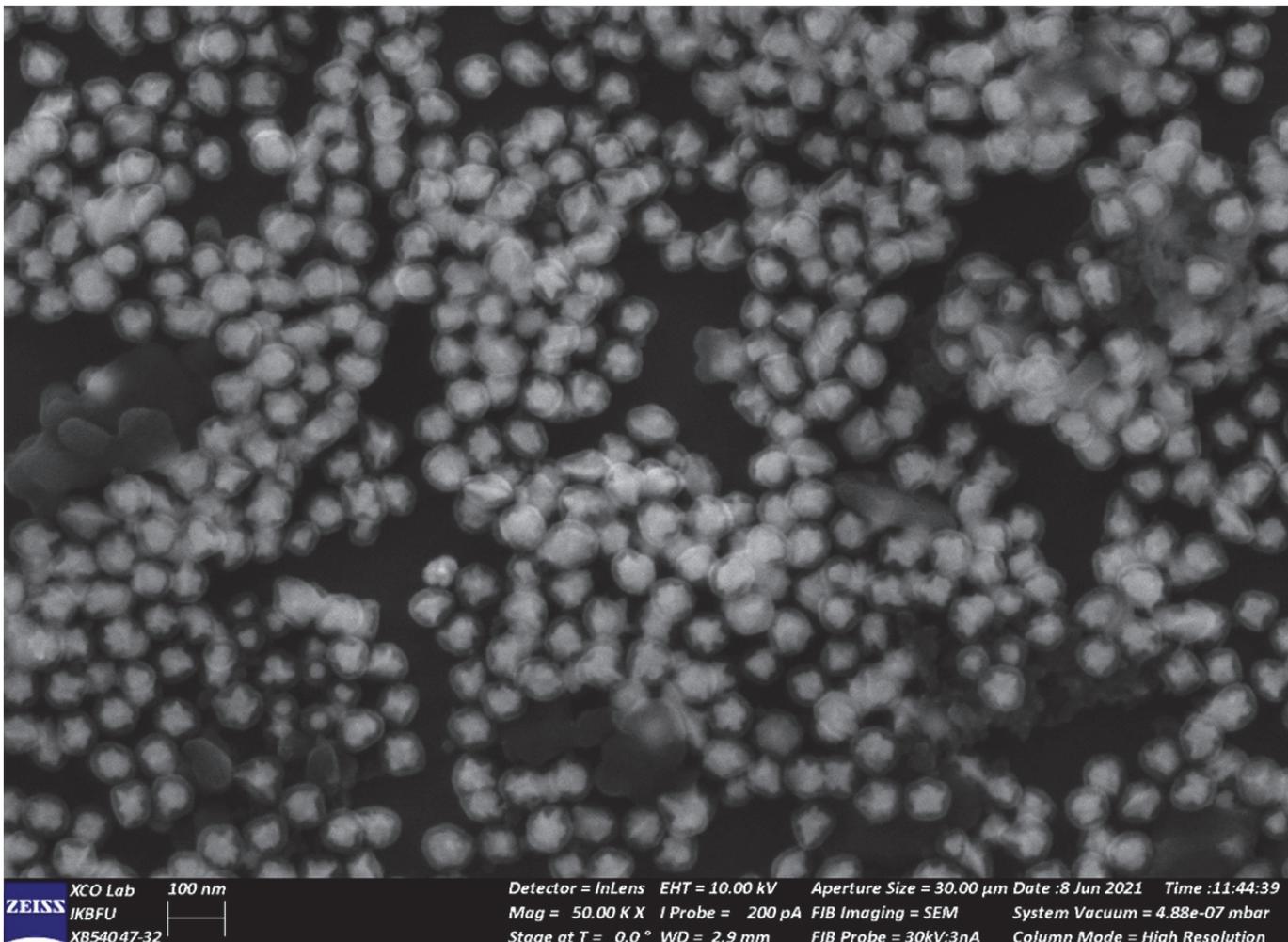


Рис. 22 - Электронная микрофотография золотых нанозвезд в кремнеземной оболочке

На Рисунке 23 изображены спектры поглощения нанозвезд с оболочкой и без нее. Наблюдается незначительное смещение пика на 1 нм. Это связано с увеличением локального показателя преломления вокруг частиц, что приводит к увеличению вклада рассеяния. Полученные результаты опубликованы в статьях [402, 403]. Теоретическая возможность применения подобных частиц ядро/оболочка была обоснована в работе [404].

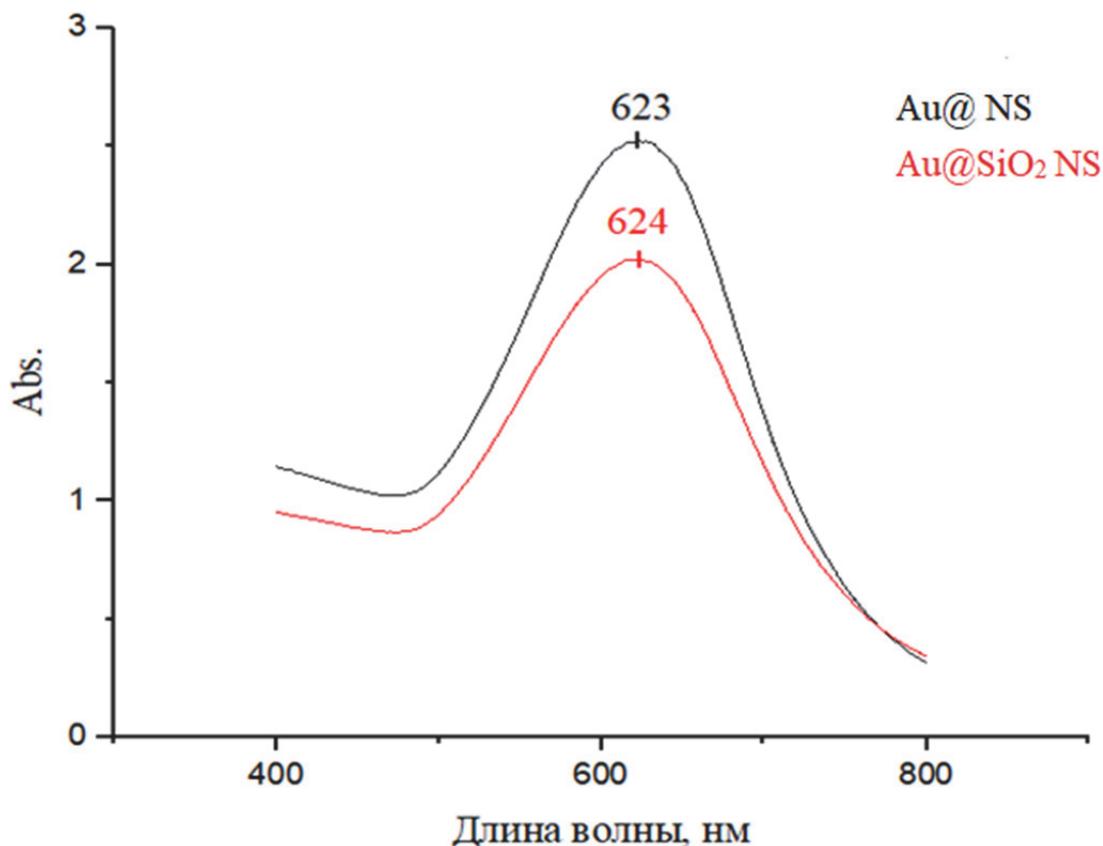
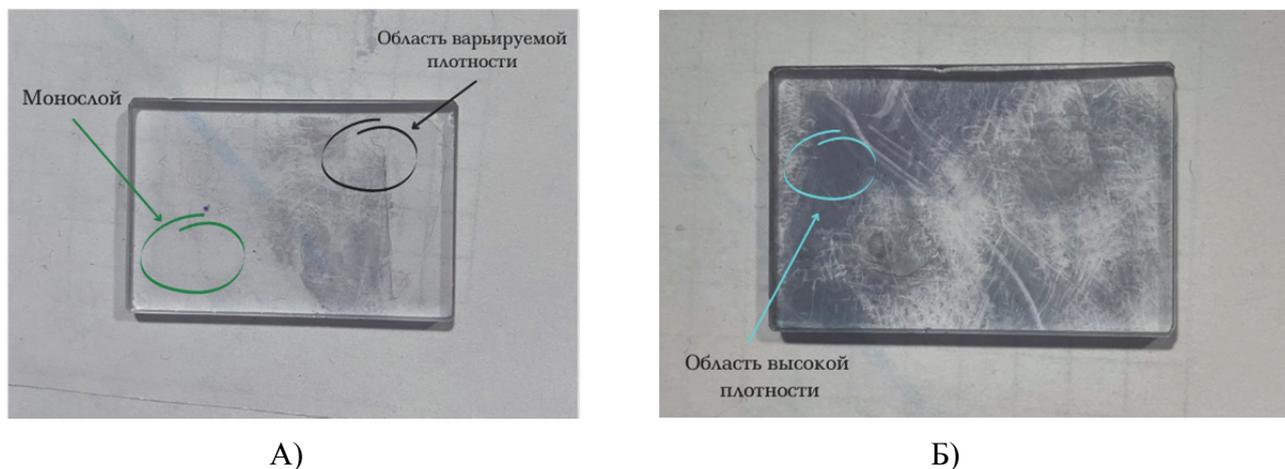


Рис. 23. Сравнение спектров поглощения нанозвезд в кремнеземной оболочке и без нее.

Для реализации функционализации поверхности стекол наночастицами была разработана и применена следующая методология. Были использованы оптически прозрачные кварцевые стекла марки КУ-1. Очистка стёкл осуществлялась многостадийным способом. Первым этапом пластины промывались в ультразвуковой ванне в течение 30 мин, в которой через каждые 10 мин происходила замена жидкости по следующей схеме: Milli-Q — изопропиловый спирт — Milli-Q. Далее пластины сушили при 90°C до полного высыхания. После чего стёкла вертикально помещали в термостойкую посуду с раствором пираньи (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1:3) и подогревали до 70° С. Через 30 мин пластину промывали 3 раза по 10 мин в ультразвуковой ванне с Milli-Q и сушили при 90°C до полного высыхания. Очищенные стёкла вертикально помещались в раствор 5% раствор АPTES и безводного толуола на 24 ч. Далее для очистки от излишек АPTES образцы последовательно погружали в ультразвуковую ванны с безводным этанолом (10 мин × 2 раза) и с сверхчистой водой (10 мин × 3 раза). После высыхания на поверхность АPTES-модифицированных стёкл адсорбировали синтезированные золотые наночастицы. Для этого пластины горизонтально погружали в коллоидные растворы и оставляли в покое на 12 и 24 ч. Через сутки стёкла (Рис. 24) промывали водой и использовали по назначению.



А)

Б)

Рис. 24. Фотографии исследуемых АРТЕС-модифицированных стёкол с изображением монослоя варьируемой плотности (а) и участками высокой плотности (б).

Данный прототип был далее использован для экспериментов комбинационного рассеяния света с модельным красителем. В рамках проведения экспериментальной части по получению спектров гигантского комбинационного рассеяния света с помощью созданных прототипов сенсоров на основе нанозвёзд на АРТЕС-модифицированных стёклах, использовался спектрометр Centaur U (ООО «НаноСканТехнология», Россия). Поскольку приготовленные нанозвёзды имеют широкий максимум плазмонного поглощения, начинающийся в районе 500 нм и заканчивающийся в ближнем инфракрасном диапазоне, в ходе эксперимента были использованы лазеры с длинами волн  $\lambda = 532$  нм и  $\lambda = 632$  нм, соотносящиеся со спектрами плазмонного поглощения прототипов. Также, поскольку установленный максимум плазмонного поглощения абляционного золота находился в области 532 нм и в целях усиления детектируемого сигнала комбинационного рассеяния, была использована титановая основа. Выбор титановой поверхности был обусловлен также возможностью генерации плазмонного резонанса шероховатой (анодированной) титановой поверхностью в области резонанса золотых НЧ подробная методология исследований изложена в нашей работе [368].

#### 2.4 Физический синтез коллоидных наночастиц платины для проведения спектрофлуорометрических исследований

Для получения плазмон-активных наночастиц в ультрафиолетовом диапазоне были выбраны наночастицы платины, а для получения наночастиц без «шубы», стабилизатора, уменьшающего эффективность переноса энергии был выбран и реализован метод физического синтеза наночастиц. Таким образом, с помощью фемтосекундной лазерной абляции, были синтезированы наночастицы платины. Была разработана методика синтеза и получены наночастицы с малым распределением по размерам. Для синтеза наночастиц также использовался одномодовый фемтосекундный лазер (лазерная система "Авеста ТЕТА-25/30", Россия) (длительность импульса  $\tau=280$  фс, частота повторения  $\nu=25$  кГц), работающий при  $\lambda=1032$  нм с

горизонтальной линейной поляризацией лазерного луча (Рис.25). В кювету с 1,5 мл воды погружалась пластина платины, чистота которой составляла 99% и проводилась абляция в течение 2 минут и 7 минут, в нескольких режимах с варьируемыми значениями тока от 4 А до 5,2 А с шагом 0,3 А. (Табл. 4)

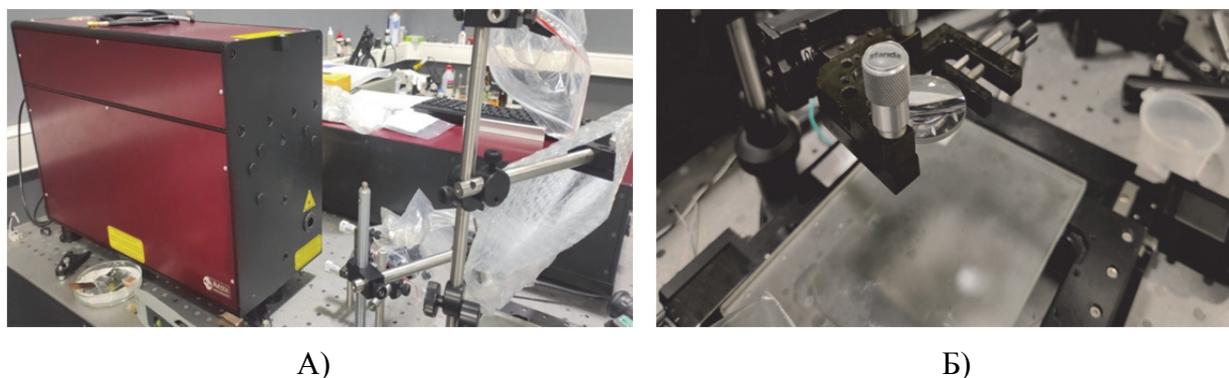


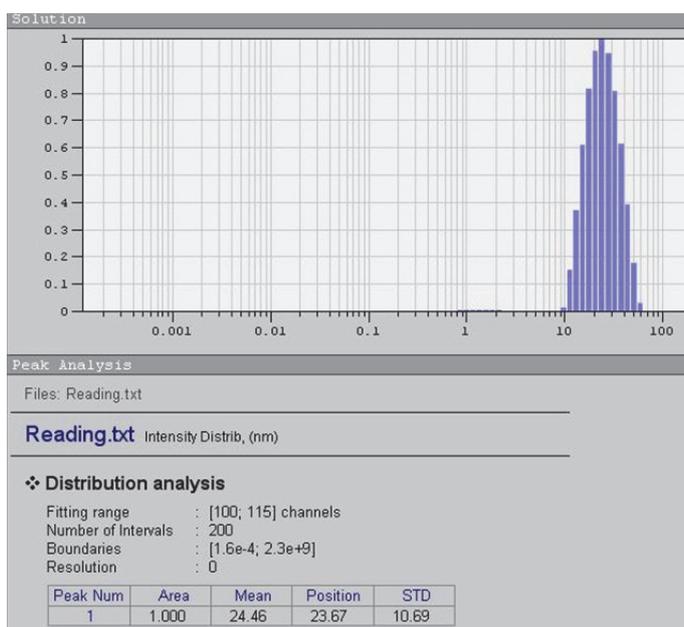
Рис. 25. Фемтосекундный лазер ТЕТА-Х (А) с системой позиционирования пучка (Б). В результате были отработаны режимы абляции платиновых наночастиц, полученные устойчивые коллоидные растворы частиц.

Таблица 4. Режимы абляции

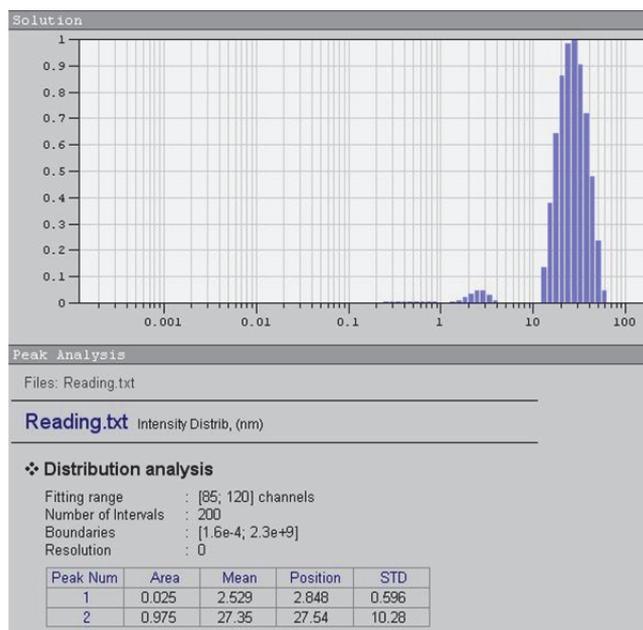
Номер пробирки	Дефект массы, г	Масса платины до абляции, г	Масса платины после абляции, г	Время абляции, мин	Мощность, Вт	Ток, А
1	0,0005	1,5461	1,5456	2	0,296	4.6
2	0,001	1,5456	1,5446	7	0,296	4.6
3	0,0004	1,5412	1,5408	2	0,408	4.9
4	0,0011	1,5408	1,5397	7	0,408	4.9
5	0,0001	1,5356	1,5355	2	0,123	4
6	0,0002	1,5330	1,5328	7	0,200	4.3
7	0,0001	1,5328	1,5327	2	0,200	4.3
8	0,0006	1,5327	1,5321	2	0,530	5.2
9	0,0012	1,5321	1,5309	7	0,530	5.2

11	0,0017	1,5264	1,5247	2	1,031	6.3
12	0,0008	1,5247	1,5239	1	1,031	6.3
13	0,0025	1,5202	1,5177	2	1,900	8.3
14	0,0013	1,5177	1,5164	1	1,900	8.3
15	0,001	1,5135	1,5125	1	1,383	7.3
16	0,0002	1,5125	1,5123	1	0,555	5.3
17	0,0001	1,5123	1,5122	1	0,193	4.3
18	0,0006	1,4797	1,4791	2	0,230	4.9
19	0,0006	1,4746	1,4740	2	0,270	5

Результаты исследования наночастиц платины, полученных абляционным методом. С помощью фемтосекундной лазерной абляции были синтезированы наночастицы платины. На рисунках 26-29 представлены результаты исследования абляционных наночастиц платины с помощью ФКС.

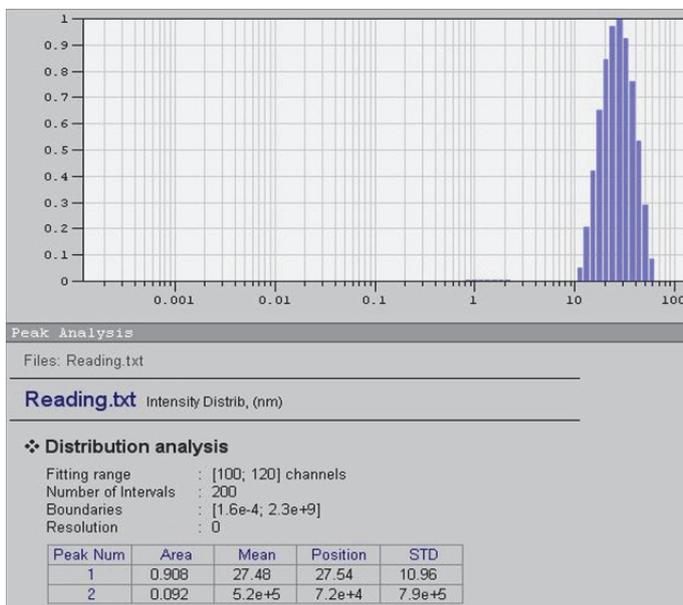


А)

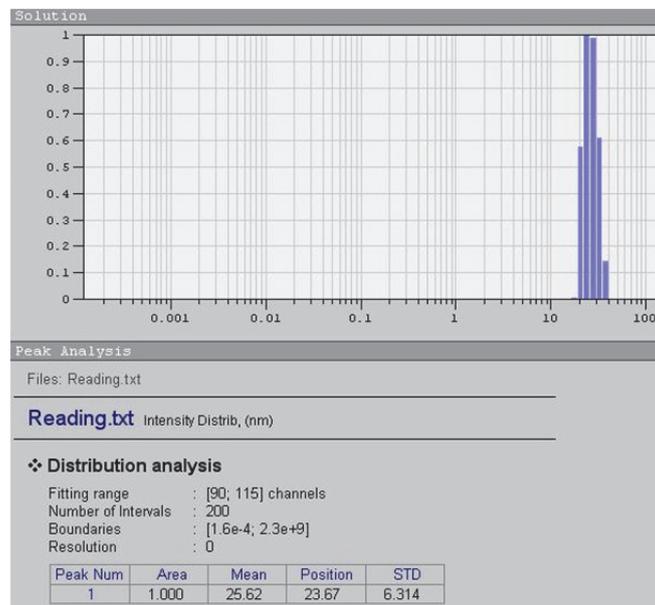


Б)

Рис. 26. Распределение по размерам, полученное при 2 мин; 296 мВт; 4,6 А. Радиусы: 24,46 нм (А) и Распределение по размерам, полученное при 2 мин; 408 мВт; 4,9 А. Радиусы: 27,35 нм (Б).



A)



B)

Рис. 27. Распределение по размерам, полученное при 2 мин; 123 мВт; 4 А. Радиусы: 27,48 нм (А) и распределение по размерам, полученное при 2 мин; 200 мВт; 4,3 А. Радиусы: 25,62 нм (Б).

Проанализировав полученные данные, был выбран режим, при котором наночастицы платины получились с малым распределением по размерам, их радиус равен 25,62 нм, размер 51 нм. Параметры соответствующие этому режиму: 2 мин, мощность: 0,530 В, ток: 5,2 А. С помощью спектрофотометрии были получены спектры поглощения абляционных наночастиц платины (Рис. 34).

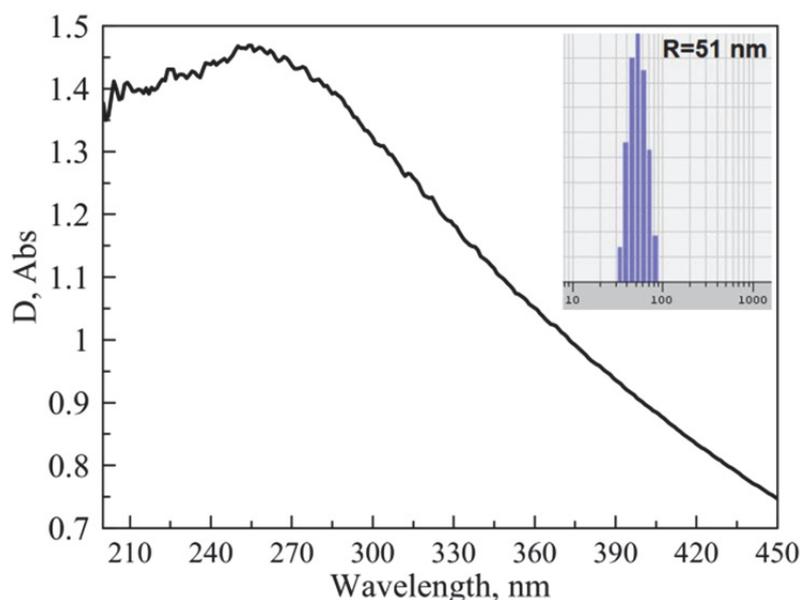


Рис. 28. Спектры плазмонного поглощения резонанса для абляционных наночастиц платины. В результате анализа оптических и морфологических характеристик, полученных наночастиц платины был определен режим абляции, при котором для наночастиц наблюдался выраженный пик плазмонного резонанса при длине волны максимума, близкой к  $\lambda=260$  нм. Была отработана методика синтеза монодисперсных наночастиц платины, установлены различные режимы мощности и подобран такой режим, при котором получались монодисперсные наночастицы с

узким распределением по размерам, а также посчитаны концентрации для всех абляционных частиц. Было замечено, что интенсивность спектров поглощения зависит от концентрации растворов. Кювета с жидкостью и пластиной платины была помещена на амоторном позиционере 8 MTF-102LS05 (Standa, Литва), (Рис.29) управляемом программным обеспечением XILab.

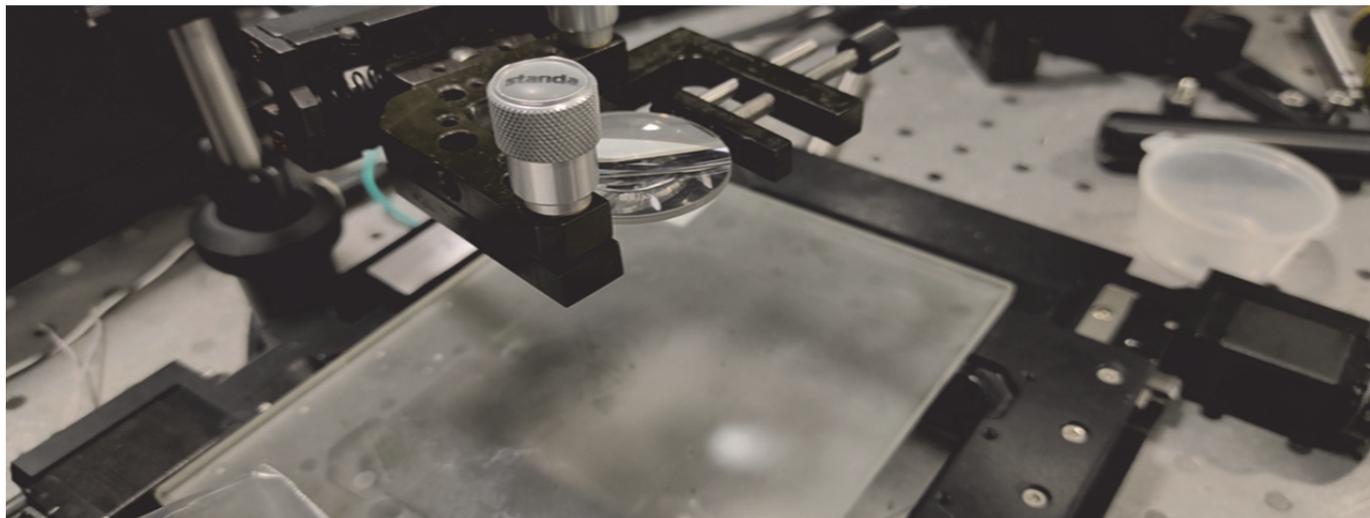


Рис. 29. Оптическая схема позиционирования луча для проведения абляции

## **2.5 Оценка плазмонной генерации планарных и коллоидных оптических сенсоров для исследований клеточных структур.**

Для качественного выявления спектральных маркеров, дифференцирующих выборки тромбоцитов и бактериальных клеток и выявления их спектральных особенностей было необходимо получение разрешенных спектров ГКРС. Для этого была проведена оценка плазмонной генерации вблизи поверхности оптических сенсоров. На основании анализа изображений при заданных параметрах лазерного структурирования на поверхности золота могут формироваться микро- и наноструктуры, на которых можно наблюдать процессы плазмонного преобразования энергии [313, 314]. Далее эти процессы моделировались методом FDTD на наноразмерных участках исследуемых поверхностей. Максимальный общий рассчитанный коэффициент усиления (EF) составил  $10^3 - 10^4$  в зависимости от положения монитора (Табл. 7). Внедрение структур с острым конусом в область моделирования не привело к значительному увеличению напряженности электрического поля (E), хотя в целом прогнозируемый уровень сигнала SERS увеличивался. Наибольшее возмущение электрического поля возникало между димерами цилиндров на поверхности структур в обоих случаях. Принимая во внимание вышеизложенный факт, для лучшей адсорбции веществ на поверхности и для достижения ими горячих точек, что приводит к достижению высоких коэффициентов усиления SERS, необходимо изготавливать кластерные поверхности.

Для оценки усиления ГКРС существуют различные подходы, описанные детальнейшим образом в [398]. Для оценки усиления сигнала комбинационного рассеяния света красителя Р6Ж использовалась аналитическая формула, представляющая наиболее подходящей для

практических задач (12). С помощью нее были рассчитаны коэффициенты усиления гигантского комбинационного рассеяния света по формуле:

$$EF = \frac{I_{\text{ГКРС}} \cdot C_{\text{КРС}}}{I_{\text{КРС}} \cdot C_{\text{ГКРС}}}$$

(12)

где  $I_{\text{ГКРС}}$  и  $I_{\text{КРС}}$  - интенсивность ГКР и КР на выбранной частоте соответственно,  $C_{\text{ГКРС}}$  и  $C_{\text{КРС}}$  - концентрация веществ в эксперименте с ГКР и КР соответственно.

Таблица 5. Результаты моделирования FDTD и экспериментальная интенсивность SERS

Тип/параметры морфологии	Локальное поле, $E$ , В/м	$EF  E/E_0 ^4$ $10^4$ $xz$	$EF  E/E_0 ^4$ $10^4$ $yz$	Интенсивность ГКРС сигнала, отн. ед. $xz$	Интенсивность ГКРС сигнала, отн. ед. $yz$	Экспериментальный коэффициент ГКРС $EF 10^4$
«Круг»	88	14.10	0.35	120	60	1.12
«Сетка»	47	8.30	3.65	290	195	0.27

Таким образом, было показано, что усиление фотопроцессов вблизи металлических поверхностей может быть реализовано поверхностными плазмонами и оценено методами спектроскопии рассеяния и флуоресценции. [315,316].

Для оценки плазмонной генерации, мы использовали SERS на молекулах R6G для оценки  $EF$  комбинационного рассеяния. На рис. 30а показаны спектры SERS R6G для рыболовной сети в «перекрестках» (рис. 30б) и «каналах» (рис. 30а) в наноструктурированной области. Сигнал SERS существенно не отличался, реализовав усиление SERS до  $2,7 \cdot 10^3$ .

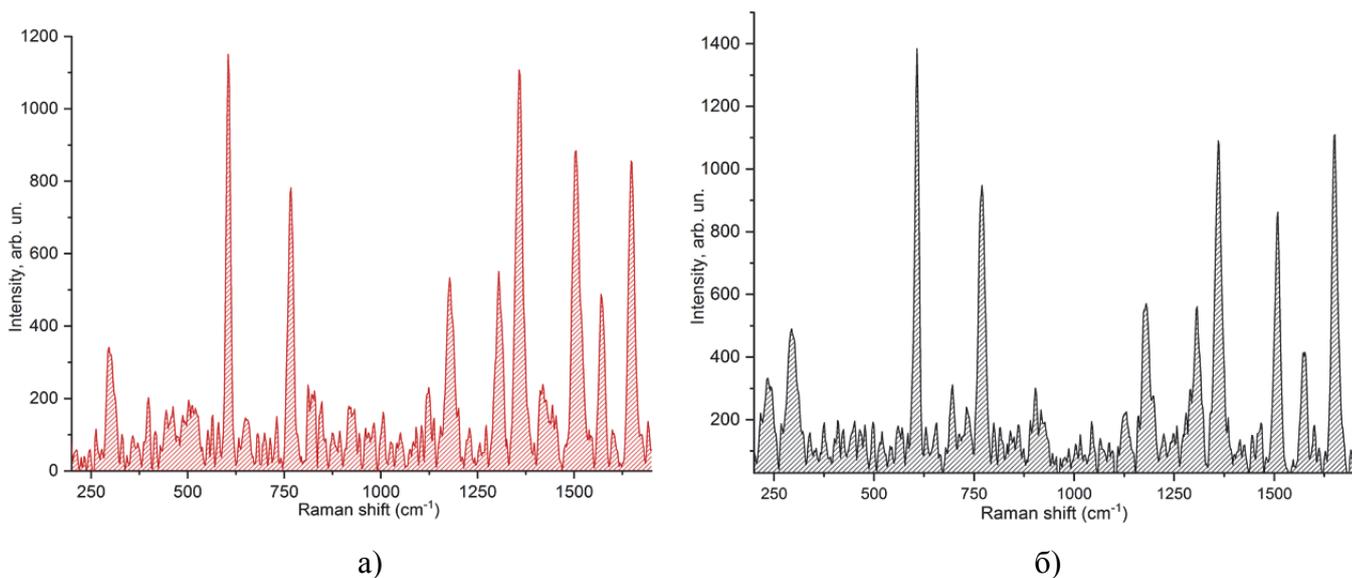


Рис. 30. Спектры ГКР сетчатых конструкций при различном расположении лазерного луча: в канавке после прохождения лазерного луча (а), в «перекрестке» после прохождения лазерного

луча (б). В обоих случаях применялся ND-фильтр, уменьшающий интенсивность лазерного луча в 100 раз.  $\lambda_{\text{возб}}=532$  нм. С другой стороны, для структур типа кругов обнаружено различие в сигнале SERS в зависимости от положения лазерного луча. В случае расположения лазерного пятна между двумя окружностями (рис. 31а) EF SERS в 4,97 раза выше (рис. 31а и рис. 31б) по сравнению с таковым для лазерного пятна, расположенного во внутренней боковой стенке канавки. Максимальное полученное усиление составило  $1,12 \cdot 10^4$  для сгруппированной поверхности.

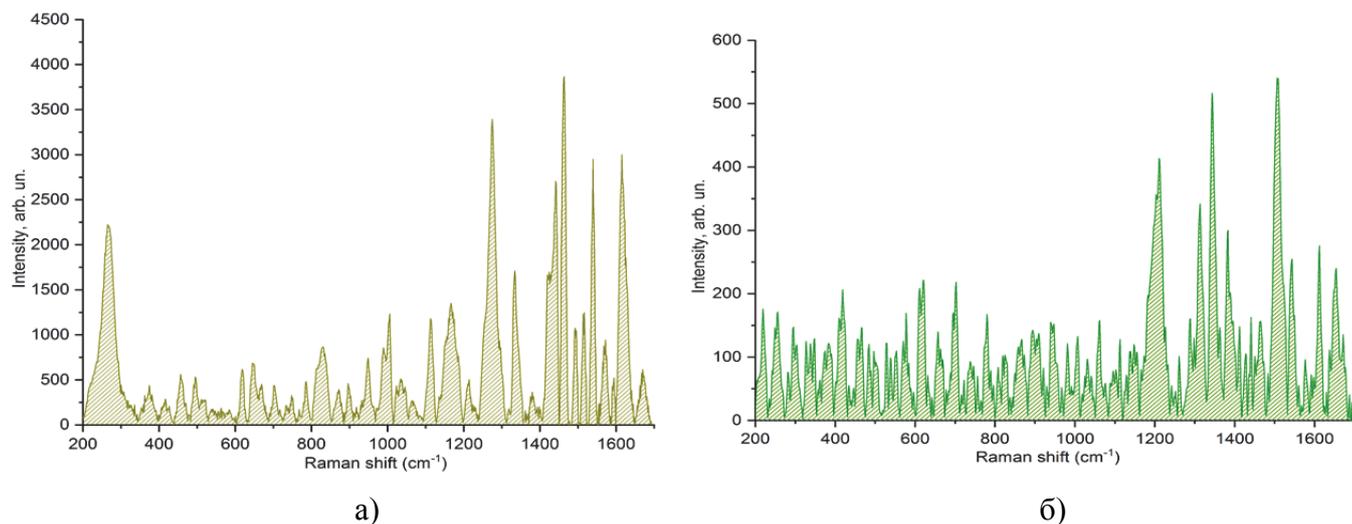


Рис. 31 Спектры ГКР для окружностей при различном расположении лазерного луча: между двумя окружностями в образце (а) и во внутренней боковой стенке после прохождения лазерного луча (б). В обоих случаях применялся ND-фильтр, уменьшающий интенсивность лазерного луча в 100 раз.  $\lambda_{\text{возб}}=632,8$  нм.

Предложен гибкий математический подход на основе метода конечных разностей во временной области (FDTD) для моделирования электромагнитных полей вблизи золотых поверхностей, сформированных методом LIPSS. Полученные расчёты демонстрируют высокую степень согласования с экспериментальными данными. В ходе исследования были рассмотрены две морфологии LIPSS: круговые структуры и решётки. Для моделирования поверхностей использовались различные элементы геометрии, позволяющие более точно воспроизвести их структуру. Исследованы и описаны морфологические свойства поверхностей. ГКРС использовался для анализа каждого типа поверхностей. Было показано, что большой КУ ГКРС реализовался на сгруппированных поверхностях. Показана перспективность теоретического подхода к LIPSS для оценки оптимальных параметров усиления поля и светорассеяния. Представленный подход может быть использован в качестве основы для выполнения методов контролируемого синтеза LIPSS и других методов изготовления поверхности.

Для усиления гигантского комбинационного рассеяния света вблизи АPTES-модифицированных кварцевых поверхностей был выбран флуороновый краситель родамина 6Ж (Р6Ж). Свежеприготовленные водные растворы Р6Ж с концентрацией  $10^{-4}$  моль/л добавляли по несколько капель объемом  $V = 2$  мкл на разные части подготовленной поверхности: участки высокой плотности НЧ, участок варьируемой плотности НЧ, монослой нанозвёзд, сушили при

стандартных условиях и помещали на предметный столик микроскопа. С помощью USB-видеокамеры производилась фокусировка лазерного луча на поверхность образца вручную. Спектры гигантского комбинационного рассеяния регистрировались в диапазоне  $250\text{ см}^{-1}$ – $2500\text{ см}^{-1}$ . Прибор калибровали перед оценкой каждой серии образцов с помощью кремниевого стандарта (Nogiba, Япония) при статическом спектре с центром при  $519,8\text{ см}^{-1}$  в течение 10 с. Все спектральные данные были сохранены после регистрации в виде файлов .txt для дальнейшей оценки. На Рисунке 48 представлены спектры ГКРС родамина 6Ж с  $10^{-4}$  моль/л, полученные на разных областях анализируемого стекла: участки высокой плотности НЧ, участок варьируемой плотности НЧ, монослой нанозвёзд (без явных разводов и пятен). В данном эксперименте была проведена съёмка 14 образцов варьируемых концентраций при длине волны излучения  $\lambda = 532\text{ нм}$ , мощность лазера в ходе эксперимента не изменялась и оставалась максимальной, равной 50 мВт. Съёмка проводилась в течение 30 секунд, количество повторов оставалось постоянным - 3 раза. Для правильной оценки графиков, регистрация спектров была произведена в нескольких разных точках для одной из областей (внутри каждой анализируемой капли родамина 6Ж снималось по 5 точек).

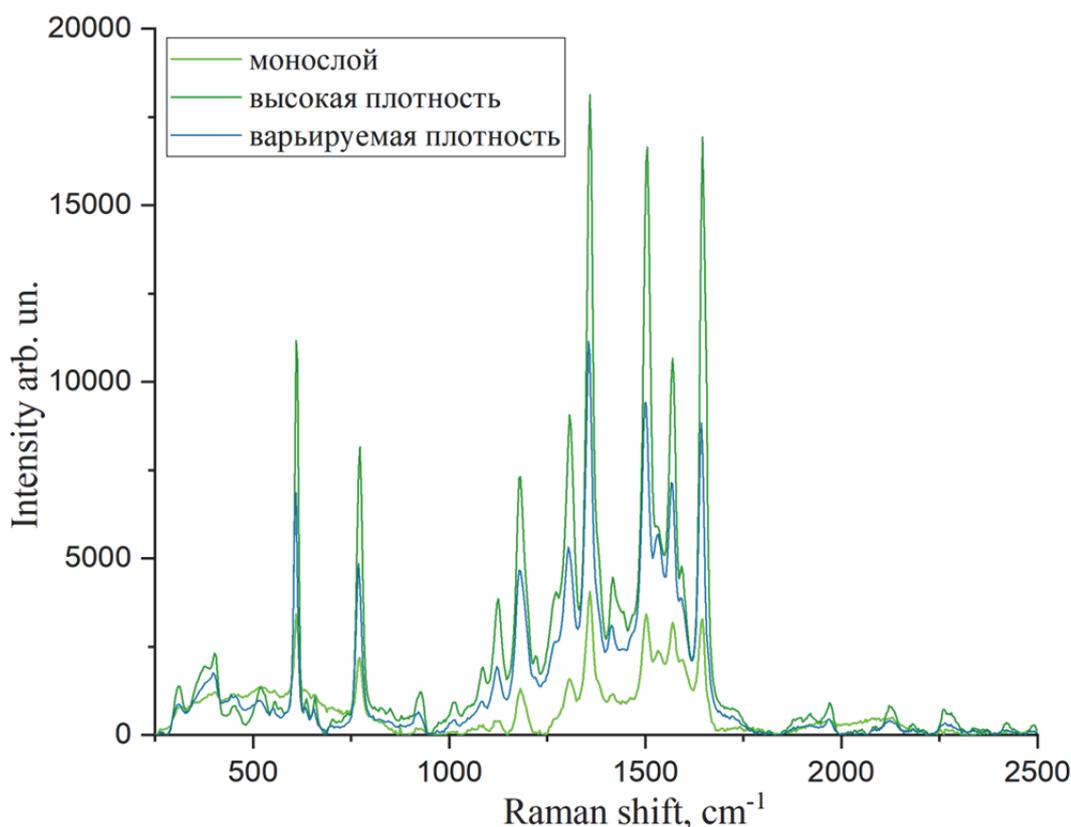


Рис. 32. Спектры ГКРС Р6Ж с концентрацией  $10^{-4}$  моль/л, полученные на разных областях анализируемого стекла: участки высокой плотности НЧ, участок варьируемой плотности НЧ, монослой нанозвёзд [400]

На графиках, представленных на Рисунке 32, видно, что интенсивность рассеяния света Р6Ж зависит от концентрации нанозвёзд на поверхности стекла: при большой концентрации частиц (мутные пятна) наблюдается большая интенсивность рассеяния. Следует отметить, что при попадании лазерного луча в области малой концентрации нанозвёзд сигнал сильно зашумлён, что

усложняет анализ полученных спектров. Зависимость интенсивности полученных максимумов от концентрации нанозвёзд (их пространственное распределение), рассмотрев несколько характеристических максимумов для родамина 6Ж, приведенных в таблице 6.

Таблица 6. Полученные экспериментальные параметры ГКРС для красителя Р6Ж.

Положение максимума	609 $\text{cm}^{-1}$	1359 $\text{cm}^{-1}$	1559 $\text{cm}^{-1}$
<b>Монослой</b> Интенсивность, отн. ед.	217	4062	1287
<b>Варьируемая плотность НЧ</b> Интенсивность, отн. ед.	6856	10744	5661
<b>Высокая плотность НЧ</b> Интенсивность, отн. ед.	11166	18126	7030

В ходе данного эксперимента проведена съёмка одного образца при длине волны излучения  $\lambda = 632$  нм. В этом случае проводился анализ монослоя нанозвёзд на поверхности стекла. Съёмка проводилась в течение 30 секунд, количество повторов оставалось постоянным - 3 раза. Для правильной оценки графиков, регистрация спектров была произведена в нескольких точках на поверхности стекла. Всего таких точек было 10. Полученный результат и сравнение его с ранее полученными данными при использовании возбуждения  $\lambda = 532$  нм представлены на Рисунке 33.

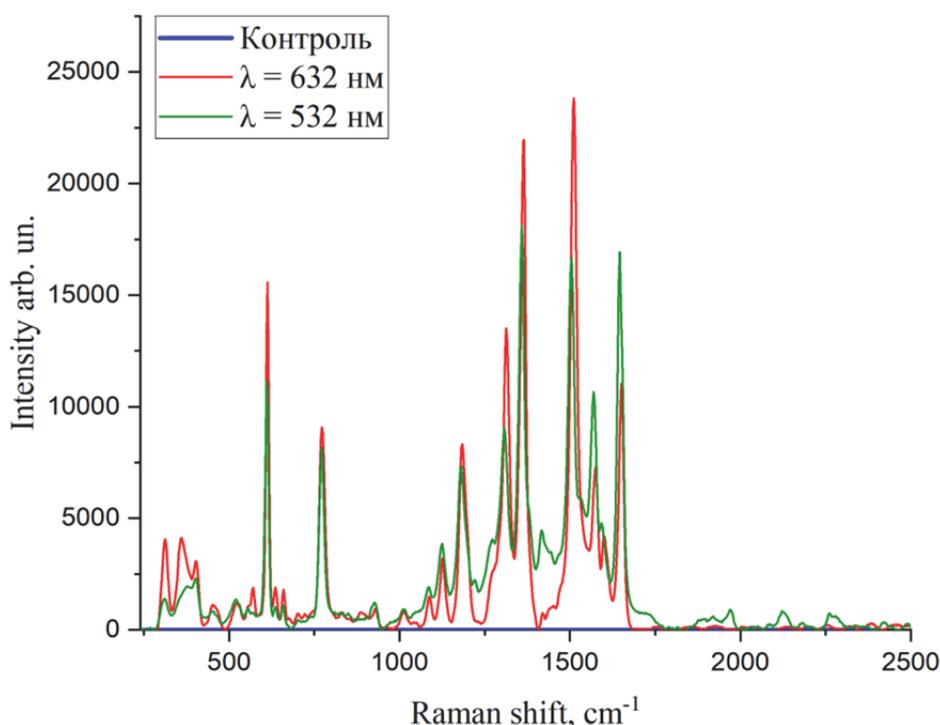


Рис. 33. Спектры ГКРС Р6Ж с концентрацией  $10^{-4}$  моль/л, полученные при разных длинах волн возбуждения (красная и зелёная линии) и спектр контроля (синяя линия).

Для графического отражения эффекта ГКРС, на графике добавлен график контроля - капля родамина 6Ж, снятая при таких же условиях на простом кварцевом стекле. Анализируя полученные графики, можно заметить, что интенсивность спектра комбинационного рассеяния света имеет малую концентрацию (максимальная интенсивность сигнала не превышает 4 отн. ед.), поэтому можно наблюдать значительное усиление интенсивности рассеяния красителя. Максимальное значение интенсивности (23817 отн. ед) наблюдается для максимума в области  $1512 \text{ см}^{-1}$  при использовании длины волны возбуждения 632 нм. Несложно заметить, что при использовании данной длины волны общая интенсивность анализируемого красителя выше, чем при использовании лазера с длиной волны 532 нм:

Таблица 7. Полученные экспериментальные параметры ГКРС для красителя Р6Ж при разных источниках возбуждения.

Положение максимума	$609 \text{ см}^{-1}$	$772 \text{ см}^{-1}$	$1359 \text{ см}^{-1}$	$1512 \text{ см}^{-1}$
$\lambda = 632 \text{ нм}$ Интенсивность, отн. ед.	13058	9066	19527	23817
$\lambda = 532 \text{ нм}$ Интенсивность, отн. ед.	11166	8148	18126	16535

Стоит отметить, что мощность лазера с длиной волны 632 нм меньше, чем мощность лазера с длиной волны излучения 532 нм (17 мВт и 50 мВт соответственно), а длина волны красного лазера находится ближе к максимуму плазмонного поглощения, чем длина волны зелёного лазера. Из рисунка 51 можно сделать вывод, что полученные нанозвёзды более эффективны при использовании лазера с длиной волны излучения 632 нм (и более длинноволновых), поскольку при меньшей мощности лазерного излучения наблюдается более интенсивный сигнал.

Полученные результаты для разных условий эксперимента представлены в таблице 8.

Таблица 8. Полученные экспериментальные параметры ГКРС для красителя Р6Ж для разных толщин нанозвезд на поверхности оптического сенсора.

Длина волны излучения, нм	Место регистрации	Область регистрации, $\text{см}^{-1}$	Интенсивность КРС, отн. ед.	Интенсивность ГКРС, отн. ед.	Коэффициент усиления
632	монослой	1512	2,13	23817	$1,12 \cdot 10^4$
632	монослой	1359	2,11	19527	$9,2 \cdot 10^3$

532	варьируемая плотность	1355	2,14	11145	$5,16 \cdot 10^3$
532	высокая плотность	1512	2,20	1797	$5,4 \cdot 10^3$
532	высокая плотность	1359	1,98	53247	$2,69 \cdot 10^4$
532	монослой	1358	1,98	1287	$6,50 \cdot 10^2$

Как видно из расчётов наибольшее усиление интенсивного рассеянного света было зарегистрировано в двух случаях: при анализе монослоя с длиной волны излучения 632 нм и при анализе мест с большой концентрации нанозвёзд на поверхности стекла (мутные участки). При соблюдении данных условий можно получить усиление сигнала порядка  $10^4$ .

Принимая во внимание вышеизложенные факты, можно сделать вывод, для получения большего усиления ГКРС необходимо подбирать условия, основываясь на интенсивности пика плазмонного поглощения. Поскольку максимум плазмонного поглощения исследуемых нанозвёзд находится при значении длины волны возбуждения 618 нм, для более эффективного усиления сигнала ГКРС следует использовать лазер с длиной волны 632 нм, поскольку можно наблюдать усиления сигнала порядка  $10^4$  даже на монослое нанозвёзд, когда при идентичных условиях при использовании лазера с длиной волны 532 нм можно получить усиление порядка  $10^4$ .

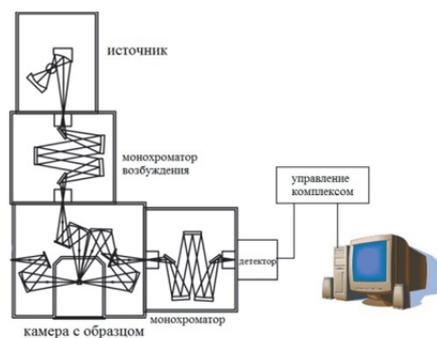
## 2.6. Оптические исследования тромбоцитов

### 2.6.1 Спектральные и время-разрешенные флуоресцентные исследования тромбоцитов

Исследование люминесценции тромбоцитарной массы проводилось с помощью исследовательского комплекса Fluorolog-3 (Horiba, Япония), предназначенного для регистрации спектров возбуждения, люминесценции, определения времен жизни возбужденных состояний молекул, изучения механизмов молекулярной динамики в жидких средах. Возбуждение производилось ксеноновой лампой мощностью 450 Вт, взятой в качестве источника широкополосного непрерывного излучения и регистрационной системе, действующей на принципе счета единичных фотонов. Образцы тромбоцитов помещались в виде капли на оптически прозрачное стекло марки КУ-1, а затем в держатель для образцов прибора. Световой поток проходил через двойной монохроматор возбуждения по схеме Черни-Тернера с плоской дифракционной решеткой с углом блеска, оптимизированным для ультрафиолетовой области (330 нм), затем, после взаимодействия с образцом, через двойной монохроматор регистрации по схеме Черни-Тернера с плоской дифракционной решеткой с углом блеска, оптимизированным для видимой области (500 нм). Спектрометр и его принципиальная схема изображена на Рис. 30а и 30б соответственно.



А)



Б)

Рис. 34. Исследовательский комплекс Fluorolog-3 (А) его принципиальная схема (Б)

При регистрации квантового выхода для САЧ была использована специализированная приставка Fluorolog-3 – интегрирующая сфера Quanta-φ, изображенная на Рис. 31



Рис. 35. Интегрирующая сфера Quanta-φ

В данной приставке излучение источника путем волновода подавалось на образец в интегральную сферу. Излучение образца передавалось в основной модуль, затем, с помощью второго волновода, – в эмиссионный монохроматор. Конструктивно сфера имеет высокий индекс отражения  $R = 95\%$  в интервале длин волн от 250 до 2500 нм. Результирующий спектр основан на сравнении спектров люминесценции образца и пустой сферы. Квантовый выход  $\varphi$  определялся по формуле:

$$\varphi = \frac{I_s - I_{sph}}{L_s - L_{sph}}, \quad (11)$$

где  $L = \Phi M / (\pi S)$ ;  $M = R / [1 - R(1 - f)]$  (здесь  $\Phi$  - световой поток,  $S$  – площадь освещения,  $\theta$  – угол отражения,  $f \sim 0,03$ ), где  $I_s$  – интенсивность флуоресценции образца;  $I_{sph}$  – интенсивность

флуоресценции сферы без образца;  $L_a$  – яркость, определяемая плотностью потока излучения сферы без образца;  $L_s$  – яркость, определяемая плотностью потока излучения сферы с образцом;  $M$  – интегральный множитель сферы (10 – 30). Для выполнения экспериментов образцы отбирались у здорового добровольца в течение двух недель. На 1, 4, 7, 10 и 14 сутки брали 15 экспериментальных проб. Письменное информированное согласие было получено до проведения процедур исследования. Все документы исследования, включая информированное согласие и протокол, были одобрены независимым локальным этическим комитетом Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта (протокол № 8 от 16.05.2019 года). Возраст добровольца, включенного в исследование, составлял 35 лет, он не имел острых и хронических заболеваний, вредных привычек. Вовлеченный пациент не принимал никаких антитромботических препаратов во время исследования. Пробоподготовка тромбоцитов проводилась в соответствии с ранее разработанным протоколом [308,399]. В рамках данного протокола образцы свежей венозной крови, которые были взяты у здорового добровольца помещались в вакуумную пробирку, содержащую ЭДТА (пробирки BD Vacutainer® K2EDTA с распылительным покрытием). Образцы центрифугировались при 60 g в течение 15 минут для отделения богатой тромбоцитами плазмы (PRP), а затем PRP собирали и помещали в новую пробирку. Красные кровяные тельца удалялись. В итоге, тромбоциты собирали путем дальнейшего центрифугирования супернатанта при 1500 g в течение 15 мин. Все этапы центрифугирования проводили при 4°C на центрифуге Eppendorf 5702R. После приготовления тромбоцитов образцы сразу же отбирали для исследования с помощью флуоресцентной спектроскопии. Для проведения измерений флуоресценции, времени жизни и квантового выхода было подготовлено 15 оригинальных образцов PRP. Для получения экспериментальных образцов без и с НЧ платины образцы были разделены на две пробирки по 15 мкл каждая. Затем для получения той же концентрации тромбоцитов в первую пробирку добавляли 15 мкл водного раствора хлорида натрия, а во вторую – 15 мкл коллоидного раствора НЧ платины. После этого каждый образец слегка встряхивали. В результате для экспериментальной части было подготовлено 30 образцов (15 образцов без НЧ платины и 15 образцов с НЧ платины). Мы использовали прозрачные кварцевые кюветы и подложки UV-VIS для всех экспериментов со спектральным и временным разрешением. Прозрачное УФ-видимое кварцевое стекло размером 4 × 4 × 1 мм помещалось в кварцевый держатель размером 30 × 20 × 3 мм. Все кварцевые кюветы и держатели очищали изопропиловым спиртом, промывали водой Milli-Q (18,2 МОм/см) и сушили при комнатной температуре в закрытом чистом боксе. Затем на каждую из двух подложек наносили по 5 мкл образца и оставляли в покое до полного высыхания (~30 мин). Затем, спектры массы тромбоцитов регистрировали на приборе Fluorolog-3 FL3-22 (Horiba Jobin Yvon). Подложки с пластинчатой массой закрепляли на кварцевом стекле и устанавливали в твердотельный держатель образцов модели 1933 под углом 60° к возбуждающему лучу. Источником непрерывного возбуждения служила ксеноновая короткодуговая лампа мощностью 450 Вт. Ширина входной и выходной

щелей составляла 5 нм. Использовалась решетка 1200 шт/мм. Исследования флуоресценции тромбоцитарной массы проводили в УФ-диапазоне с пиком возбуждения 280 нм, соответствующим спектрам поглощения и флуоресценции аминокислотных групп (Trp, Tyr, Phe), входящих в состав/структуру тромбоцитов. Также следует отметить, что абляционные НЧ Pt имеют максимум поглощения при длине волны  $\lambda = 260$  нм. Перекрытие спектров поглощения аминокислот и НЧ Pt позволяет наблюдать плазмон-индуцированный резонансный перенос энергии (PIRET). Измерение квантового выхода проводили с помощью интегральной сферы (Quanta-ф, Horiba). Квантовые выходы излучения твердых образцов были получены с помощью интегрирующей сферы «Кванта-ф» диаметром 152 мм, покрытой Spectralon®, с использованием в качестве источника возбуждения ксеноновой лампы мощностью 450 Вт, соединенной с монохроматором с двойной решеткой для выбора длин волн. В качестве контрольных образцов регистрировали также спектры флуоресценции Trp, Tyr и Phe (Sigma). Моделирование Гаусса для спектров тромбоцитов было выполнено с использованием программного обеспечения Magic Plot [308].

Время жизни флуоресценции тромбоцитов измеряли на установке Fluorolog-3 FL3-22 с использованием программного обеспечения Data Station. В качестве источника возбуждения использовался импульсный лазерный диод NanoLED, работающий на длине волны возбуждения  $\lambda = 280$  нм (Horiba Jobin Yvon) [308]. Стекла с пластинчатой массой закреплялись в держателе твердых образцов модели 1933 г. под углом  $60^\circ$  к возбуждающему лучу. Значение преобразователя время-амплитуда (ТАС) составляло 100 нс (0,01455 нс/канал). Коаксиальная задержка составляла 5 нс. Щель была установлена как 8 нм. Пиковое предустановленное значение составляло 1000 отсчетов. Регистрация эмиссии света устанавливалась на 330 нм. Время жизни флуоресценции рассчитывали с помощью программы DAS6. Для расчета времени жизни флуоресценции использовалась модель с одним экспоненциальным затуханием. В расчетах значения стандартного отклонения (XSQ) находились в диапазоне 1,15 - 1,23. После съемки данные были записаны в текстовые файлы для дальнейшей обработки.

### **2.6.2 Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света тромбоцитов**

В рамках выполненных исследований были разработаны и внедрены методики съемки тромбоцитов в капле жидкости, объемом 5 мкл как без, так и с добавлением коллоидного золота в равном объеме. Была оценена применимость лазерного излучения варьируемой длины волны (473 нм, 532 нм, 632 нм) и выполнена оценка их эффективности для спектральной съемки. Было установлено, что источник возбуждения длиной волны 473 нм обладает как слишком большой энергией и повреждает тромбоциты, так и не соответствует максимуму плазмонного возбуждения в зеленой области (532 нм), что уменьшало эффективный коэффициент плазмонного усиления. Была отработана оптимальная методика для получения разрешенных спектров, при которой

использовался спектрометр Centaur U HR с решеткой монохроматора 1200 шт/мм, обеспечивающей спектральное разрешение  $2,5 \text{ см}^{-1}$  в диапазоне съемки  $400\text{-}1800 \text{ см}^{-1}$ . В процессе реализации выработанной методики съемки образцы тромбоцитов помещались на модифицированные золотом титановые поверхности. Оптимальным объемом образца был выбран объем 5 мкл, после помещения, которого на поверхность производилась его высушивание в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего образец помещался на держатель микроскопа. Оптимальным источником возбуждения для регистрации спектров тромбоцитов являлся лазер DPSS 532 нм. Лазерный луч фокусировался на образце вручную с помощью USB-видеокамеры и механической системы позиционирования. Оптимальный размер лазерного пятна составлял  $1 \times 15 \text{ мкм}$  при мощности лазера 35 мВт. Оптимальное время регистрации сигнала составляло 70 секунд. Для каждого образца снималось три повтора, после чего спектр арифметически усреднялся. Спектры комбинационного рассеяния регистрировали в диапазоне волновых чисел «отпечатка пальца» в диапазоне от  $400 \text{ см}^{-1}$  до  $1800 \text{ см}^{-1}$ . Для получения разрешенных спектров применялась фильтрация шумов по методу Савицкого-Голея с аппроксимацией по 12 окнам. Для максимально-подробной расшифровки спектров и оценки изменений в них использовалась ручная расшифровка низкочастотного ( $400\text{-}800 \text{ см}^{-1}$ ) по и среднечастотного ( $800 - 1800 \text{ см}^{-1}$ ) диапазона по колебательным группам, а также литературные данные. В результате были апробированы методики как инкубации с наночастицами золота, так и спектральной съемки тромбоцитов на наноструктурированных титановых поверхностях модифицированных абляционными частицами золота. В случае инкубации тромбоцитов с наночастицами золота, коллоидное золото, полученное с помощью метода фемтосекундной лазерной абляции добавлялось в количестве 5 мкл к 5 мкл тромбоцитарной взвеси. Съемка проводилась как в капле жидкости, так и на высушенной поверхности. ГКР-спектроскопия тромбоцитов с помощью инкубации с наночастицами оказалось низкоэффективной. В дальнейшем авторы планируют создать функционализированные антителами наночастицы с адресным наведение частицы на рецептор P2Y12 тромбоцита. Съемка на шероховатой поверхности позволила успешно снять ГКР-спектры тромбоцита с усилением КР-сигнала до  $10^2$  раз.

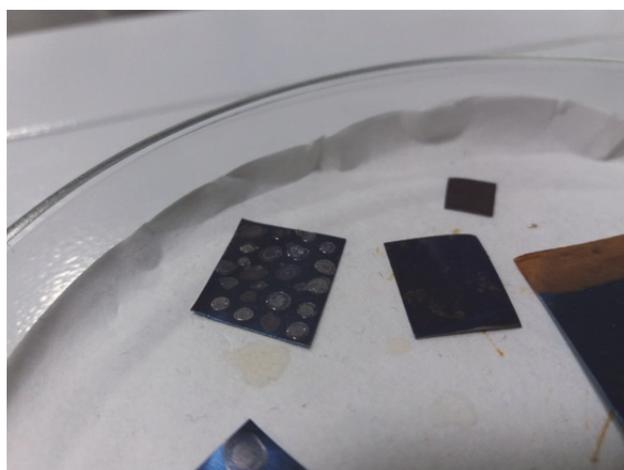


Рис.36. Титановая поверхность с нанесенным золотом и богатой тромбоцитами плазмой

## **2.7 Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния бактериальных клеток *E. Coli* и микобактерий туберкулеза.**

### **2.7.1 Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния бактериальных клеток *E. Coli***

В качестве модельных бактерий для анализа воздействия антибиотиков и определения спектральных полос, являющихся потенциальными маркерами клеточной гибели, были взяты культуры бактерий *E. Coli*, находящиеся в стационарной фазе роста, чувствительных к антибактериальным препаратам. Были проведены исследования пяти антибиотиков широкого спектра. На первом этапе был осуществлен подбор экспериментальных условий съемки, были получены различные спектры бактерий. На втором этапе была проведена оценка воздействия антибиотика на клеточные стенки бактерий с целью идентификации спектральных изменений методом КРС. В рамках проведения экспериментальной части по получению спектров гигантского комбинационного рассеяния света с помощью созданных оптических сенсоров на основе золотых нанозвезд на АРТЕS-модифицированных стёклах, использовался спектрометр Renishaw Virsa (Великобритания). Поскольку приготовленные прототипы имели широкий максимум плазмонного поглощения, начинающийся в районе 500 нм и заканчивающийся в ближнем инфракрасном диапазоне, в ходе эксперимента были использованы лазеры с длиной волны  $\lambda = 532$  нм,  $\lambda = 785$  нм, соотносящиеся со спектрами плазмонного поглощения прототипов. В ходе экспериментов было установлено, что лазер  $\lambda = 532$  нм разрушает бактериальные клетки в силу большей энергии излучения, поэтому для дальнейших экспериментов был использован более длинноволновый источник  $\lambda = 785$  нм. Бактерии помещались на поверхность сенсора (Рис. 32) мазком. Все спектральные данные были сохранены после регистрации в виде .txt файлов для дальнейшей оценки. Для обработки спектральных данных использовалась информационная система BioRad-KnowItAll (Thermo Fisher Scientific Inc., США). С помощью нее производилась линейная коррекция базовой линии и фильтрация по методу Савицкого-Голея. Съемка бактерий проводилась в течение суток после ингибирования по прошествии 8-12 часов. Также, обработка спектральных данных проводилась с учетом результатов опубликованной статьи [412].



Рис. 37. Прототип оптического сенсора для съёмки бактериальных клеток

Исследуемый образец был помещён на держатель КРС спектрометра Virsa. С помощью цифровой видеокамеры было получено изображение образца на оптическом столе, производилось выделение объектов исследования, позиционирования образцов и юстировка. Изображение с компьютера выводилось на экран компьютера с помощью программного обеспечения Wire 5.4, где осуществлялись настройка параметров прибора, источника лазерного излучения, управление и получение данных с детекторов, обработка данных и съёмка образцов.

После визуального обнаружения бактерий в объективе микроскопа проводилось позиционирование и спектральная съёмка при следующих условиях: динамическая съёмка в диапазоне обратных волновых чисел  $350\text{-}3200\text{ см}^{-1}$ , выдержка матрицы ПЗС 30 секунд, длина волны возбуждающего лазера  $\lambda=785\text{ нм}$ , мощность лазера варьировалась от 45 мВт до 15 мВт. Такие условия съёмки были обусловлены факторами неповреждения образца и отсутствия засветки образца. Полученные спектры сохранялись в формате txt с целью дальнейшей обработки.

После снятия спектра бактерий (контроль) с помощью автоматической пипетки Eppendorf Research с наконечником на бактерии была нанесена 1 капля по 1 мкл выбранного антибиотика. В течение 5 минут происходило высыхание лекарственного препарата и съёмка возобновилась при тех же условиях, что и бактерии без лекарственного препарата. Измерения колебательных спектров производилось каждые 5 минут с целью наблюдения за динамикой изменения бактериальной стенки под воздействием антибиотика. Съёмка прекращалась, когда на протяжении 3-х изменений спектральная картина не изменялась.

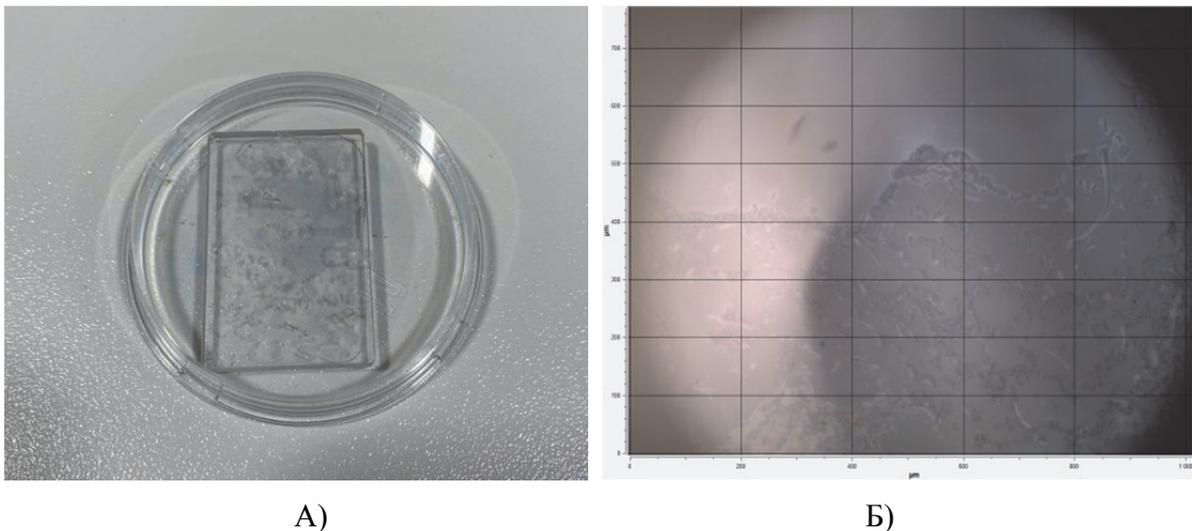


Рис. 38. Бактерии *E.Coli*, помещенные на поверхность оптического сенсора (а) и их стократное оптическое изображение на предметном столике спектрометра КРС

В ходе выполнения работ было выбрано пять антибиотиков, с которыми проводились эксперименты по воздействию на клетку, так и эксперименты по антибиотикорезистентности: цефтриаксон, ципрофлоксацин, ампициллин + сульбактам, тетрациклин реневал, рифампицин для исследования влияния лекарственных препаратов на выбранные штаммы бактерий. В ходе проведения эксперимента были получены рабочие концентрации антибиотика, вводимые в организм человека (рекомендуемая доза для лечения), исходя из этих концентраций, были получены концентрации, которые позволили работать с исследуемым объектом: они не перекрывали спектр бактерий, при этом воздействуя на исследуемый образец. Рекомендуемая концентрация для лечения была определена из инструкции по применению к выбранным антибиотикам. Среди используемых лекарственных средств были антибиотики в виде растворов (ципрофлоксацин, рифампицин), порошка (цефтриаксон и ампициллин + сульбактам) и порошка (тетрациклин реневал). Поскольку все антибиотики использовались в жидком виде, лекарственные препараты в форме порошка растворялись в некотором количестве воды с помощью автоматической пипетки Eppendorf Research с наконечником отмерялось определённое количество дистиллированной воды, чтобы получить необходимую концентрацию. Препараты растворялись в рассчитанном заранее количестве воды. После их растворения полученный раствор центрифугировался с целью осаждения крупных нерастворимых частиц таблетки. Используемые массы порошков, объёмы дистиллированной воды и полученные концентрации представлены в Таблице 9.

Таблица 9. Используемые концентрации действующих веществ исследуемых веществ.

Название антибиотика	Масса лекарственного препарата, г	Объём добавленной воды, мл	Рекомендуемая для лечения, г/мл	Рабочая концентрация, г/мл
Цефтриаксон	0,5	1,5	$33 \cdot 10^{-2}$	$33 \cdot 10^{-5}$
Ципрофлоксацин	Использовался в жидком виде		$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-5}$
Ампициллин + сульбактам	1,5	2	$75 \cdot 10^{-2}$	$75 \cdot 10^{-5}$
Тетрациклин реневал	0,1	5	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-5}$
Рифампицин	0,1	5	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$

Эксперимент был проведён следующим образом. На АРТЕS-модифицированную поверхность кварцевого стекла КУ-1 были нанесено с помощью скальпеля несколько колоний бактерий чувствительного штамма *E.Coli*. Бактериальные штаммы *E.Coli*, используемые в этом исследовании, были получены от БФУ им. Канта. Все исследуемые культуры, в том числе антибиотикорезистентные выращивали в среде Лурия-Бертани (LB) (*Becton Dickinson*), триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, хлорид натрия 5 г/л, агар 15 г/л при  $37^{\circ}$  С в течении ночи. В рамках проведения экспериментальной части по изучению изменения структуры бактериальной стенки при возникновении у бактерии *E.coli* устойчивости к лекарственным препаратам были получены спектры гигантского комбинационного рассеяния света с помощью нанозвёзд на АРТЕS-модифицированных стёклах, также использовался рамановский анализатор Virsa. Поскольку приготовленные нанозвёзды имели широкий максимум плазмонного поглощения, начинающийся в районе 500 нм и заканчивающийся в ближнем инфракрасном диапазоне, в ходе эксперимента был использован лазер с длиной волны  $\lambda = 785$  нм. Выбор этой длины волны также обусловлен возможностью изучения живых, нативных бактерий под действием препарата, а не под действием лазера высокой энергии, который может повредить их структуру. Для проведения этого эксперимента бактериальные штаммы *E. Coli*, полученные из музея БФУ им. И. Канта, были пересажены в приготовленные ранее чашки Петри. В процессе экспериментов по съёмке антибиотикорезистентных штаммов были взяты бактерии, резистентные последовательно к исследуемым препаратам. Штаммы были помещены в 6 чашек Петри (5 резистентных штаммов, 1 контрольный чувствительный штамм). Питательная среда снималась отдельно, и ее спектр вычитался из спектра каждого штамма. Полученные спектры сохранялись в формате .txt с целью

дальнейшей обработки. Полученные спектры были обработаны в программе Origin 2021. В процессе экспериментов были успешно получены спектры чувствительных, антибиотико-резистентных бактерий, а также бактерий при воздействии лекарственных препаратов. Ниже приведены результаты съемки бактерий, имеющих резистентность к препаратам. Бактерии, имеющие резистентность, брались в университете и росли на среде с соответствующим антибиотиком для проверки резистентности. После выхода на стационарную фазу роста, осуществлялась спектральная съемка посредством КРС спектроскопии. Перед обработкой все дополнительные спектральные составляющие вычитались.

### **2.7.2 Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния бактериальных клеток *Mycobacterium tuberculosis***

Для реализации ГКРС клеток микобактерий была реализована методика, в которой использовались как физически синтезированные наночастицы, полученные с применением метода фемтосекундной лазерной абляции, так и химически синтезированные наночастицы и коммерческие поверхности Silmeco SERS substrates. Абляционные наночастицы были получены по методике, описанной в разделе 2.5.

После получения оптимальных параметров эксперимента, была осуществлена спектроскопия комбинационного рассеяния света на микобактериях туберкулеза. В рамках данной работы была опробована регистрация КР сигнала от нескольких сред роста для штамма микобактерии туберкулеза (MbT) *Erdman spp.*. Также были зарегистрированы их спектры комбинационного рассеяния света. По итогам, были определены оптимальные параметры эксперимента с минимальным сигналом фона. Для отработки методики использовался референсный штамм *Erdman spp.* из музея Санкт-Петербургского государственного научно-исследовательского института фтизиопульмонологии Минздрава РФ в лаборатории экспериментального туберкулеза. Штаммы культивировались с использованием среды Левенштейна–Йенсена или среды Миддлбука 7Н9. Бактериальные штаммы культивировались при температуре 37 °С и поддержании 5% уровня CO<sub>2</sub> в инкубаторе в течение 28-30 суток. Далее, образцы трижды центрифугировались и отмывались в деионизированной воде, после чего помещались в пробирки Eppendorf 5 мл. Суспензия штаммов замораживалась в физиологическом растворе 15% раствором глицерина и хранилась при температуре T=-80°С. Было установлено, что глицерин дает ощутимый вклад в спектр бактерий, в связи с чем, его концентрация уменьшалась до 5%. Это, как и дополнительные промывки бактериальной массы перед экспериментом способствовали понижению паразитного сигнала рассеяния глицерина и получению более высокого соотношения сигнал/шум для микобактерий. Далее, перед началом эксперимента размороженную бактериальную суспензию объемом 200 мкл помещали на водяную баню и убивали нагреванием при +80° С в течение часа. Далее центрифугировали осадок (4000 об/мин, в течение 10 мин). После чего осадок ресуспендировали в 80 мкл дистиллированной воды. Для

целей съемки использовались легочные и внелегочные штаммы микобактерий, резистентные к различным препаратам. Спектры комбинационного рассеяния были зарегистрированы с помощью спектрометра Horiba Jobin-Yvon LabRam HR800 (Horiba, Франция), оснащенный лазером с длиной волны 514 нм. Мощность лазера составляла 35 мВт. Оптическая схема включала в себя микроскоп Olympus BX41 с объективом 100X (NA 0.9). Монохроматор спектрометра имел фокусное расстояние 800 мм и был оснащен голографической решеткой 600 шт/мм [400]. Спектрометр был оборудован CCD-матрицей с размером пикселей 1024x256 и внутренним охлаждением до  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Воспроизводимость по волновому числу составляла  $1\text{ см}^{-1}$ . Спектральное разрешение составляло  $1.5\text{ см}^{-1}$ . Размер лазерного пятна  $1\times 25$  микрон и позиционировался на конгломерате бактерий (Рис. 39).

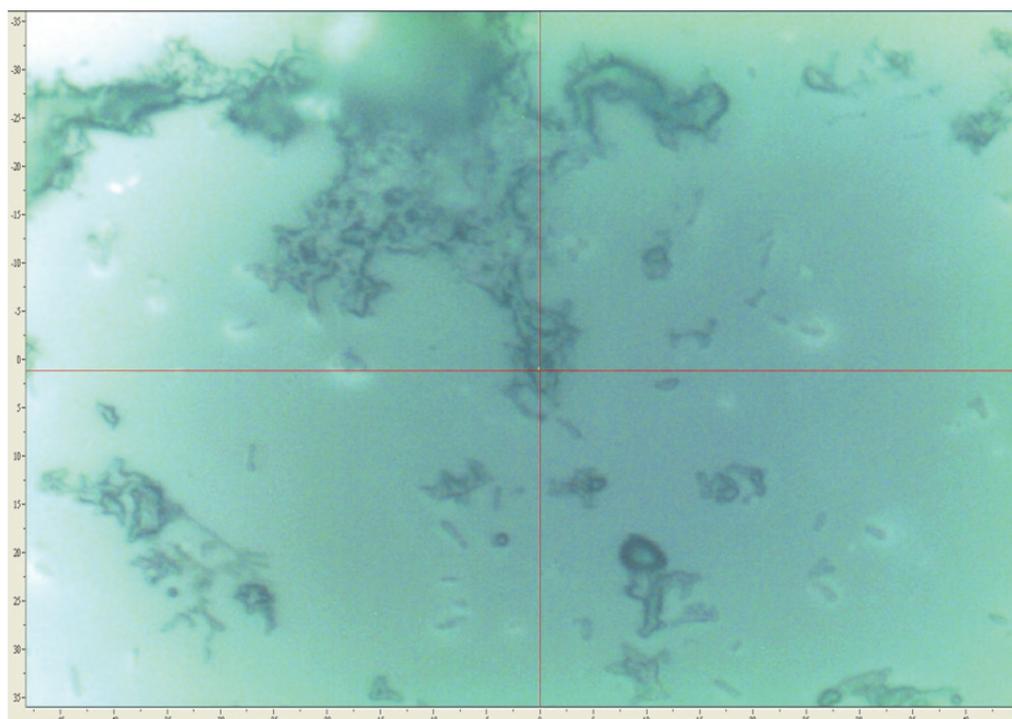


Рис. 39. Изображение бактериальной массы микобактерий туберкулеза на кварцевом стекле при увеличении 100X, полученное с использованием спектрометра комбинационного рассеяния света

Рэлеевское рассеяние было устранено с помощью режекторных фильтров. Внутри спектрометра рамановское рассеяние проходит через щель размером 50 мкм, и, наконец, весь рамановский сдвиг регистрируется в виде спектра термоэлектрически охлаждаемым прибором с зарядовой связью с установленной температурой  $-70^{\circ}\text{C}$ . Прибор калибровался кремниевой пластиной при максимуме сигнала при  $520,2\text{ см}^{-1}$  в течение 1 с. Капля деактивированных бактерий наносилась на химически-очищенный кварц, затем высушивалась. Спектры регистрировались в диапазоне  $400\text{-}3150\text{ см}^{-1}$ . После регистрации спектр сохранялся в формате .txt и специального формата Horiba (.ngs) на ПК, подключенном к блоку комбинационного рассеяния. После отработки КР методики были зарегистрированы спектры ГКР с применением поверхностей на основе нанозвезд и коммерческих подложках Silmесо. Типовой спектр референсного штамма *Erdman* приведен на Рисунке 40.

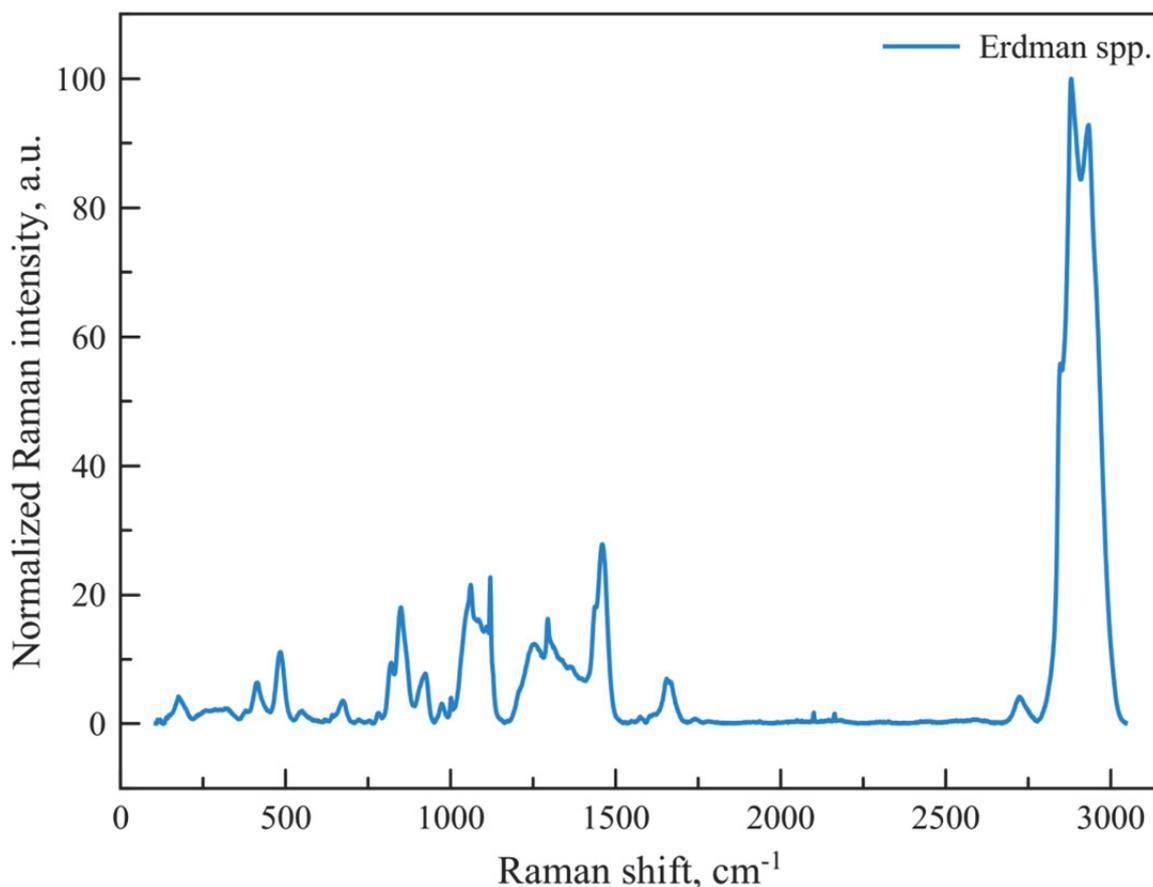


Рис. 40. Спектр комбинационного рассеяния референтного штамма *Erdman spp.* в диапазоне 200-3150 см<sup>-1</sup>, полученный на кварцевом стекле

Далее проводились детальные исследования бактериальных конгломераций и единичных клеток микобактерий туберкулеза с применением КР спектроскопии. Были исследованы референтные и клинические штаммы микобактерий. Штаммы микобактерий были взяты из коллекции НИИ Фтизиопульмонологии Минздрава РФ. Для исследований были взяты штаммы Beijing, распространенные на территории РФ, имеющие различную лекарственную резистентность. Выборка включала в себя референтные (H37Rv, H37Ra, Erdman) штаммы и клинические штаммы: монорезистентные (МоноЛУ), полирезистентные (ПолиЛУ), с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). Биологический материал состоял из: респираторного материала пациентов с туберкулезом легких, хирургического материала (из места разрушения кости) пациентов с костным туберкулезом. Все образцы были подготовлены на среде Левенштейна – Йенсена или Middlebrook 7H9 (с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960). Все культуры были собраны на одинаковых фазах роста (стационарное состояние). Таблице 10 приведен список основных референтных и клинических штаммов для которых проводилось исследование. Стоит отметить, что для штаммов МоноЛУ спектральных различий (между чувствительными и МоноЛУ) выявлено не было в связи, с чем они были исключены из выборки исследования.

Таблица 10. Перечень исследуемых штаммов микобактерий туберкулеза

Штамм	Тип туберкулеза	Способ забора образца	Чувствительность к препаратам	Препарат
8692	Легочный	Респираторный	Чувствительный	Нет
6679	Костный	Хирургический	Чувствительный	Нет
1604	Легочный	Респираторный	ПолиЛУ	S, H, R, K
109	Костный	Хирургический	ПолиЛУ	S, H, R, K, Cap, A
758	Костный	Хирургический	ШЛУ	S, H, R, E, Of, Z
9622	Легочный	Респираторный	ШЛУ	S, H, R, E, K, Of, Z
H37Rv	Легочный	Музей (референс)	Чувствительный	Нет
H37Ra	Легочный	Музей (референс)	Чувствительный	Нет
Erdmann	Легочный	Музей (референс)	Чувствительный	Нет

Где S– стрептомицин, H – изониазид, R– рифампицин, E – этамбутол, Z – пипразинамид, K– канамицин, Of–офлоксацин, ЦП–капреомицин, A–амикацин, Cap– парааминосалициловая кислота.

Бактериальные клетки хранили в физиологическом растворе с 15% глицерином хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ , размораживали, а затем промывали. Для деактивации бактериальных клеток 250 мкл размороженной суспензии помещали в 11 мл дистиллированной воды нагревали и помещали в водяную баню на 20 минут при температуре  $T = +80^{\circ}\text{C}$ . После центрифугирования (2000 об/мин, 10 мин) осадок ресуспендировали в 100 мкл дистиллированной воды. Лекарственная чувствительность клинических штаммов была определена стандартным методом абсолютных концентраций на приборе ВАСТЕС MGIIТ 960 с использованием протокола производителя. В результате выполнения проекта был осуществлен подбор оптимальных параметров эксперимента с применением спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света на микобактериях. Успешно были зарегистрированы спектры бактериальных конгломератов и единичных клеток микобактерий.

Спектральные исследования КР и ГКР спектроскопии проводились на приборах Horiba Jobin-Yvon LabRam HR 800 (Horiba, Франция) и Senterra (Brucker, США). Использование двух спектрометров было необходимо для регистрации спектров на длинах волн 632.8 нм (LabRam HR 800) и 785 нм (Senterra) и соответствующих сред усиления для них. В случае использования спектрометра LabRam HR800 (Horiba, Франция) использовали лазер с длиной волны 632.8 нм. Мощность лазера на образце составляла 17 мВт. Оптическая схема включала в себя микроскоп Olympus BX41 с объективом 100X (NA 0.9). Монохроматор спектрометра имел фокусное расстояние 800 мм и был оснащен голографической решеткой 600 шт/мм с максимумом блеска на длине волны 500 нм. Спектрометр был оборудован CCD-матрицей Synapse (Horiba) с размером пикселей 1024x256 и внутренним охлаждением до  $-70^{\circ}\text{C}$ . Воспроизводимость по волновому числу

составляла  $1 \text{ см}^{-1}$ . Спектральное разрешение составляло  $1.5 \text{ см}^{-1}$ . Размер лазерного пятна и  $1 \times 25$  микрон и позиционировался на конгломерате или одиночных клетках бактерий. В случае использования спектрометра Senterra применялся источник возбуждения с длиной волны 785 нм. Спектральное разрешение составляло порядка  $3 \text{ см}^{-1}$ . Для регистрации применялся высокочувствительный детектор Andor IDus 416 с максимумом детекции на длине волны 780 нм.

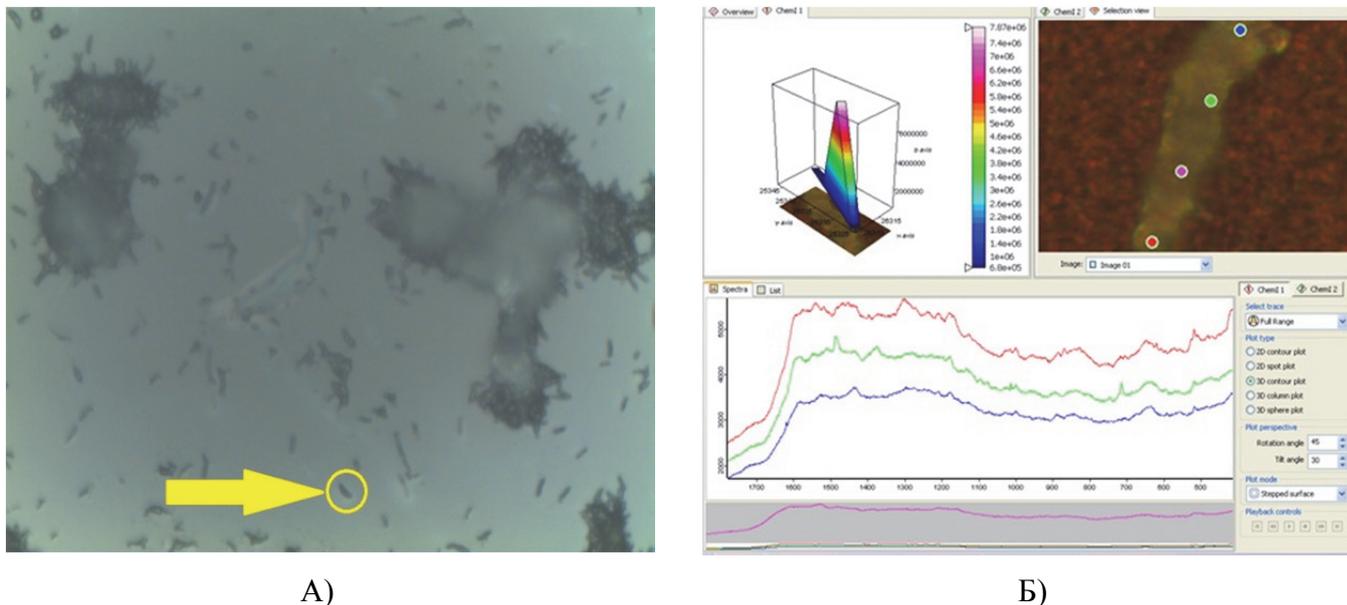


Рис. 41. Изображение бактериальной массы микобактерий туберкулеза на кварцевом стекле при съемке конгломераций и единичных бактерий (желтая стрелка) на спектрометре LabRam 800HR туберкулеза на кварцевом стекле (А) и пример ГКР картирования единичных микобактерий в разных частях клетки, реализованного на спектрометре Senterra при увеличении 100 крат.

Перед съемкой спектров приборы калибровались кремниевой пластиной при максимуме сигнала при  $520,2 \text{ см}^{-1}$  в течение 1 с. В случае КР-измерений суспензия деактивированных бактерий размером деактивированных бактерий наносилась на химически-очищенный кварц, затем высушивалась. В случае ГКР-измерений, коллоидные растворы наночастиц наносились на кварцевые стекла 1,2,3 слоями, а затем суспензия бактерий помещалась туда. В случае использования спектрометра Senterra, использовались как изготовленные авторами проекта коллоидные золотые наностержни, так промышленные ГКР-активные структуры, адаптированные под длину волны возбуждения 785 нм (Silmeco, Дания). Спектры регистрировались в диапазоне  $400\text{-}3150 \text{ см}^{-1}$ . После регистрации спектры сохранялись в оригинальных форматах (.ngs) и (.dpt), а также в формате .txt на ПК, подключенном к блоку комбинационного рассеяния. Последовательный анализ основных спектральных компонент был проведен в области «отпечатка пальца»  $600\text{-}1800 \text{ см}^{-1}$ . Также, более детально, была анализирована область спектра  $1000\text{-}1500 \text{ см}^{-1}$  для исследования потенциального маркера антибиотикорезистентности – глутатиона (GSH). Спектральная обработка проводилась с помощью программного пакета KnowItAll Spectroscopy Edition. Для всех спектров проводилась коррекция базовой линии, фильтрация шумов, удаление

базовой линии кварца, нанесенных на него коллоидов. В случае использования субстрата Silmeco, базовый спектр субстрата записывался спектрометром Centerra, а потом автоматически вычитался из результирующего спектра. За время реализации второго года проекта было зарегистрировано 1353 КР и ГКР спектров от 146 бактериальных клеток от штаммов, обозначенных в Таблице 10. Методология съемки была отработана и опубликована в том числе в [408].

После выбора оптимальной методики пробоподготовки для микобактерий туберкулеза был проведен анализ бактерий туберкулеза, в частности спектральный анализ липидных и белковых колебательных групп в высокочастотной области для микобактерий туберкулеза с различной степенью антибиотикорезистентности: чувствительных, с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Анализ проводился с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния света с целью детекции возможных спектральных изменений молекул с высоким молекулярным весом, находящимся в структуре клеточной стенки микобактерий. Последовательный анализ колебательных групп был выполнен в спектральном диапазоне высоких частот  $\nu=2700-3050 \text{ см}^{-1}$ . Были исследованы образцы легочного и внелегочного (костного) туберкулеза. Спектры комбинационного рассеяния были зарегистрированы с помощью спектрометра Horiba Jobin-Yvon LabRam HR800 (Horiba, Франция), оснащенный He-Ne лазером с длиной волны 632.8 нм. Мощность лазера составляла 30 мВт. Оптическая схема включала в себя микроскоп Olympus BX41 с объективом 100X (NA 0.9). Монохроматор спектрометра имел фокусное расстояние 800 мм и был оснащен голографической решеткой 600 шт/мм. Спектрометр был оборудован CCD-матрицей с размером пикселей 1024x256 и внутренним охлаждением до  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Воспроизводимость по волновому числу составляла  $1 \text{ см}^{-1}$ . Спектральное разрешение составляло  $1.5 \text{ см}^{-1}$ . Размер лазерного пятна  $1 \times 25$  микрон и позиционировался на конгломерате бактерий. Каждый спектр регистрировался в течение 80 секунд, выполнялось 10 усреднений для каждого спектра с целью повышения соотношения сигнал/шум. Всего было зарегистрировано порядка 653 спектров из которых было отобрано 60 спектров легочных и внелегочных микобактерий, имеющих лучшее соотношение сигнал/шум.

## **2.8 Подходы на базе машинного обучения для дифференциации массивов спектров тромбоцитов**

Для задач выделения биомаркеров, классифицирующих состояния тромбоцитов и выделения биомаркеров – спектральных полос, характеризующих изменения, была обработана выборка спектров пациентов, которая составляла более чем 2500 спектров, в связи с чем для решения задач дифференциации спектральных выборок и была проведена классификация данных по группам пациентов при помощи алгоритма случайного леса. Первым этапом исследования была проведена дифференциация спектров, которая позволила разделить пациентов на две основные группы. Первая группа состояла из здоровых людей, не получающих никакого лечения, в то время как третья группа включала пациентов с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями, также не

проходящих терапию. Это разделение было необходимо для того, чтобы выявить ключевые различия в спектрах, которые могут указывать на наличие или отсутствие патологий. Разделение по основным группам отображено на рисунке 38.

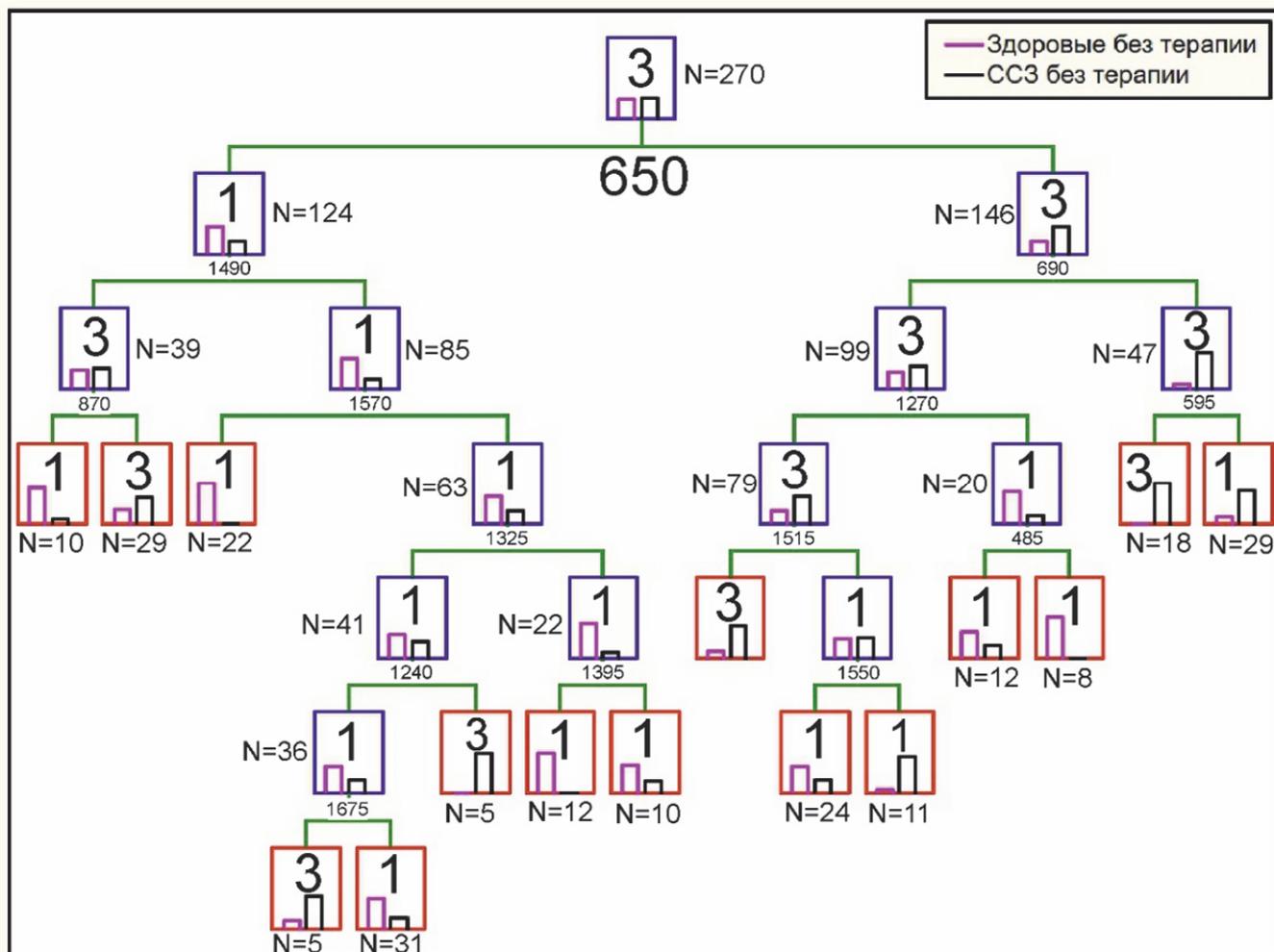


Рис. 42. Дерево решений процесса классификации спектров, полученных от двух различных групп пациентов: первая группа - здоровые пациенты без терапии, третья группа – пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями без терапии. Анализ данных был проведен с использованием алгоритма случайного леса.

## 2.9 Подходы к DFT моделированию спектральных биомаркеров

В рамках работ, выполненных в настоящей диссертации, были разработаны подходы к моделированию сложных многокомпонентных соединений на примере рецепторов тромбоцитов. Данные работы были проведены для апробирования подходов теоретического выделения потенциальных биомаркеров – спектральных полос, характеризующих изменения в биообъектах (рецепторах тромбоцитов). Для расчетов использовалась программа Gaussian 16 (номер лицензии: G64284555249899W-6922N). Данный пакет использовался для расчета теоретических спектров комбинационного рассеяния света. Теоретические спектры комбинационного рассеяния света были получены методом ТФП с использованием выделенного функционала (B3LYP) [373] для моделирования молекулярных структур. В качестве базисного набора был выбран бивалентный базис с расщепленной валентностью 6-31G(d). Перед проведением теоретических расчетов

анализируемые структуры подвергались энергетической минимизации в программном комплексе МОЕ. На основании результатов молекулярного докинга проведен математический расчет колебательных спектров областей взаимодействия рецепторов тромбоцитов P2Y12 и циклооксигеназы-1 и метаболитов препаратов, ингибирующих рецепторы (тиолового метаболита клопидогреля H4 и аспирина соответственно). Для получения более точных теоретических результатов было проведено линейное масштабирование волновых чисел. В качестве критерия оценки качества расчета частот колебаний использовалась величина суммы квадратов отклонений от линейной зависимости.

## **2.10 Математическая обработка массивов спектров данных комбинационного рассеяния света**

Для решения задач диссертации были разработаны алгоритмы выделения биомаркеров на основе алгоритмов статистики, машинного обучения. Сначала и для последующей статистической обработки и исследования снятые спектры пациентов, разделенные по группам были занесены в единые таблицы с шагом фиксированной сетки частот с шагом  $5 \text{ см}^{-1}$ . Для осуществления таких манипуляций со спектрами была разработана программа Parsec, используемая для конвертации файлов и формирования массива данных. Программа, написанная на языке C++ раскладывала спектр по ячейкам сетки в диапазоне от 400 до  $1800 \text{ см}^{-1}$  шагом  $5 \text{ см}^{-1}$ . Таким образом, все спектральные колебания соотносились с обозначенной сеткой. Для корректной работы программы названия всех файлов с данными были приведены к единому формату: «Фамилия\_Номер.<расширение>».

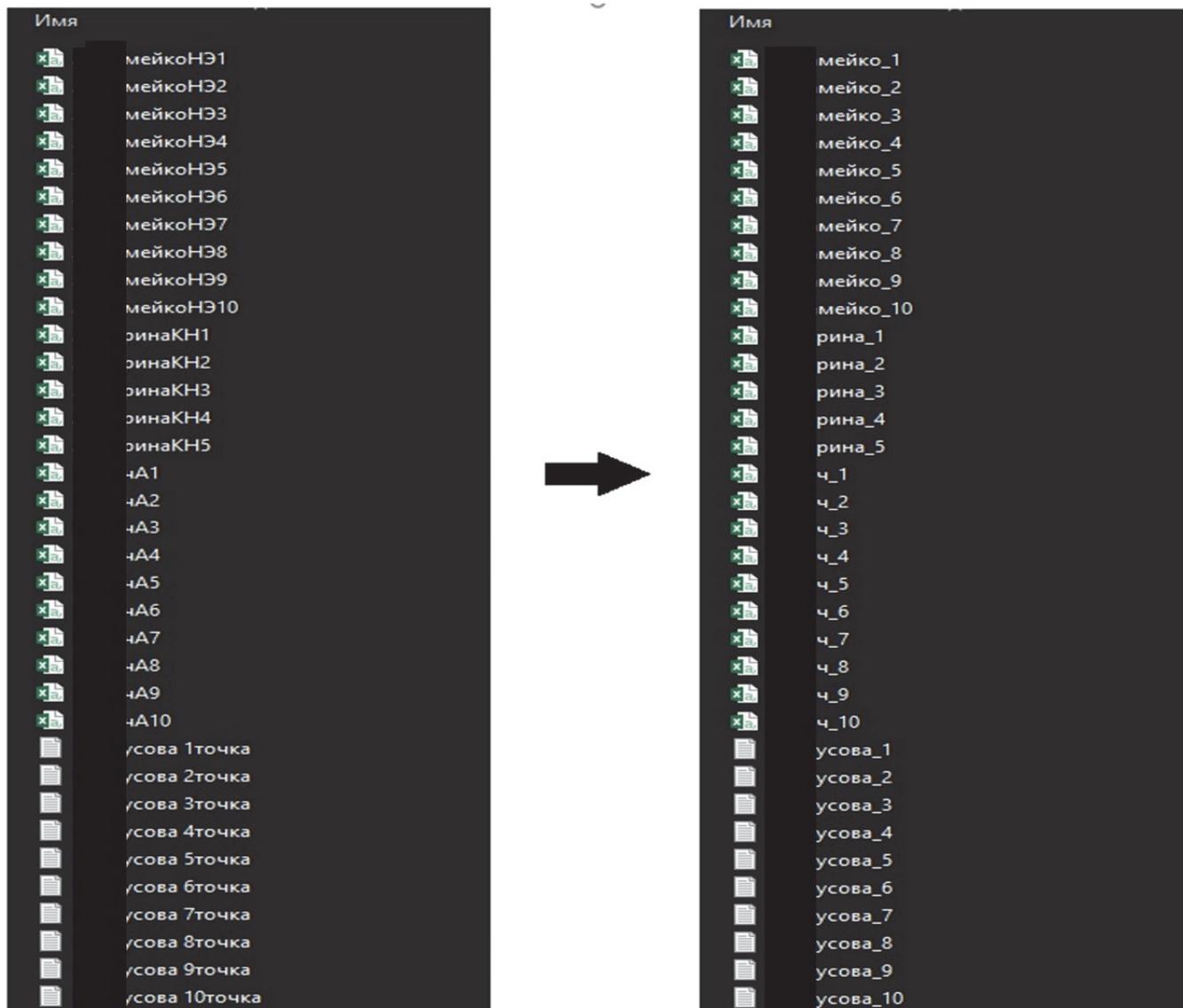


Рис. 43. Пример приведения названий файлов к единому формату. После успешной работы программы парсера программы формировался файл в формате Excel.

id	Patient	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475
1	1	10612	10610	10657	10696	10745	10750	10780	10751	10711	10717	10734	10764	10755	10758	10760	10792
2	1	25225	25246	25289	25436	25527	25581	25655	25615	25678	25759	25820	25907	26027	26090	26132	26245
3	1	8921	8938	8961	9003	9020	9025	9003	8986	8955	8971	9005	9212	9008	9010	8991	9016
4	1	10161	10226	10257	10285	10321	10322	10295	10214	10193	10184	10187	10218	10179	10127	10156	10172
5	1	6689	6719	6697	6722	6732	6799	6761	6719	6711	6733	6745	6729	6716	6727	6699	6734
6	1	11241	11263	11318	11360	11419	11379	11345	11308	11267	11248	11252	11322	11302	11270	11303	11261
7	1	6950	6948	6970	6981	7016	7015	6996	6995	6970	6982	6995	6991	6986	6970	6958	6978
8	1	7394	7425	7422	7475	7477	7485	7451	7434	7404	7394	7416	7433	7423	7416	7402	7411
9	1	8579	8591	8645	8672	8680	8665	8639	8572	8526	8547	8568	8543	8533	8497	8496	8496
10	1	8581	8604	8608	8637	8659	8655	8636	8612	8604	8579	8543	8602	8556	8568	8594	8581
11	2	5127	5151	5181	5169	5158	5185	5155	5124	5114	5143	5155	5150	5132	5155	5177	5200
12	2	6342	6383	6390	6406	6422	6436	6403	6378	6368	6401	6405	6410	6424	6422	6415	6458
13	2	17640	17681	17690	17734	17760	17766	17670	17613	17582	17605	17621	17571	17590	17625	17618	17705
14	2	8167	8198	8187	8220	8259	8242	8212	8194	8184	8199	8181	8193	8186	8198	8238	8235
15	2	22907	22930	23027	23109	23148	23165	23206	23209	23208	23275	23297	23281	23433	23482	23523	23673
16	3	9583	9639	9645	9687	9706	9716	9697	9667	9639	9673	9685	9680	9683	9677	9693	9708
17	3	7828	7861	7872	7881	7874	7924	7912	7893	7904	7934	7924	7962	7943	7937	7932	7975
18	3	10401	10450	10479	10513	10537	10537	10551	10559	10549	10546	10540	10602	10572	10601	10598	10646
19	3	9909	9960	9994	10005	10048	10047	10029	9954	10004	10003	10059	10039	10037	10023	10046	10079
20	3	10977	11043	11036	11101	11096	11105	11051	11012	10979	11038	11078	11082	11059	11031	11077	11110
21	3	5646	5628	5662	5672	5687	5669	5633	5575	5595	5595	5628	5594	5599	5588	5582	5624
22	3	6554	6562	6642	6636	6636	6632	6554	6503	6492	6532	6532	6533	6536	6537	6530	6607
23	3	5784	5793	5830	5831	5861	5832	5829	5770	5761	5781	5806	5818	5791	5786	5799	5816
24	3	9582	9614	9657	9691	9678	9671	9688	9619	9612	9648	9674	9689	9679	9669	9687	9699
25	3	10640	10680	10702	10747	10786	10727	10738	10727	10640	10713	10741	10738	10742	10711	10725	10771
26	4	9554	9608	9668	9687	9713	9708	9673	9699	9600	9581	9644	9661	9759	9730	9655	9676
27	4	7354	7352	7336	7420	7438	7373	7370	7352	7361	7354	7372	7379	7337	7390	7397	7390
28	4	11609	11625	11720	11698	11709	12252	11673	11691	11689	11689	11688	11720	11754	11746	11720	11699
29	4	11962	12001	12068	12026	12047	12028	12065	12016	12020	12030	12076	12146	12128	12169	12269	12275
30	4	9809	9868	9842	9956	9897	9932	9895	9836	9827	9878	9824	9875	9889	9881	9863	9880
31	4	7123	7146	7214	7196	7202	7195	7181	7148	7111	7184	7181	7201	7222	7193	7208	7207
32	4	7011	7001	7001	7040	7025	7002	6995	6975	7012	7004	7015	7052	7044	7070	7021	7022

Рис.44. Пример единой таблицы для здоровой группы пациентов без терапии

На данном рисунке зеленый столбец описывает смещения частот спектров с шагом  $5 \text{ см}^{-1}$ . Числа под фамилиями пациентов – это номера файлов данных, из которых заполнялись столбцы. Имеющиеся спектральные данные были представлены в удобном для анализа формате, а именно, в виде таблицы. Весь массив данных приведен в единый удобный формат для последующей статистической обработки по группам пациентов. Данные были считаны с прибора командой сотрудников НОЦ «Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанопотоника» и занесены в файлы .txt и .csv форматов, и после успешной обработки они были собраны в файле Excel в формате xlsx. Зеленая строка описывает смещения частот спектров с шагом  $5 \text{ см}^{-1}$ . Таким образом, все данные были центрированы для использования методов машинного обучения в статистическом анализе спектральных данных. Центрирование помогло устранить смещение данных и сделать их более симметричными относительно нулевой точки. Последним столбцом на них обозначены следующие группы пациентов:

1. Здоровые без терапии (ЗБТ)
2. Здоровые с терапией (ЗСТ)
3. После инфаркта (ПИ)
4. Больные без терапии (ББТ)
5. Больные с терапией (БСТ)

Далее, была разработана специализированная программа для анализа данных в среде Jupyter Notebook. В нем были использованы различные библиотеки, такие как pandas, numpy и csv. После импорта библиотеки pandas была использована функция read\_excel для загрузки данных из файла

Excel. Загруженные данные сохранились в переменной `data`, и мы использовали метод `head()` для вывода первых нескольких строк данных в Jupyter Notebook. Функция `df.drop` в библиотеке `pandas` нужна для удаления указанных столбцов или строк из `DataFrame`, а также для удаления конкретных индексов. Она позволила модифицировать `DataFrame` путем устранения ненужных данных. В нашем случае мы убрали нерелевантные для анализа строки и столбцы.

```
df = pd.read_excel('vse_po_grupпам.xlsx', skiprows=1)

df.drop('id', axis = 1, inplace = True)
df.drop('Patient', axis = 1, inplace = True)
```

Рис. 45. Код загрузки данных.

После запуска был получен результат в виде таблицы, но уже не в отдельном файле, а в самом фреймворке Jupyter Notebook. Именно эту таблицу мы использовали для дальнейшей работы с алгоритмами машинного обучения.

	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	...	1760	1765	1770	1775	1780	1785	1790	1795	1800	Group	
0	10612.0	10610.0	10657.0	10696.0	10745.0	10750.0	10779.5	10751.0	10711.0	10717.0	...	13618.0	13592.0	13611.0	13597.5	13588.0	13598.5	13573.0	13571.0	13572.0	ЗБТ	
1	25225.0	25246.0	25289.0	25436.0	25527.0	25581.0	25654.5	25615.0	25678.0	25759.0	...	49745.0	49650.5	49712.0	49771.5	49757.0	49872.0	49854.0	49821.0	49785.0	ЗБТ	
2	8921.0	8938.0	8961.0	9002.5	9020.0	9025.0	9002.5	8986.0	8955.0	8971.0	...	10980.0	10958.5	10918.0	10946.5	10932.0	10920.0	10912.0	10919.0	10869.0	ЗБТ	
3	10161.0	10226.0	10257.0	10284.5	10321.0	10322.0	10295.0	10214.0	10193.0	10183.5	...	11394.0	11399.0	11376.0	11376.5	11389.0	11351.0	11320.0	11309.0	11315.0	ЗБТ	
4	6689.0	6719.0	6697.0	6721.5	6732.0	6799.0	6760.5	6719.0	6711.0	6733.0	...	8142.0	8151.0	8126.0	8165.5	8109.0	8133.0	8138.0	8106.5	8104.0	ЗБТ	
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1261	13732.0	13765.0	13816.0	13935.0	13974.0	14028.0	14023.0	13994.0	14003.0	14066.0	...	21839.0	21879.5	21807.0	21879.5	21945.0	21935.5	21873.0	21873.5	21770.0	БСТ	
1262	56423.0	56429.0	56495.0	56551.0	56559.0	56574.0	56543.5	56555.0	56620.0	56644.0	...	63313.0	63294.5	63279.0	63305.0	63286.0	63290.5	63304.0	63244.5	63319.0	БСТ	
1263	7449.0	7465.0	7521.0	7527.0	7556.0	7508.0	7508.5	7470.0	7482.0	7488.0	...	8882.0	8869.0	8868.0	8869.0	8848.0	8866.0	8831.0	8831.5	8837.0	БСТ	
1264	10202.0	10257.0	10326.0	10375.0	10439.0	10422.0	10388.5	10353.0	10383.0	10406.0	...	14448.0	14460.0	14454.0	14447.0	14512.0	14481.5	14449.0	14430.5	14387.0	БСТ	
1265	9975.0	9999.0	10064.0	10128.0	10130.0	10142.0	10076.0	10016.0	10027.0	10067.5	...	12879.0	12816.5	12835.0	12818.5	12819.0	12829.0	12817.0	12759.5	12759.0	БСТ	

1266 rows × 282 columns

Рис.46. Выведенная программой таблица со спектральными данными.

```
[12]: df.describe()
```

	400	405	410	415	420	425	430	435	440
count	1266.000000	1266.000000	1266.000000	1266.000000	1266.000000	1266.000000	1266.000000	1266.000000	1266.000000
mean	12821.374408	12845.746840	12871.023302	12897.735387	12909.907188	12908.365324	12891.915482	12872.685624	12869.677725
std	10651.529576	10661.255266	10672.638955	10685.097723	10694.712346	10701.808921	10706.549700	10708.037401	10711.188794
min	432.000000	436.000000	437.500000	440.000000	442.000000	438.000000	436.000000	443.000000	439.000000
25%	6175.500000	6196.500000	6212.000000	6229.375000	6230.500000	6219.500000	6173.750000	6168.750000	6172.250000
50%	8550.750000	8582.500000	8604.000000	8627.000000	8628.000000	8624.500000	8613.500000	8585.000000	8591.500000
75%	14884.000000	14905.000000	14979.750000	15000.500000	15023.750000	15002.000000	15007.375000	15003.500000	14978.500000
max	65535.000000	65535.000000	65535.000000	65535.000000	65535.000000	65535.000000	65535.000000	65535.000000	65535.000000

8 rows × 281 columns

Рис. 47. Сводная таблица со статистическими показателями.

Далее была использована функция `df.describe()` в библиотеке `pandas` для создания сводной информации о числовых столбцах. Она предоставляет основные статистические показатели. Выводилось среднее значение, стандартное отклонение, минимальное и максимальное значения, а также процентиля, для каждого числового столбца. Нам требуются эти показатели, чтобы далее сгенерировать график распределения пациентов и наглядно представить имеющиеся данные по пациентам.

Для графического представления данных по группам существуют различные библиотеки визуализации, например, библиотеки `Matplotlib` и `Seaborn`, которые мы и использовали в дальнейшей работе.

Далее, в рамках разработанной методологии, строился график распределения пациентов, который предназначался для визуальной оценки соотношений различных групп пациентов. Неравномерное распределение классов может быть признаком дисбаланса классов, что потенциально повлияет на процесс обучения моделей машинного обучения. В результате выполнения визуализации была проведена оценка, насколько равномерно распределены группы пациентов и принять меры для балансировки классов, если это необходимо.

Процесс построения графика был осуществлен с использованием функций `plt.figure`, `plt.subplot` и `plt.show` с добавлением подписей осей, заголовка и легенды:

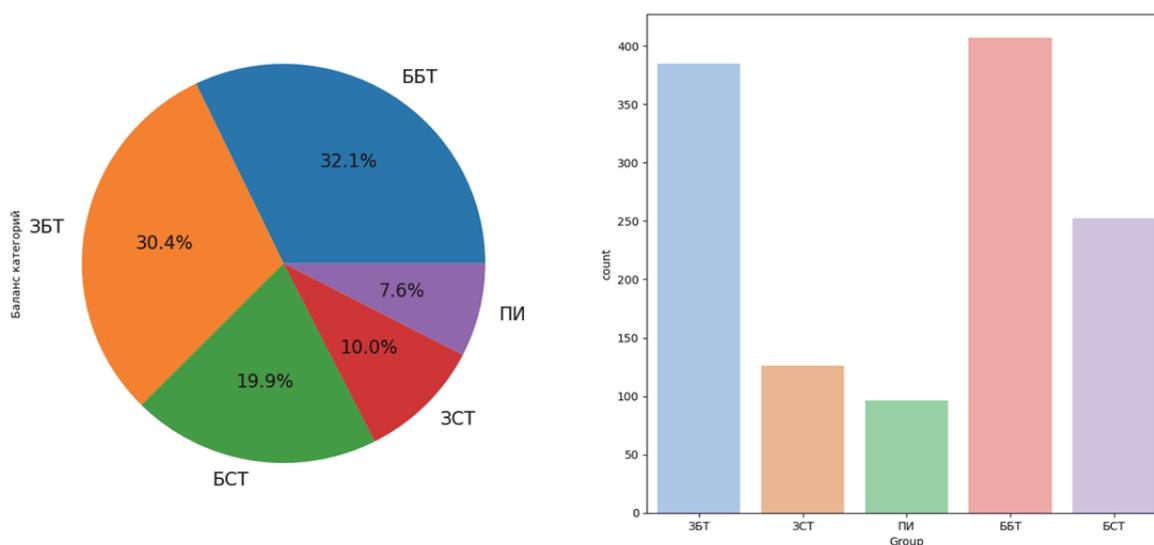


Рис.48. График распределения пациентов по пяти группам.

На начальном этапе мы дифференцировали только 2 основные группы: больные и здоровые пациенты. Это облегчило задачу классификации и помогло сосредоточиться на выявлении различий между здоровыми и больными пациентами. Так как это более простая задача, чем классификация по конкретным пяти группам: ЗБТ, ЗСТ, ПИ, ББТ и БСТ, это позволило использовать более простые и известные алгоритмы машинного обучения для начальной фазы классификации. Уменьшение количества групп также способствует изучению общих различий, потому что разделение на здоровых и больных позволяет выявить ключевые особенности, различающиеся в спектрах здоровых и больных пациентов. Идентифицированные различия могут быть использованы в дальнейшем для более точной классификации по конкретным группам.

Для этого мы обозначили первоначальные группы как здоровые (0) и больные (1), после чего наши данные стали готовы для применения алгоритмов машинного поведения.

```
df.Group = df.Group.str.replace('ЗБТ', '0')
df.Group = df.Group.str.replace('ЗСТ', '0')
df.Group = df.Group.str.replace('ПИ', '1')
df.Group = df.Group.str.replace('ББТ', '1')
df.Group = df.Group.str.replace('БСТ', '1')
```

Рис. 49. Код разделения данных на здоровую и больные группы.

После применения аналогичных предыдущему разделению методов визуализации для двух новых групп пациентов, мы можем наблюдать графики распределения, на которых заметно, что группа “Больные” преобладает над группой “Здоровые” в процентном соотношении 59,6:40,4.

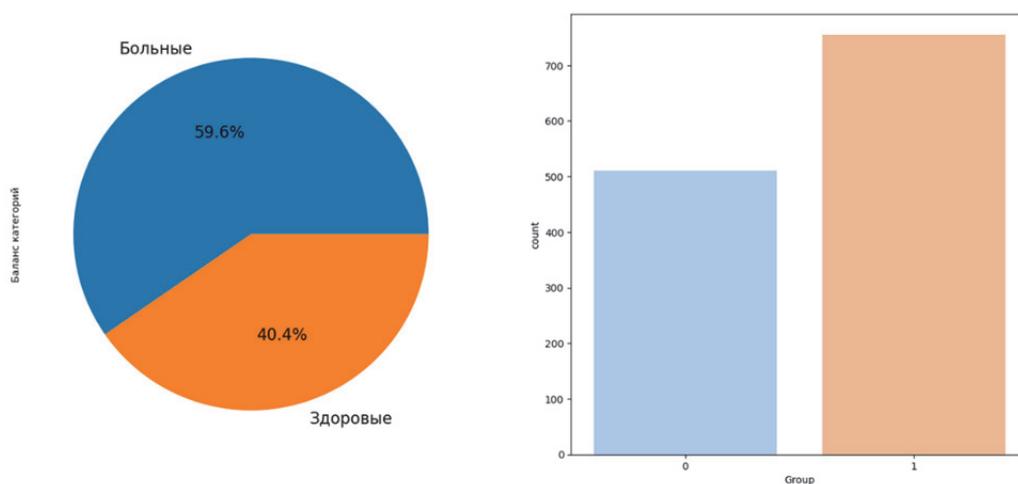


Рис 50. График распределения пациентов по двум группам.

Представленное распределение можно назвать относительно равномерным. Можно считать, что обе группы представлены достаточно сбалансированно для анализа и сравнения между ними. Неравномерное распределение стало бы проблемой, если, одна группа составляла бы 90% от выборки, а другая всего 10%. В нашем случае более малочисленная группа не является недостаточно представительной, а значит, подходит для дальнейшего анализа. В части результатов данные выборки были анализированы рядом статистических и хемометрических методов.

# ГЛАВА 3. СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

## 3.1 Спектральная однородность тромбоцитов

Одним из ключевых результатов исследования стало подтверждение гипотезы спектральной однородности тромбоцитов, что имеет принципиальное значение для анализа их колебательных спектров. Такое исследование проводилось с использованием методов спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света. Был использован комбинированный подход, основанный на многомерных методах, таких как анализ главных компонент и алгоритмов парной корреляции, для исследования однородности спектральных свойств тромбоцитов. Рассчитаны коэффициенты корреляции для каждой выборки и оценен средний коэффициент детерминации. Выявлена высокая степень спектральной однородности внутри одной пробы [308] и между ними. Для реализации изготавливались шероховатые поверхности на основе титана, синтез которых был подробно описан в методической главе диссертации. Были использованы поверхности Ti/Ag, контроль морфологии которых был исследован с помощью электронного микроскопа Carl Zeiss Cross Beam-540 (FIB-SEM). СЭМ-изображения были получены с поверхности как для «решеток» (рис. 51а), так и для НЧ Au, осажденных на пути лазерного луча (рис. 51а и рис. 51б).

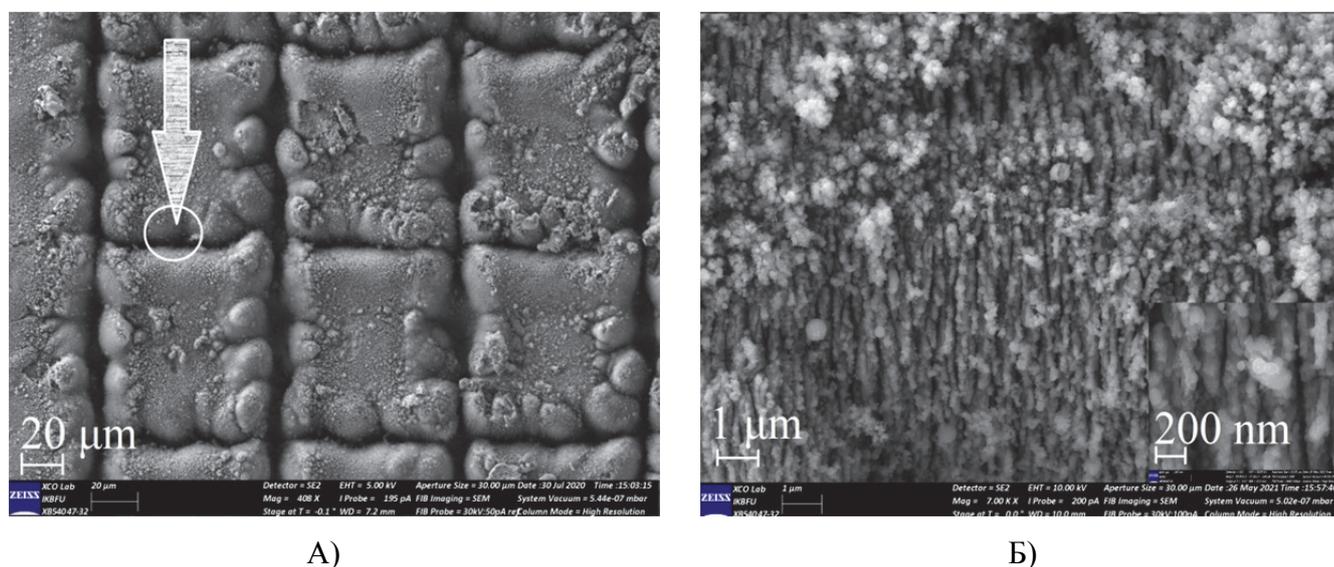


Рис. 51. СЭМ-изображения поверхности ГРП в геометрии «решетки» на титановой пластине в масштабе 20 мкм (а) без НЧ Au и в масштабе 1 мкм (б) с НЧ Au [305].

Для оценки теоретического коэффициента усиления SERS (EF) (Finite Difference Time Domain) моделирование на основе FDTD было выполнено после изготовления поверхностей на «наклоне» между поверхностями квадрата и области лазерного пути (Рис. 51). Модели создавались на основе полученных экспериментальных СЭМ-изображений поверхностей. Моделирование проводилось с

помощью пакета программ Lumerical FDTD Solutions (v.8.19.1584, Lumerical Inc.). Алгоритм моделирования был основан на [317], но в работе использовали Ti в качестве материала подложки вместо Au. Дополнительно на поверхность Ti были добавлены 11 модельных сфер Au размером  $D = 15, 20, 25, 30$  нм (рис. 60а). Параметры моделирования были заданы как: время прохождения плоскополяризованной волны через рабочую зону 1000 фс и температура 300°K. Длина волны возбуждения была установлена как  $\lambda_{ex} = 532$  нм. В качестве последнего шага мы рассчитали значения поля  $E$  в нашем моделировании. Он был пересчитан в интенсивность SERS и коэффициент  $|E|^4$  с использованием скриптов FDTD Lumerical. Эффективное усиление SERS определялось как  $|E/E_0|^4$ , где  $E$  — локальное максимальное электрическое поле, а  $E_0$  — входной источник для амплитуды электрического поля в линейном моделировании. Мы использовали источник Total-Field Scattered-Field (TFSF) для моделирования электрического поля на шероховатой поверхности и определения максимально возможного EF и интенсивности сигнала SERS.

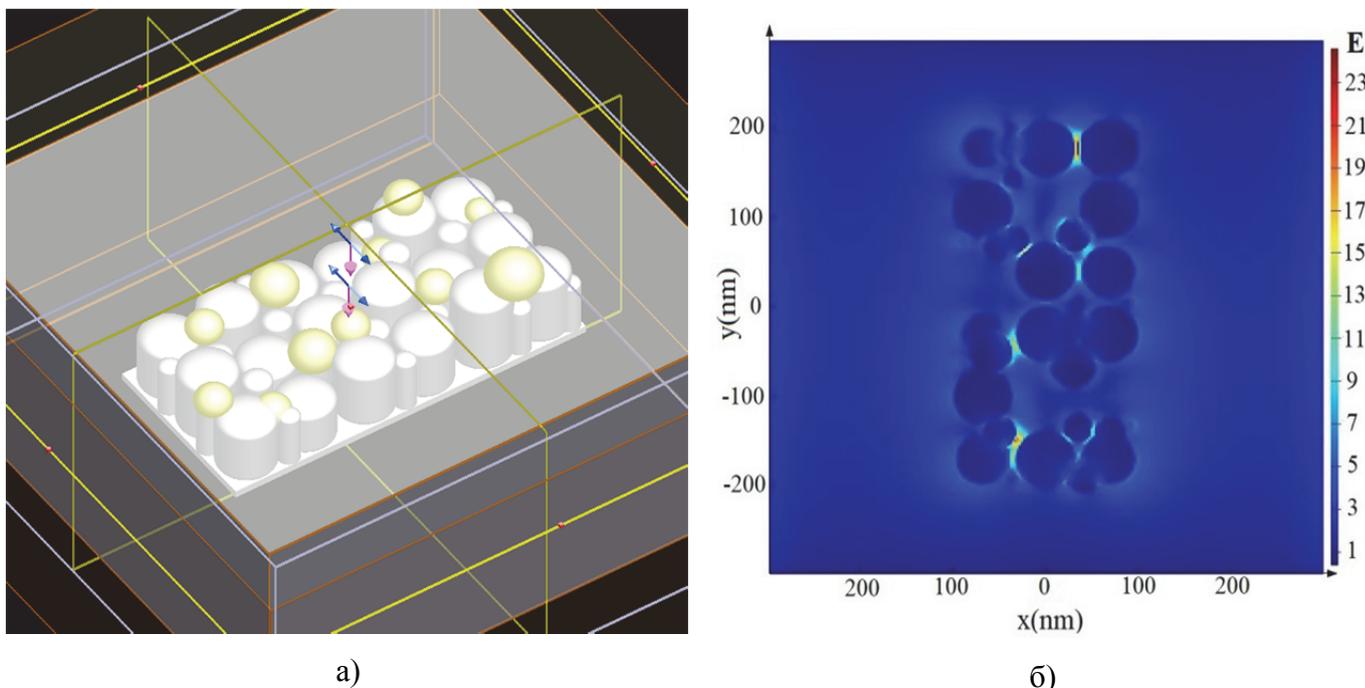


Рис. 52. Область модели FDTD с «решетчатой» геометрией поверхности (а) и распределением напряженности электрического поля (б).

Максимальный общий расчетный коэффициент усиления (EF) составил до  $10^3$  в зависимости от положения монитора в зонах «горячих точек» (рис. 52б, табл. 11). Внедрение Au NP в область моделирования приводит к увеличению  $E$ , увеличивая общий прогнозируемый EF SERS [308]. Наибольшее возмущение электрического поля возникало между цилиндрами и НЧ Au на поверхности Ti структур в обоих случаях. Учитывая вышеизложенный факт, для лучшей адсорбции веществ на поверхности и для достижения ими горячих точек, что приводит к достижению высоких коэффициентов усиления SERS, необходимо изготавливать шероховатые поверхности.

Таблица 11. Результаты моделирования FDTD шероховатых поверхностей

Тип/параметры морфологии «решетка»	Локальное поле, $E$ , В/м	EF, $ E/E_0 ^4$ $10^3$ $xz$	EF, $ E/E_0 ^4$ $10^4$ $yz$	Интенсивность сигнала ГКРС, отн.ед. $xz$	Интенсивность сигнала ГКРС, отн. ед. $yz$
«решетка»	24.8	$1.2 \cdot 10^3$	3.65	32	3.0

Спектры гигантского комбинационного рассеяния света регистрировали в спектральном диапазоне 200-2000  $\text{см}^{-1}$ , а диапазон 400-1800  $\text{см}^{-1}$  был выбран для дальнейших спектральных и статистических манипуляций. Согласно Рисунку 53 было выполнено 2 подхода для статистической обработки для всех 94 спектров для проверки гипотезы.

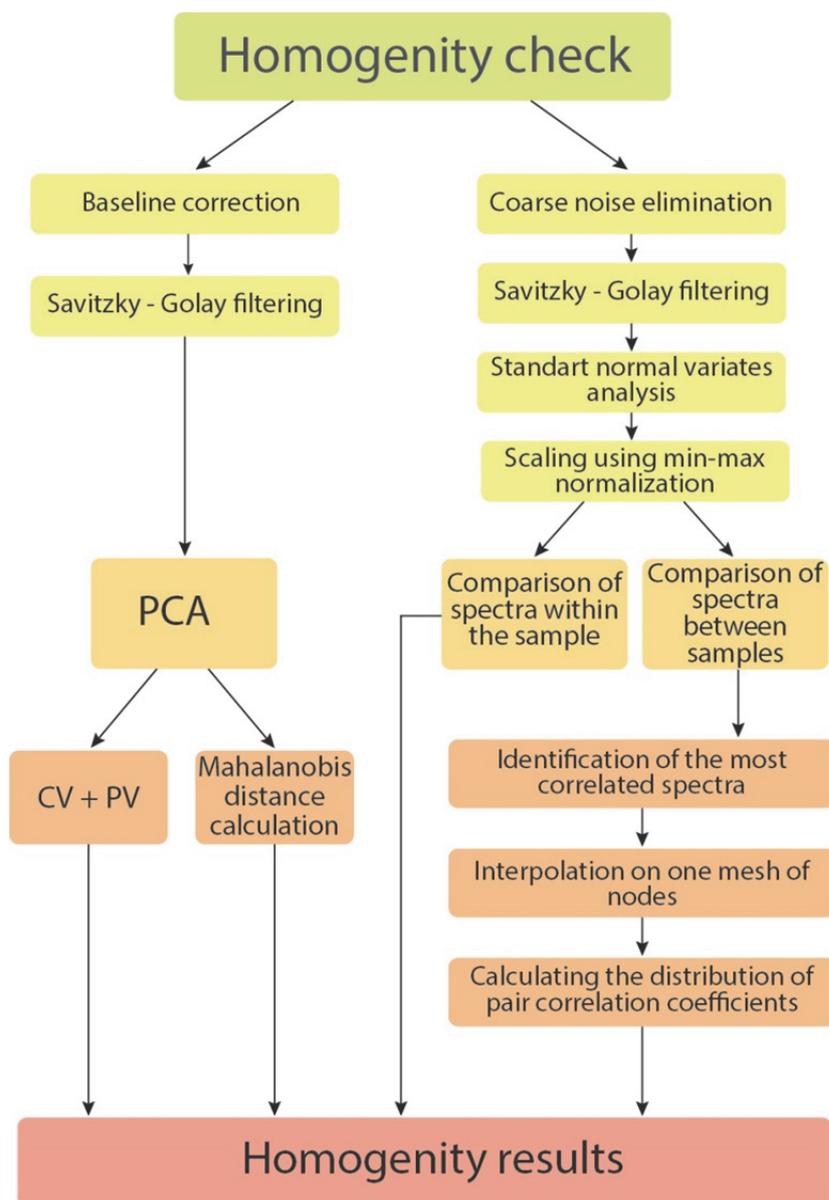


Рис. 53. Принципиальная схема выполняемого статистического анализа, опубликованная в статье [305].

Для анализа спектров в данной работе использовался метод главных компонент (РСА), который был реализован с помощью программного пакета KnowItAll Vibrational Spectroscopy Edition, лицензия № 112029, предоставляющего возможности для обработки и анализа данных в области вибрационной спектроскопии. Статистический модуль MVP, входящий в состав данного пакета, применялся в качестве первого подхода к анализу, позволяя выявить основные компоненты, которые вносили наибольший вклад в вариацию данных. В рамках исследования использовались различные методы классификации, которые основывались на оценке разброса значений парных корреляций, а также на анализе среднего момента этих корреляций. Предварительная обработка данных перед выполнением РСА включала несколько ключевых этапов. Первым шагом была фильтрация Савицкого-Голея, используемая для сглаживания спектров, устранения высокочастотного шума и более точного выделения характерных максимумов. Далее была проведена нормализация базовой линии на интенсивность. Масштабирование проводилось в пределах групп спектров, снятых с одного образца, включая данные, полученные до и после перезагрузки оборудования.

Процесс масштабирования состоял из двух последовательных процедур. Первая процедура, Standard Normal Variate (SNV), использовалась для обеспечения сопоставимости спектров по интенсивности. Этот метод позволяет устранить систематические ошибки, связанные с изменениями в условиях эксперимента, таких как вариации в интенсивности источника света или в характеристиках детектора. Вторая процедура, минимальная-максимальная нормировка, была применена для того, чтобы все спектры находились в положительной области значений. Это важно, так как при использовании SNV спектры могут содержать как положительные, так и отрицательные значения, что делает дальнейший анализ релевантным. Нормировка в положительной полуплоскости упрощает интерпретацию результатов и позволяет более эффективно визуализировать данные. Таким образом, использование методов РСА в сочетании с тщательной предварительной обработкой данных и применением различных методов классификации позволяет значительно улучшить качество анализа спектров и выявить важные закономерности в данных, что в свою очередь может быть полезно для дальнейших исследований в области вибрационной спектроскопии и смежных дисциплин. Выполняя РСА в качестве первого способа, были установлены баллы главных компонент (ГК). Выходные переменные (ГК1, ГК2, ГК3) использовали для описания спектральных различий в спектральных данных тромбоцитов. Рис. 54а иллюстрирует весь набор данных комбинационного рассеяния, скорректированный и отфильтрованный по базовой линии. Показана хорошая спектральная однородность (более 95%), за исключением трех аномальных спектров, вызванных подложкой SERS. Усредненные спектры комбинационного рассеяния отмечены красной линией (рис. 54б). 3D-график РСА с тремя ГК показано на рисунке 54а. Трехмерный график обозначает рамановское представление, сгруппированное для здорового пациента. Рис. 63а иллюстрирует кумулятивную дисперсию набора данных КРС (Рис. 54а) и значение процентной дисперсии (Рис. 54б). Первые три

компоненты представлены осями графика и охватывают наибольшую дисперсию данных. Кумулятивная дисперсия (CV) в анализе данных представляет собой важный инструмент для понимания структуры и распределения вариаций в наборе данных. В данном случае, анализ показал, что три главные компоненты (ГК1, ГК2 и ГК3) вносят значительный вклад в объяснение спектральных вариаций. В частности, первая главная компонента (ГК1) отвечает за 81,8% всех вариаций, что указывает на то, что она содержит основную информацию о данных. Вторая главная компонента (ГК2) добавляет еще 11,6%, увеличивая общий вклад до 93,4%. Третья главная компонента (ГК3) вносит последние 3,8% и достигая общего результата в 97,2%

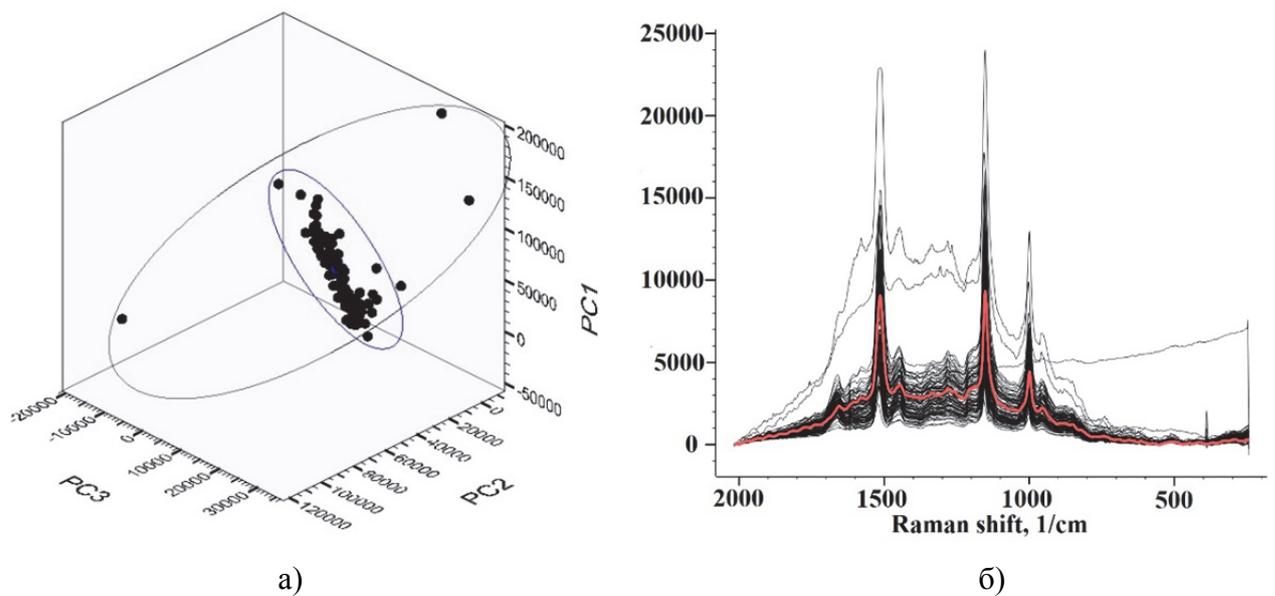


Рис. 54. Набор спектральных данных комбинационного рассеяния (а) и трехмерный график PCA набора тромбоцитов (б).

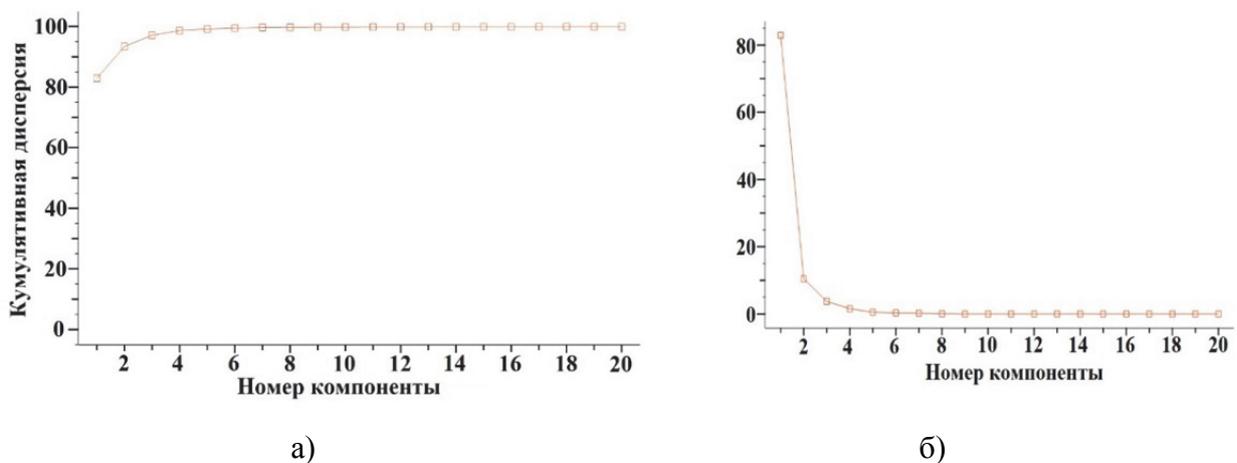


Рис. 55. Кумулятивная дисперсия набора данных комбинационного рассеяния света (а) и значение процентной дисперсии (б).

Для определения сходства между спектрами в данной работе было применено расстояние

Махаланобиса, которое выступает в качестве специального параметра для анализа спектров клеток крови (КР) [318]. Этот метод позволяет более точно оценивать различия между спектрами, учитывая не только расстояние между точками в многомерном пространстве, но и ковариацию данных. Это означает, что расстояние Махаланобиса корректирует влияние различных признаков в зависимости от их изменчивости, что делает его особенно полезным в задачах, связанных с анализом многомерных данных [319].

Расстояние Махаланобиса рассчитывается как стандартное отклонение от среднего значения выборки, что позволяет получить более полное представление о том, насколько близко находится конкретный спектр к другим спектрам в выборке. В данной работе было проведено измерение расстояния Махаланобиса для 91 спектра, и результаты показали, что для большинства из них (97%) расстояние не превышало 5. Однако для трех спектров были зафиксированы значительно более высокие значения, равные 14, 32 и 91. Эти результаты указывают на то, что в выборке существуют спектры, которые заметно отличаются от остальных, что может быть признаком их уникальности или наличия каких-либо аномалий.

Кроме того, важно отметить, что метод расстояния Махаланобиса основывается на интуитивно понятных принципах. Хорошая функция сходства должна обеспечивать высокие (или низкие) оценки для пар точек, принадлежащих одному классу, что позволяет сделать вывод о гомогенности анализируемых данных. В данном случае, результаты анализа подтвердили, что спектры тромбоцитов являются однородными [320]. Это открытие может иметь значительное значение для дальнейших исследований в области гемостазиологии и диагностики заболеваний, связанных с нарушением функции тромбоцитов.

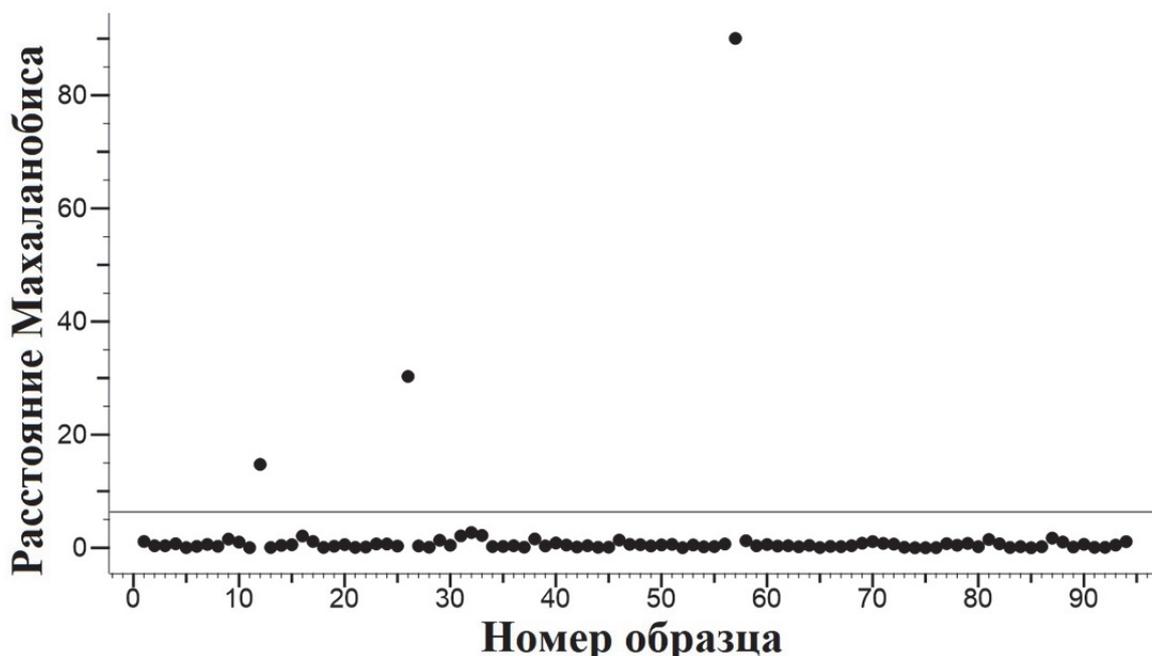


Рис. 56. Распределение расстояний Махаланобиса для спектрального набора комбинационного рассеяния.

На рисунке 56а представлен набор спектров для одного образца до предварительной обработки,

что позволяет увидеть исходные характеристики и выявить возможные аномалии или несоответствия. На рисунке 56б показаны те же спектры после предварительной обработки, которая могла включать в себя фильтрацию, нормализацию или другие методы, направленные на улучшение качества данных. Сравнение этих двух наборов спектров позволяет сделать выводы о том, как обработка влияет на спектральные характеристики и какую роль она играет в повышении точности анализа.

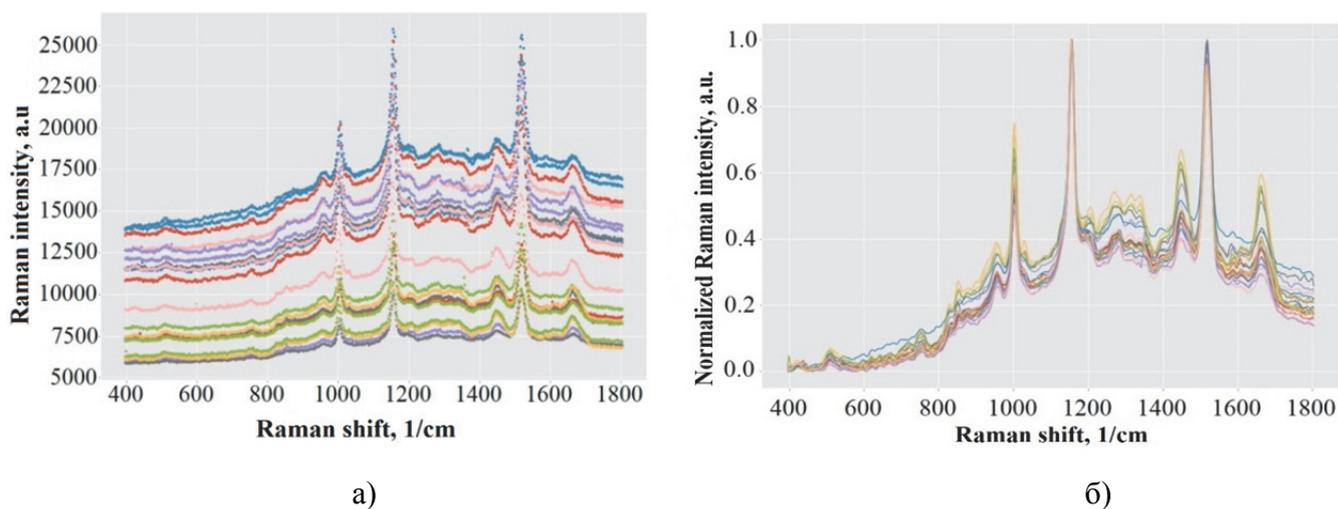


Рис. 57. Набор спектров одного зонда здорового добровольца до преобработки (а) и после нее (б).

Существуют различные статистические методы, позволяющие количественно оценить степень «похожести» спектров [321,322], что является отдельной задачей в области спектроскопии и анализа данных. Одним из наиболее простых и распространенных способов является использование корреляции. В статистике применяются различные коэффициенты корреляции, такие как коэффициенты Пирсона и Спирмена, которые позволяют определить, насколько сильно связаны два набора данных. Эти коэффициенты могут быть использованы в своем стандартном виде, а также в модифицированном, что может повысить их информативность в определенных ситуациях. Например, существует модификация коэффициента корреляции Пирсона, в которой убрана поправка на средние значения выборок. Это означает, что значения выборок задаются равными нулю, что позволяет получить нормализованную функцию взаимной корреляции при нулевом сдвиге. Такой подход может быть полезен для сравнения спектров, особенно когда имеется осевая базовая линия. Однако, как показали наши экспериментальные данные, использование этого показателя может привести к слишком высоким значениям даже в тех случаях, когда визуальные различия между спектрами достаточно заметны. При реализации второго статистического подхода мы решили не проводить полную коррекцию базовой линии в процедурах преобработки данных.

Это решение было обусловлено рядом причин, которые можно ранжировать по степени их важности. Во-первых, экспериментальные спектры часто содержат аналогичный фон, и в таких случаях нет необходимости сравнивать их со спектрами, из которых этот фон был бы удален. Это позволяет сохранить важные характеристики данных, которые могут быть утрачены при чрезмерной коррекции. Во-вторых, масштабирование SNV (Standard Normal Variate) является эффективным методом, который корректирует сдвиг базовой линии и глобальные вариации интенсивности. Этот метод позволяет значительно улучшить сравнение экспериментальных спектров, что наглядно демонстрируется на графиках, таких как, например, рис. 57б. Использование SNV помогает учесть вариации, которые могут возникнуть из-за различных условий эксперимента, таких как изменения температуры или давления, и тем самым делает анализ более точным. Таким образом, выбор статистических методов для оценки идентичности спектров должен основываться на понимании специфики данных и задач, которые необходимо решить. Важно учитывать, что разные методы могут давать различные результаты, и поэтому их следует использовать в сочетании, чтобы получить наиболее полное представление о степени сходства или различия исследуемых спектров. Также стоит отметить, что алгоритмы настройки базовой линии не всегда работают корректно.

Для оценки сходства был использован коэффициент корреляции Пирсона. За счет поправки на средние значения обладает необходимой чувствительностью к сходству и различию спектров с фоном. Значение 0 указывало на полное несовпадение спектров, а 0,9 и выше в 1, наоборот, указывало на их идентичность. Показателями сходства/однородности спектров одной выборки являются разброс значений их парных корреляций, а также средний момент этих корреляций. В общем случае коэффициент корреляции не является аддитивным (поскольку не является линейной зависимостью) и его усреднение хотя и возможно арифметически, но не совпадает со средней корреляцией по всем выборкам. Вместо этого используют другой, аддитивный, показатель зависимости, обычно это коэффициент детерминации, равный квадрату коэффициента корреляции. Однако, учитывая характер рассматриваемых данных, а также тот факт, что ни один из рассчитанных для данного исследования коэффициентов корреляции не принимает отрицательных значений, адекватной средней мерой будет их усреднение.

Гипотеза о спектральной однородности тромбоцитов, полученных в разные дни от одного и того же здорового человека. Найденные наилучшие спектры от каждого из образцов сравнивались так же, как это было со спектрами, взятыми от одного образца. Но в отличие от них в спектрах разных образцов координаты точек не совпадают по оси частот — они имеют разный шаг и сдвиг. Поэтому, чтобы сравнить лучшие спектры от каждой выборки в одной ячейке датасета, полученной по результатам работы программы `Parsec`, для каждого из них с помощью кубической интерполяции были рассчитаны значения интенсивности в 5000 (новых) точках, значение которых по оси частот равномерно перекрывает спектральный диапазон  $400\text{-}1800\text{ см}^{-1}$ . Пример начальных точек одного спектра и полученных с помощью функции интерполяции показан на Рисунке 58.

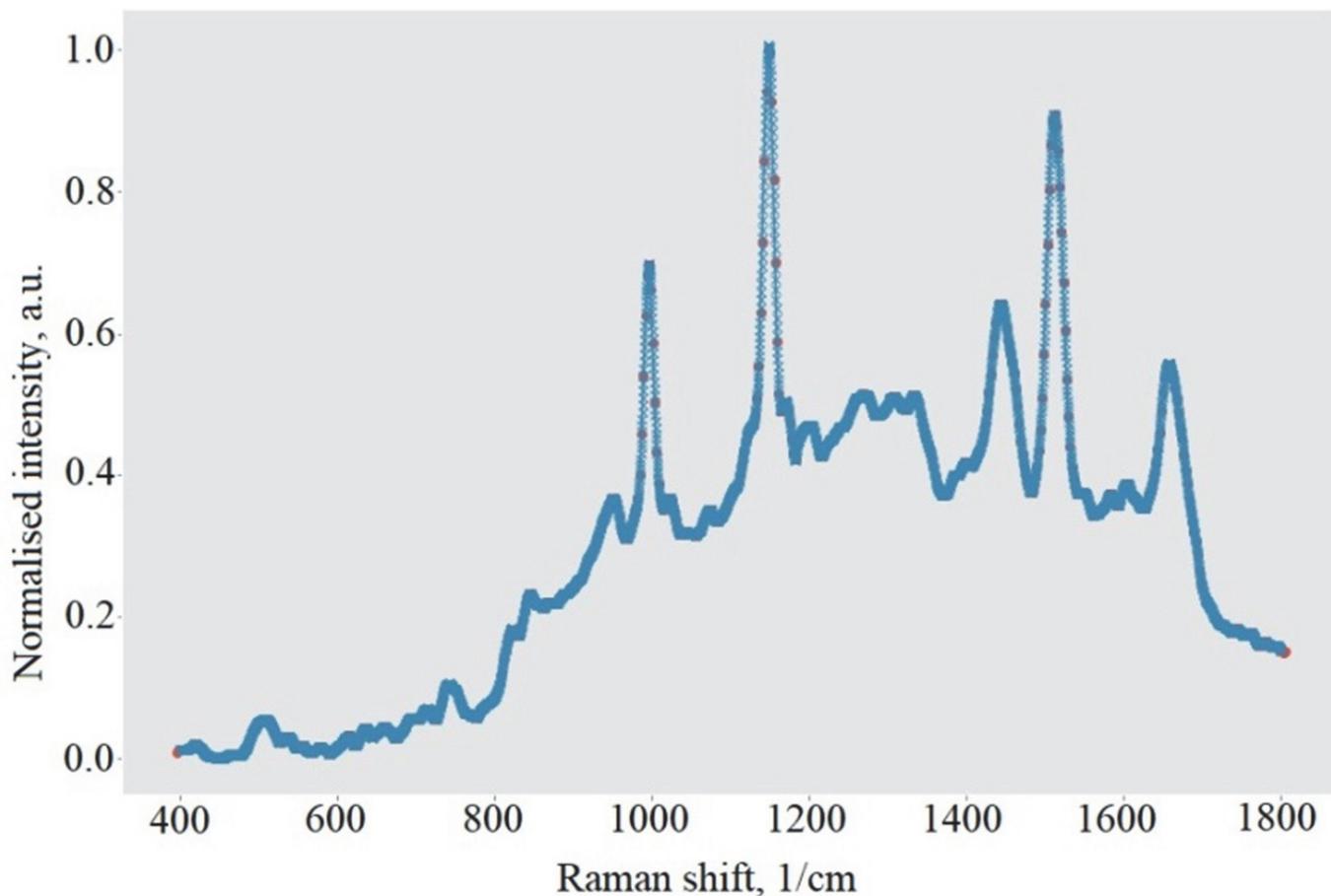


Рис.58. Пример интерполированных спектров тромбоцитов

Для каждого образца рассматривалась корреляция всех пар его спектров. На рисунке 67 представлена матрица корреляций, составленная для 20 спектров в разных точках одной пробы здорового человека, половина из которых снята после перезапуска оборудования. На рисунке 67 показано распределение значений из этой матрицы, показанной на рисунке 89 в виде гистограммы (Рис. 60а) и прямоугольной диаграммы (Рис. 60б).

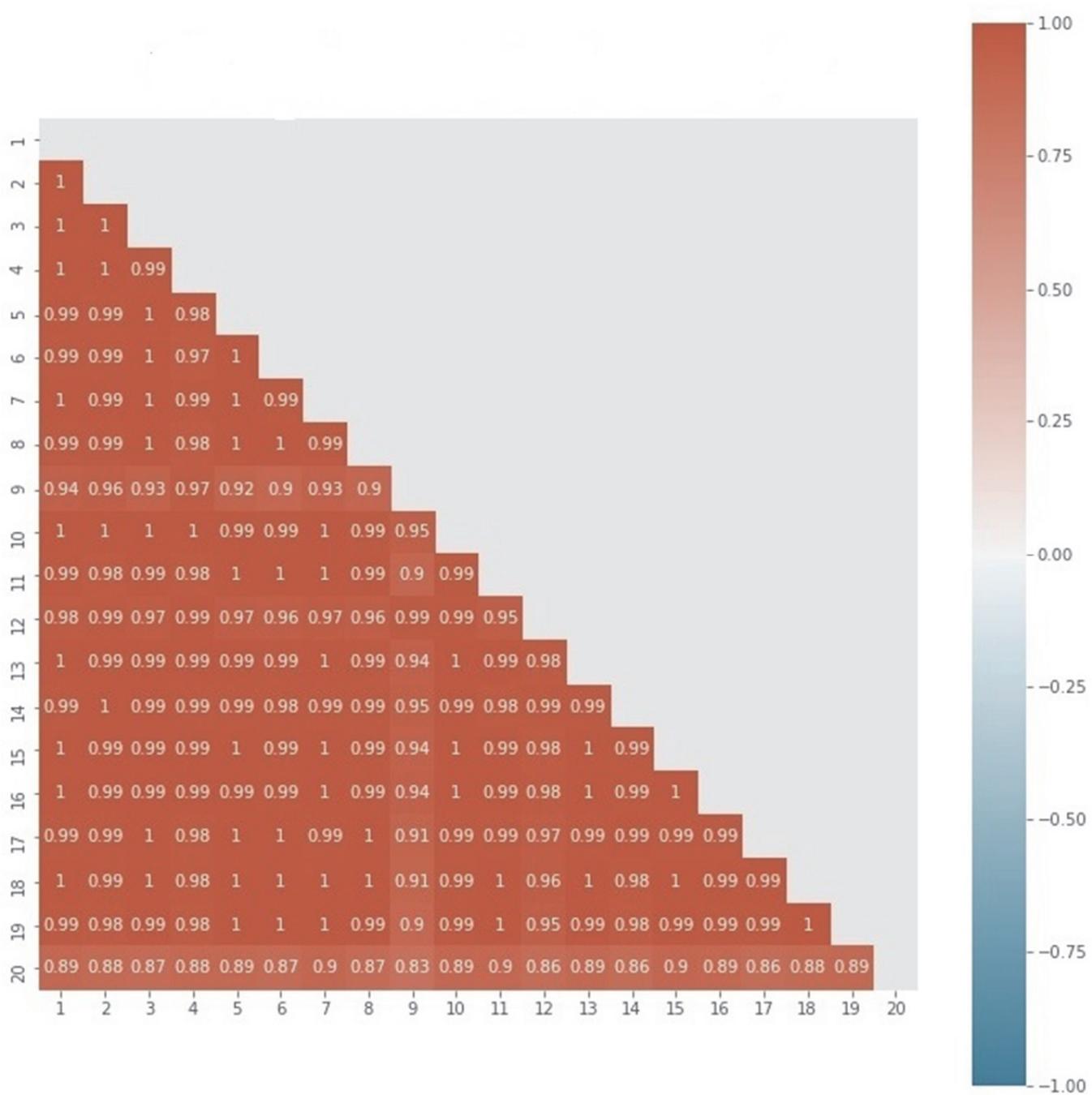


Рис. 59. Спектры парной линейной спектральной корреляция спектров КРС внутри одного образца. Оси X и Y отражают порядковый номер спектра образца

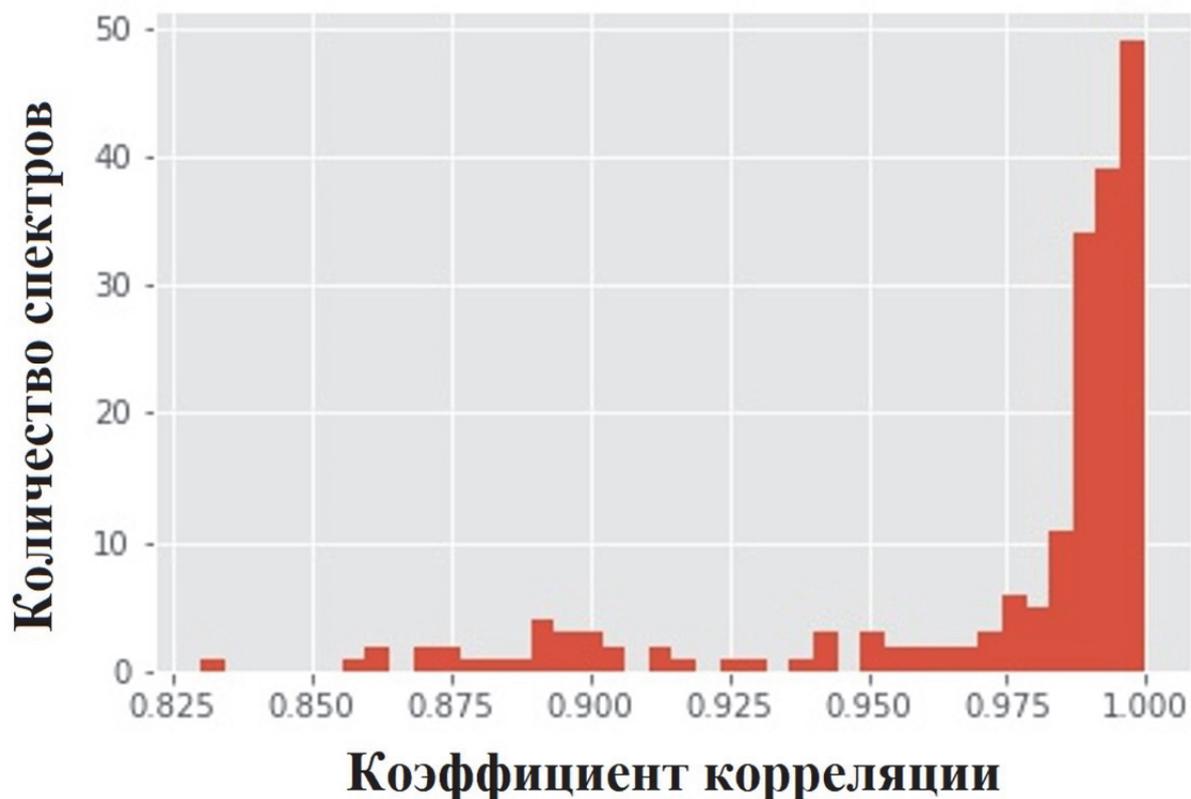


Рис. 60. Распределение значений матрицы рис. 59 в виде гистограммы

Далее проводился корреляционный анализ спектров каждого образца. На Рис. 61 представлена матрица корреляций, составленная для 7 наборов по 10 спектров в каждом. Все спектры сняты в разных точках одного образца здорового человека. Распределение значений показано в виде матрицы (Рис. 61).

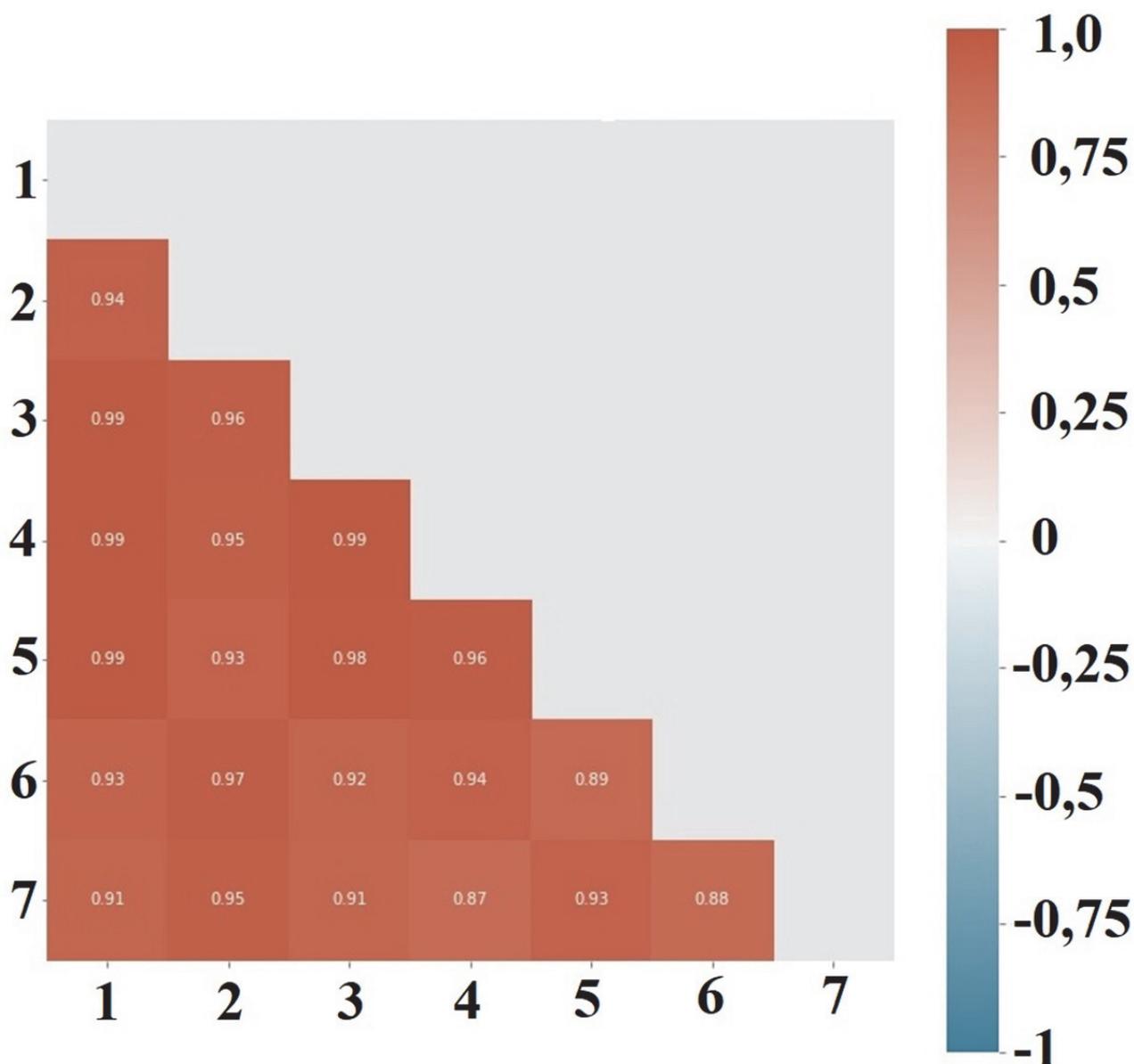


Рис. 61. Спектры комбинационного рассеяния с парной линейной спектральной корреляцией между образцами. По осям X, Y отложен номер образца, в значениях матрицы отображено значение коэффициента корреляции.

Результаты позволяют сделать вывод о том, что спектры, относящиеся к одному образцу, обладают высокой однородностью, и их воспроизводимость сохраняется после перезагрузки оборудования. Это имеет важное значение для дальнейших исследований в области медицинской диагностики и биомедицинских технологий и демонстрирует возможность применения спектроскопии КРС и ГКРС для получения результатов, отраженных в данной диссертации. Полученные результаты отражены в опубликованной статье [305].

### 3.2 Спектральные КР исследования здоровых пациентов и пациентов с патологиями ССЗ

Следующим этапом проводилось исследование, в котором участвовали здоровые добровольцы и пациенты с патологией ССЗ. В исследовании приняли участие 121 здоровый доброволец и 9 пациентов с сердечно-сосудистой патологией. Письменное информированное согласие было

получено у всех здоровых добровольцев и пациентов перед проведением любых процедур исследования. Все документы исследования, включая информированное согласие и протокол, были одобрены Локальным этическим комитетом Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта (Протокол № 8 от 16.05.2019 г.). В исследование были включены здоровые добровольцы в возрасте от 18 до 45 лет без острых и хронических заболеваний, а также пациенты с инфарктом миокарда в анамнезе, получающие двойную антитромбоцитарную терапию (аспирин 100 мг/сут + клопидогрель 75 мг/сут). Образцы крови брали у здоровых добровольцев и пациентов как до антитромбоцитарной терапии, так и через 5 дней лечения аспирином (100 мг/сут) и клопидогрелом (75 мг/сут). Образцы свежей венозной крови помещали в вакуумную пробирку, содержащую ЭДТА (пробирки BD Vacutainer® K2EDTA, покрытые распылением), и центрифугировали при 60 g в течение 15 минут для отделения богатой тромбоцитами плазмы, отделяли красные кровяные клетки и надосадочную жидкость. Тромбоциты собирали путем дальнейшего центрифугирования супернатанта при 1500 g в течение 15 мин. Центрифугирование проводили при 4°C на центрифуге Eppendorf 5702R.

После приготовления тромбоцитов образцы сразу же отбирали для исследования с помощью SERS-спектроскопии. После реализации методологии, описанной в методологической главе и для более детального анализа спектральный диапазон был разделен на три части: область 425 – 580  $\text{см}^{-1}$  для анализа дисульфидных связей S-S; 1220 – 1300  $\text{см}^{-1}$  для анализа групп Амид III; 1600 – 1740  $\text{см}^{-1}$  для анализа Амид I. Другие возможные изменения анализировались в диапазоне 400-1800  $\text{см}^{-1}$ . Исходные усредненные спектры здоровых добровольцев, здоровых добровольцев, получающих антитромбоцитарную терапию, и больных ССЗ представлены на Рис. 62. Основные спектральные характеристики спектров сведены в Табл. 12. Зарегистрированные спектры имели следующие основные характеристические полосы: S-S валентные колебания при 517 и 544  $\text{см}^{-1}$ ; скелетные колебания C-C при 614  $\text{см}^{-1}$  и 643  $\text{см}^{-1}$ ; эфир фосфорной кислоты при 757  $\text{см}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца при 829  $\text{см}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца в Туг/фосфатных группах при 851  $\text{см}^{-1}$ ; C-C колебания ароматического кольца при 941  $\text{см}^{-1}$  и 955  $\text{см}^{-1}$ ; ароматическая  $\delta$ -кольцевая мода при 1004  $\text{см}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}\beta\text{-метил})$  при 1130  $\text{см}^{-1}$ ; Валентные колебания C-C при 1154  $\text{см}^{-1}$ ; Кольцевая вибрация Туг при 1206  $\text{см}^{-1}$  в плазме; =C-H валентные колебания при 1275  $\text{см}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца при 1341  $\text{см}^{-1}$ ; деформационные колебания  $\text{CH}_2$  при 1450  $\text{см}^{-1}$ ;  $\text{NH}_3$  симметричные деформационные плоскостные колебания при 1519  $\text{см}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца Тгр и Туг при 1581  $\text{см}^{-1}$  и 1614  $\text{см}^{-1}$  соответственно; Амид I, C=C при 1666  $\text{см}^{-1}$ .

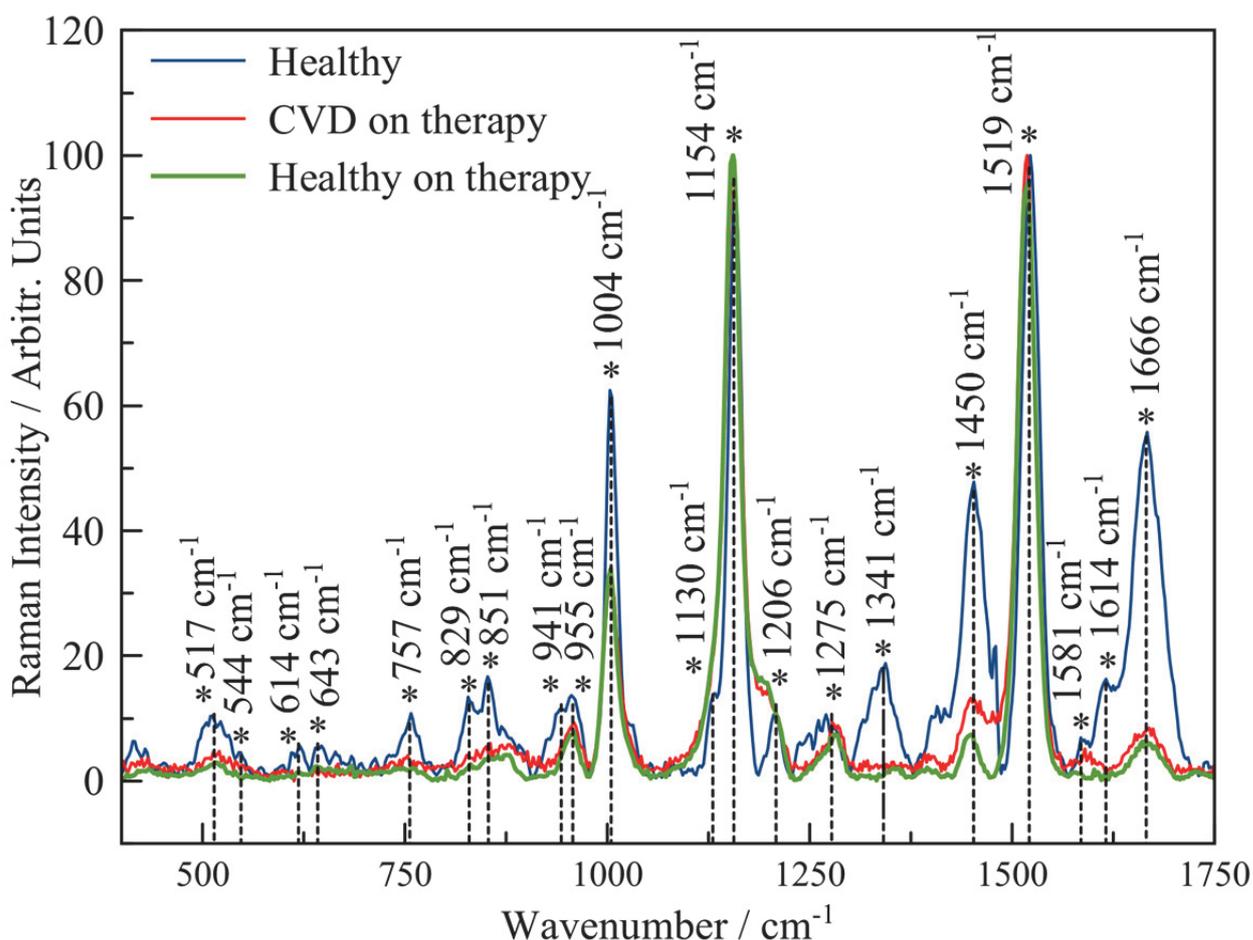


Рис. 62. Спектры КР тромбоцитов в области спектра 400-1750  $\text{cm}^{-1}$  у здоровых лиц (синяя линия), здоровых лиц, получающих антитромбоцитарную терапию (зеленая линия) и лиц с сердечно-сосудистой патологией (красная линия) [406].

По результатам спектрального анализа были выявлены спектральные различия между выборками для областей: S-S валентные колебания при 517 и 544  $\text{cm}^{-1}$ ; скелетные колебания C-C при 614  $\text{cm}^{-1}$  и 643  $\text{cm}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца в Туг/фосфатных группах при 851  $\text{cm}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца при 829  $\text{cm}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца в Туг/фосфатных группах при 851  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}\beta\text{-метил})$  при 1130  $\text{cm}^{-1}$ ; Кольцевая вибрация Туг при 1206  $\text{cm}^{-1}$  в плазме; Колебания ароматического кольца при 1341  $\text{cm}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца Тгр и Туг при 1581  $\text{cm}^{-1}$  и 1614  $\text{cm}^{-1}$  соответственно; Амид I, C=C стр. при 1666  $\text{cm}^{-1}$ . Чтобы показать различия в интенсивностях, была построена диаграмма с максимумами основных спектров (Рис. 63). Спектры здоровых пациентов, получавших антитромбоцитарную терапию, использовались в качестве контроля активности антитромбоцитарного препарата и исключались из дальнейшего анализа.

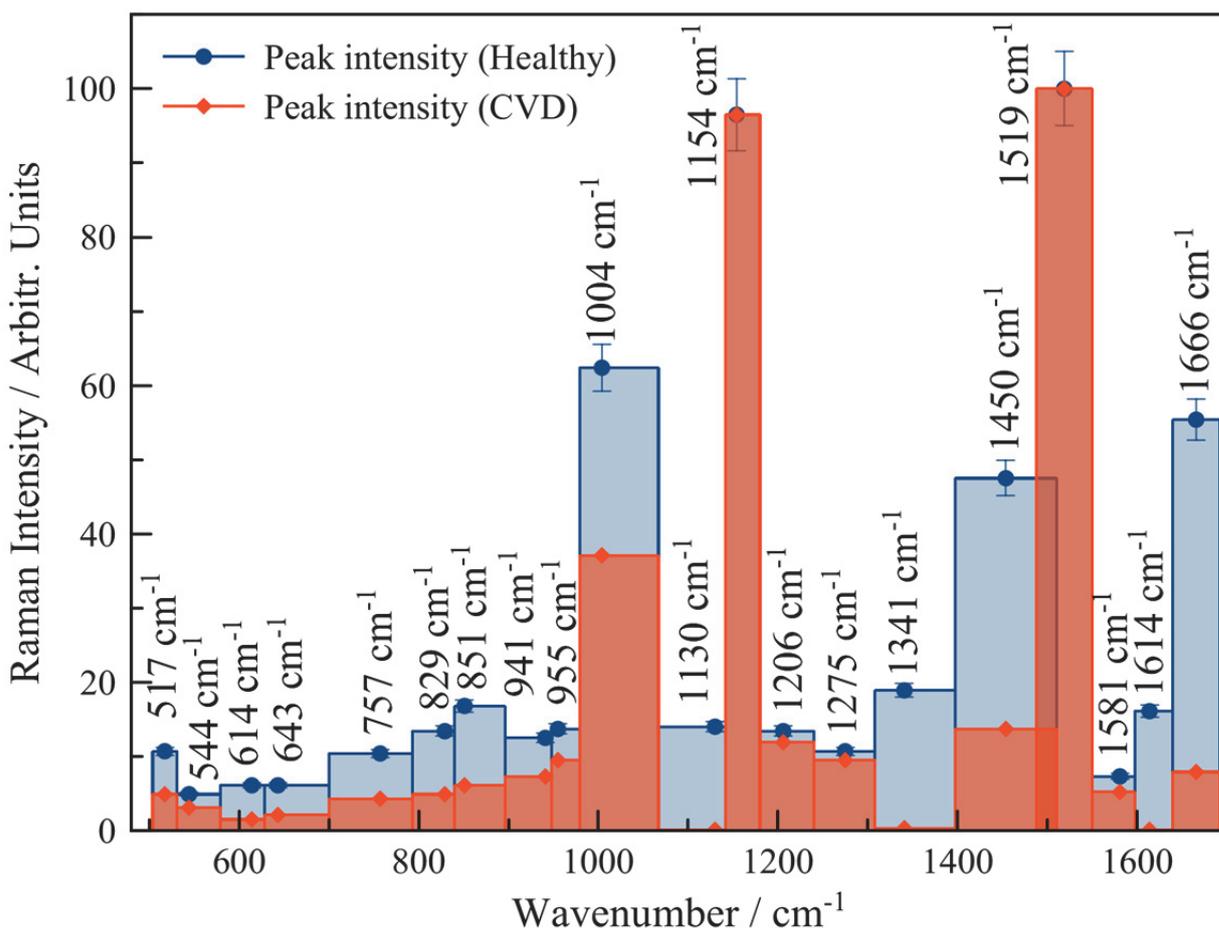


Рис. 63. Интенсивность спектров КР тромбоцитов для здоровых лиц (синяя линия) и лиц с сердечно-сосудистой патологией (красная линия) [406].

Было отмечено, что у здоровых пациентов без проводимой антитромбоцитарной терапии интенсивность не изменялась в следующих полосах:  $\nu(\text{C}\beta\text{-метил})$  при  $1130 \text{ cm}^{-1}$  (для белков) при  $1130 \text{ cm}^{-1}$ ; Валентные колебания С–С при  $1154 \text{ cm}^{-1}$  (для белков) при  $1154 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{NH}_3$  симметричные деформационные плоскостные колебания при  $1519 \text{ cm}^{-1}$ . Для остальных полос интенсивность увеличивается в: S-S валентные колебания при  $517 \text{ cm}^{-1}$  (54%) и  $544 \text{ cm}^{-1}$  (37%); скелетные колебания С–С (для Phe и Tyr) при  $614 \text{ cm}^{-1}$  (75%) и  $643 \text{ cm}^{-1}$  (66%) соответственно; эфир фосфорной кислоты при  $757 \text{ cm}^{-1}$  (59%); Колебания ароматического кольца (для Tyr) при  $829 \text{ cm}^{-1}$  (63%); Колебания ароматического кольца в Tyr/фосфатных группах при  $851 \text{ cm}^{-1}$  (63%); колебание С–С остова (для липидов и белков) при  $941 \text{ cm}^{-1}$  (42%) и  $955 \text{ cm}^{-1}$  (31%); Ароматическая  $\delta$ -кольцевая мода (для Phe) при  $1004 \text{ cm}^{-1}$  (40%); Колебания ароматического кольца Tyr при  $1206 \text{ cm}^{-1}$  (11%) в плазме;  $=\text{C}-\text{H}$  в деформационных колебаниях (для ненасыщенных жирных кислот) при  $1275 \text{ cm}^{-1}$  (11%); Деформационные колебания  $\text{CH}_2$  (для липидов) при  $1450 \text{ cm}^{-1}$  (71%). Колебания ароматического кольца Tyr при  $1581 \text{ cm}^{-1}$  (29%); скелетные колебания С=C ул. в амиде I при  $1666 \text{ cm}^{-1}$  (85%). Таким образом, при изучении спектров ГКРС были разрешены, идентифицированы и сравнены характеристики колебательных полос тромбоцитов, включающих

аминокислоты: Cys, Phe, Tug, Tgr, дисульфидные мостики, белки, липиды и другие компоненты. Различия между спектрами обусловлены антитромбоцитарной терапией и ее влиянием на структуру тромбоцитов. Эта информация может быть использована в качестве характерных маркеров для определения эффективности антитромбоцитарной терапии. Все выявленные полосы КР тромбоцитов подробно описаны в Таблице 12.

Таблица 12. Характеристические полосы комбинационного рассеяния тромбоцитов. Сокращения: *w*, слабый; *mw*, средне-слабый; *m*, средний; *ms*, средней силы; *s*, сильный; *vs*, очень сильный;  $\delta$ : деформационная вибрация, *v*: вибрация растяжения; *sh*: плечо

<b>С патологией</b>				
<b>сердечно-сосудистых заболеваний</b>	<b>Здоровые</b>	<b>Колебательная мода</b>	<b>Компонента</b>	<b>Ссылка</b>
517 <i>w</i>	517 <i>m</i>	S—S валентн. колеб.	Цистеин	324
544 <i>w</i>	544 <i>w</i>	S—S валентн. колеб.	Цистеин	341,326
614 <i>w</i>	614 <i>w</i>	C—C крутильное	Фенилаланин	323
643 <i>w</i>	643 <i>mw</i>	C—C крутильное	Тирозин	341,327
757 <i>w</i>	757 <i>mw</i>	эфир фосфорной кислоты ул.	Кефалин	341,328
829 <i>mw</i>	829 <i>m</i>	Колебания ароматического кольца	Триптофан	333
851 <i>mw</i>	851 <i>m</i>	Колебания ароматического кольца в тирозине, фосфатных группах	Белки, фосфолипиды	341,329
941 <i>mw</i>	941 <i>m</i>	C—C скелетные колебания	Липиды, белки	341,330
955 <i>mw</i>	955 <i>m</i>	C—C скелетные колебания	Липиды, белки	341,330
1004 <i>s</i>	1004 <i>vs</i>	Колебания ароматического кольца	Фенилаланин	341,331
-	1130 <i>msh</i>	$\nu(\text{C}_\beta\text{-methyl})$	Белки	335
1154 <i>vs</i>	1154 <i>vs</i>	Валентные колебания C—C	Белки	341,329
1206 <i>m</i>	1206 <i>m</i>	Плоскостные колебания кольца	Тирозин	325
1275 <i>m</i>	1275 <i>m</i>	Валентные колебания =C—H	Ненасыщенные жирные кислоты	341,329
-	1341 <i>m</i>	Колебания ароматического кольца	Триптофан	334

1450 m	1450 s	CH <sub>2</sub> деформационные колебания	Липиды	341,329
1519 vs	1519 vs	NH <sub>3</sub> -симметричные деформационные колебания	Белки	333
1581 m	1581 m	Колебания ароматического кольца	Триптофан	341,326
-	1614 m	Колебания ароматического кольца	Тирозин	341,332
1666 mw	1666 s	Amide I, C=C валентные колебания	Протеин, холестерин	341,329

У больных, находящихся на антитромбоцитарной терапии было выявлено снижение общей интенсивности практически всех полос, описанных выше. Полосы:  $\nu(\text{C}\beta\text{-метил})$  при  $1130 \text{ см}^{-1}$ ; колебания ароматического кольца Tug при  $1614 \text{ см}^{-1}$ ; Колебания ароматического кольца Tgr при  $1341 \text{ см}^{-1}$  не был обнаружен в тромбоцитах пациентов с ССЗ, получающих антитромбоцитарную терапию. Этот факт наряду со снижением общей интенсивности остатков Tug и Tgr свидетельствует о конформационных изменениях Tug-385 и Tgr-387 при необратимом ингибировании циклооксигеназы аспирином [336]. Полученные результаты опубликованы в работе [406,407].

Проведен дальнейший анализ спектров комбинационного рассеяния тромбоцитов спектральной области дисульфидных мостиков. Конформационные изменения дисульфидных мостиков для рецепторов тромбоцитов P2Y<sub>12</sub> могут выявить новые маркеры, характеризующие действие клопидогрела [337]. Недавние эксперименты демонстрируют, что оптически активные остатки цистеина (Cys) могут быть использованы для S-S для необратимого действия лечения клопидогрелом на рецептор P2Y<sub>12</sub> человека [338]. По данным [339] для цис-аминокислоты области S-S-дисульфидных мостиков обнаружены спектральные полосы: cys6-cys127 при  $507(509) \text{ см}^{-1}$ ; cys76-cys94 при  $519 \text{ см}^{-1}$ ; cys6-cys127 при  $570 \text{ см}^{-1}$ . Максимумы при  $545 \text{ см}^{-1}$  и  $531 \text{ см}^{-1}$  также принадлежат мостикам S-S, но не имеют доминирующего характера растяжения S-S [339]. На Рис. 65 представлены КР спектры тромбоцитов в диапазоне дисульфидных мостиков  $450 - 575 \text{ см}^{-1}$  для здоровых лиц и лиц с сердечно-сосудистой патологией. Выявлено отсутствие пика cys6-cys127 при  $570 \text{ см}^{-1}$  при ССЗ и общее снижение интенсивности КР для всех полос.

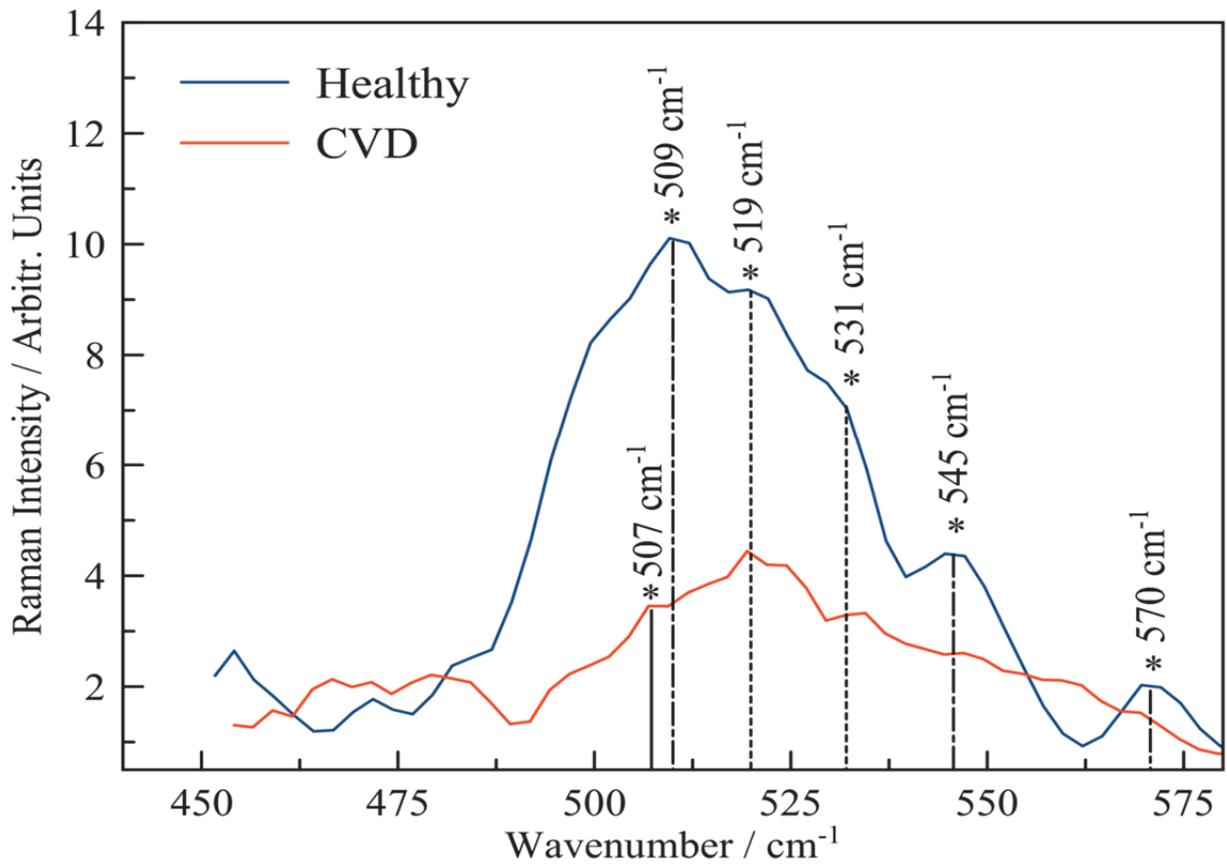


Рис. 64 Спектры КР тромбоцитов в области спектра дисульфидных мостиков 450-575  $\text{cm}^{-1}$  для здоровых лиц (синяя линия) и лиц с сердечно-сосудистой патологией (красная линия).

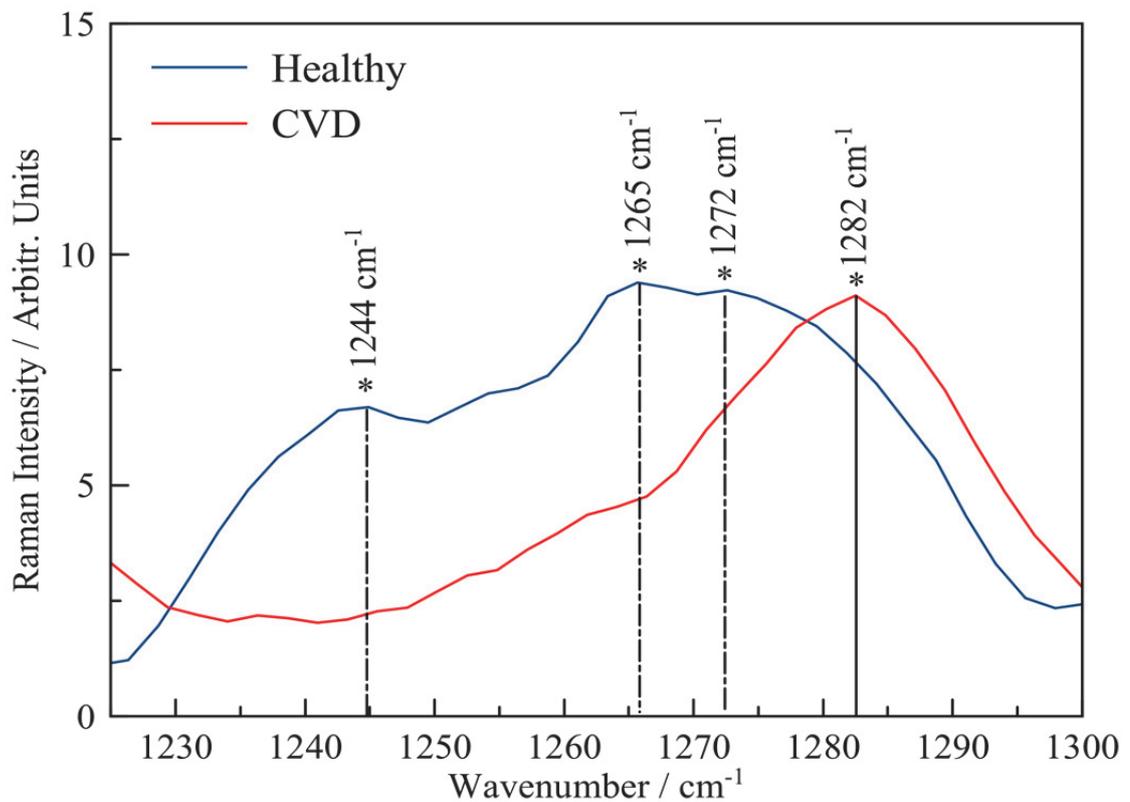


Рис. 65 Спектры КР тромбоцитов в области спектра амида III 1200-1300  $\text{cm}^{-1}$  для здоровых (синяя линия) и пациентов с сердечно-сосудистой патологией (красная линия). Сплошной линией отмечены пики сердечно-сосудистых заболеваний; комбинированные (сплошная и пунктирная

линии) отмечают максимумы для здоровых пациентов. Спектральный диапазон  $1200 - 1300 \text{ см}^{-1}$  связан с Амидом III и соответствует модам изгиба N-H и растяжения C-N, тогда как спектральный диапазон амида I соответствует диапазону длин волн  $1600-1700 \text{ см}^{-1}$ . В связи с тем, что связи N-H участвуют в образовании водородных связей в структуре рецептора P2Y<sub>12</sub> [337], полосы Амида III и Амида I являются конформационно чувствительными и могут давать информацию об изменениях структуры рецептора. Полосы амида III для спектров здоровых тромбоцитов и тромбоцитов с сердечно-сосудистыми заболеваниями выявляют  $\alpha$ -спираль и вторичную структуру случайного клубка белка (рис. 65). Для здоровых образцов основные характеристические полосы сосредоточены на  $1244 \text{ см}^{-1}$ ,  $1265 \text{ см}^{-1}$ ,  $1272 \text{ см}^{-1}$  и принадлежат случайному клубку (при  $1244 \text{ см}^{-1}$ ) и  $\alpha$ -спирали (при  $1265 \text{ см}^{-1}$  и  $1272 \text{ см}^{-1}$ ). Для образцов CVD наблюдалась только одна полоса при  $1282 \text{ см}^{-1}$ , которая также была смещена в красную область и связана с  $\alpha$ -спиралью.

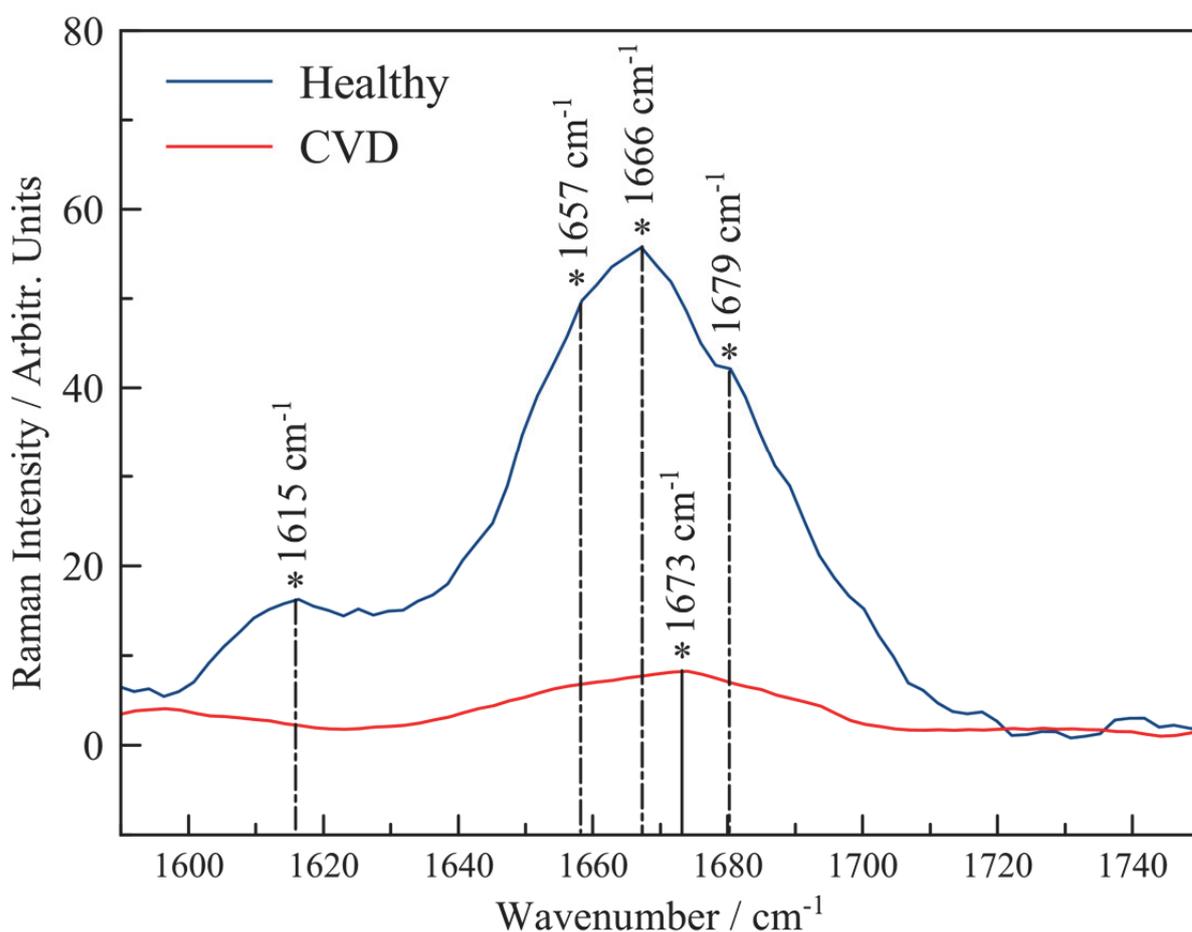


Рис. 66. Спектры комбинационного рассеяния тромбоцитов в диапазоне  $1600-1750 \text{ см}^{-1}$  Амида I для здоровых лиц (синяя линия) и лиц с сердечно-сосудистой патологией (красная линия). Сплошной линией отмечены пики сердечно-сосудистых заболеваний; комбинированные (сплошная и пунктирная линии) отмечают пики для здоровых пациентов.

Полоса амида I для спектров здоровых и сердечно-сосудистых тромбоцитов соответствует вторичной структуре белка  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -листу и антипараллельному  $\beta$ -листу (рис. 66). У образцов здоровых испытуемых основные характерные полосы сосредоточены на  $1657 \text{ см}^{-1}$ ,  $1666 \text{ см}^{-1}$ ,

1679  $\text{cm}^{-1}$  и соответствуют  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -листу и антипараллельному  $\beta$ -листу соответственно. Для образцов, взятых у пациентов с ССЗ, наблюдалась только одна полоса при 1673  $\text{cm}^{-1}$  ( $\beta$ -лист) [340]. Полоса 1614  $\text{cm}^{-1}$  для здоровых образцов соответствует колебанию кольцевой моды ароматической аминокислоты Туг [341]. Отсутствие полосы колебаний Туг может быть результатом необратимого ингибирования циклооксигеназы аспирином, как описано выше. Также выявлено снижение общей интенсивности в  $\beta$ -повороте и антипараллельном  $\beta$ -листе. Это свидетельствует о действии антитромбоцика на рецептор и спектральной регистрации его конформации.

### **3.3 Спектральные и время-разрешенные флуоресцентные исследования здоровых пациентов и пациентов с патологиями ССЗ**

В рамках данной работы были исследованы также спектральные и временные флуоресцентные фотопроцессы в тромбоцитах человека и их комплексах с наночастицами (НЧ) платины (Pt). Для этого были осуществлена серия экспериментов по синтезу наночастиц платины, описанная детально в методологической главе 2.4.2.

Размер полученных НЧ был измерен методом динамического рассеяния света на установке PhotoCorr Complex (ООО «ФотоКорр», Россия), он составил порядка 40-60 нм. Результаты измерения полосы поглощения на спектрофотометре UV-2600 (Shimadzu, Япония) зарегистрирована полоса поглощения плазмона Pt с пиком при  $\lambda = 251$  нм (Рис. 68). Всего было приготовлено 17 образцов и один образец со стабильным плазмонным поглощением и радиусом 51 нм. Концентрация НЧ Pt составляла  $6,9 \cdot 10^{10}$ , а молярная концентрация –  $2,5 \cdot 10$  нМ. В качестве контрольных образцов регистрировали также спектры флуоресценции Trp, Туг и Phe (Sigma). Моделирование Гаусса для спектров тромбоцитов было выполнено с использованием программного обеспечения Magic Plot. Время жизни флуоресценции тромбоцитов измеряли на установке Fluorolog-3 FL3-22 с использованием программного обеспечения Data Station.

В результате проведенной работы была выявлена возможность плазмонного переноса энергии между НЧ платины, мембраной тромбоцитов и ее составляющими и проявления флуоресцентных аминокислот. Для исследования описанных фотопроцессов применялись как экспериментальные, так и теоретические подходы. На Рис. 67 представлены спектры флуоресценции тромбоцитов и флуоресценции аминокислот (контроль).

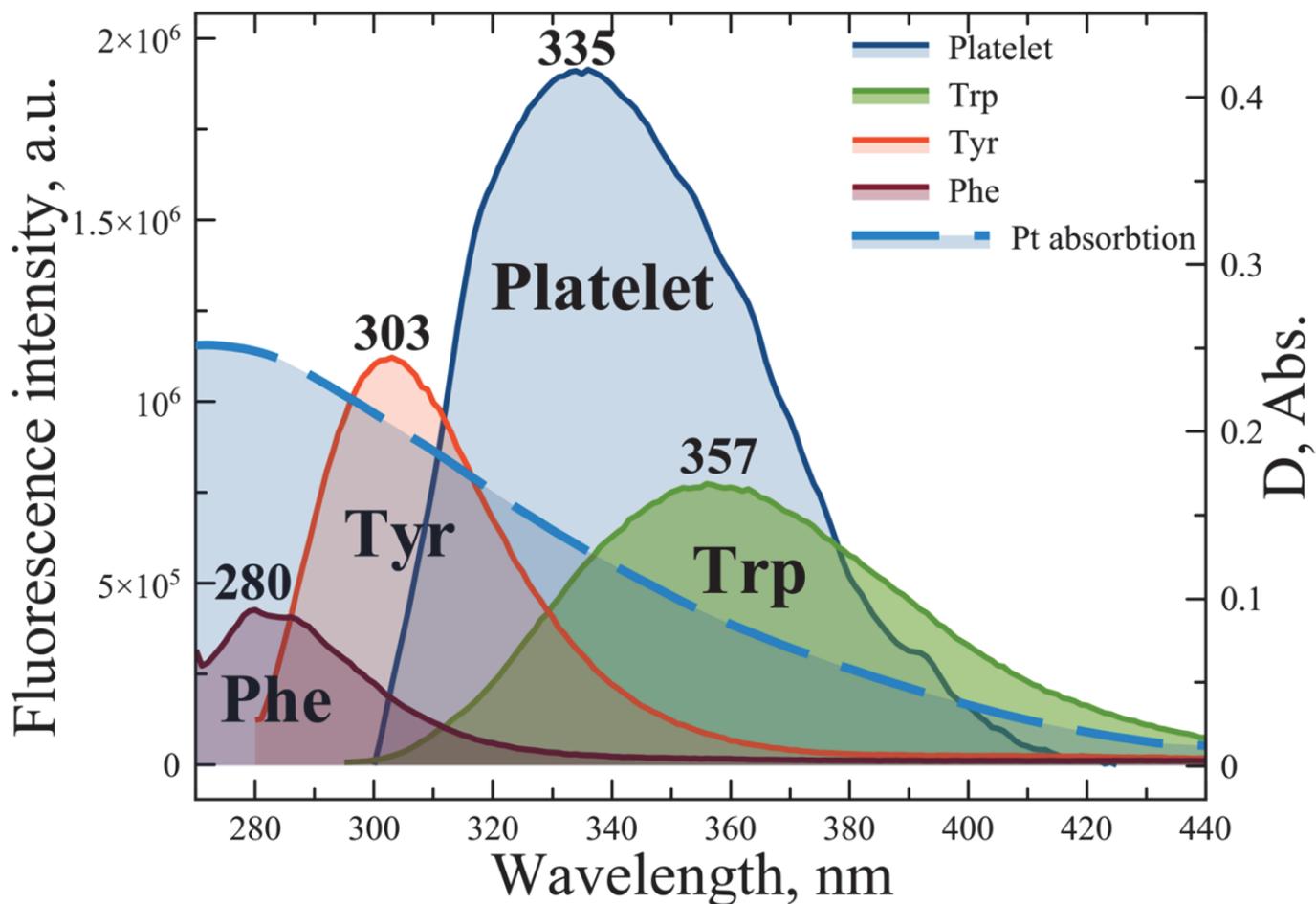


Рис. 67. Спектры поглощения НЧ Pt (синяя пунктирная линия), тромбоцитов (синяя сплошная линия), Trp (зеленая сплошная линия), Tyr (красная сплошная линия) и Phe (фиолетовая сплошная линия) спектры флуоресценции.

Из рисунка видно, что спектр флуоресценции тромбоцита с пиком при 335 нм имеет максимальное, частичное и минимальное перекрытие со спектрами флуоресценции Trp, Tyr и Phe соответственно. С другой стороны, все упомянутые выше спектры флуоресценции перекрываются со спектрами плазмонного резонанса Pt. В этом случае модели на основе FRET могут применяться для расчетов передачи энергии [342]. Для сравнения экспериментальных данных с теорией было выполнено моделирование кривыми Гаусса. Было показано, что спектр можно последовательно моделировать тремя кривыми Гаусса (рис. 67).

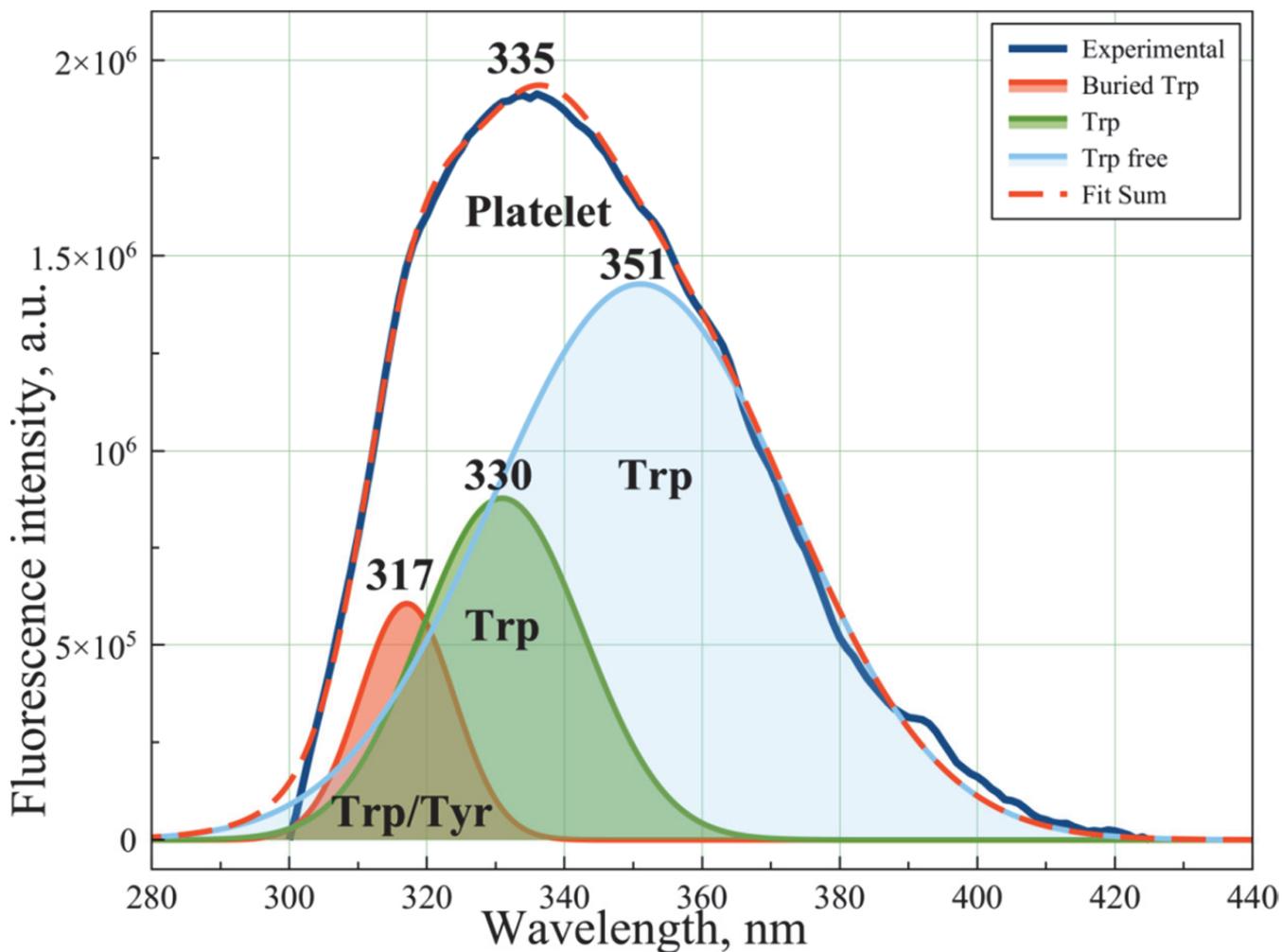


Рис. 68. Результаты моделирования Гаусса для экспериментальной кривой флуоресценции тромбоцитов (темно-синяя линия), включая: кривую свободного Трп (синяя линия), Трп на мембране тромбоцитов (зеленая линия) и скрытый/замаскированный остаток Туг Трп (красная сплошная линия) [308].

При сравнении теоретических и экспериментальных данных было установлено, что пики Трп показали наилучшую корреляцию, тогда как Туг и Phe показали минимальную корреляцию и отсутствие корреляции соответственно. Обсуждая Трп, мы предположили, что в нашем спектре присутствуют три остатка Трп и/или один остаток Туг. Пик флуоресценции Трп при  $\lambda = 357$  нм относится к изолированному Трп в воде [343]. Пик при  $\lambda = 317$  нм указывает на глубоко погребенный Трп в мембранных белках или мембране тромбоцитов или замаскированный Туг. Пик, возникающий при  $\lambda = 330$  нм, может обозначать остатки Трп на поверхности мембраны тромбоцитов или поверхности рецепторов тромбоцитов [349]. Следует отметить, что Phe имел чрезвычайно низкую интенсивность флуоресценции [350] при возбуждении на  $\lambda = 240$  нм.

По результатам спектральных измерений отмечены колебания интенсивности тромбоцитов как в отсутствие НЧ Pt, так и в их присутствии (рис. 68). Общая интенсивность уменьшалась при легировании пластинчатой массы НЧ Pt. В отсутствие НЧ Pt максимальная интенсивность флуоресценции достигала максимального и минимального значений  $3,01 \cdot 10^6$  и  $1,43 \cdot 10^6$  отн.ед. соответственно.

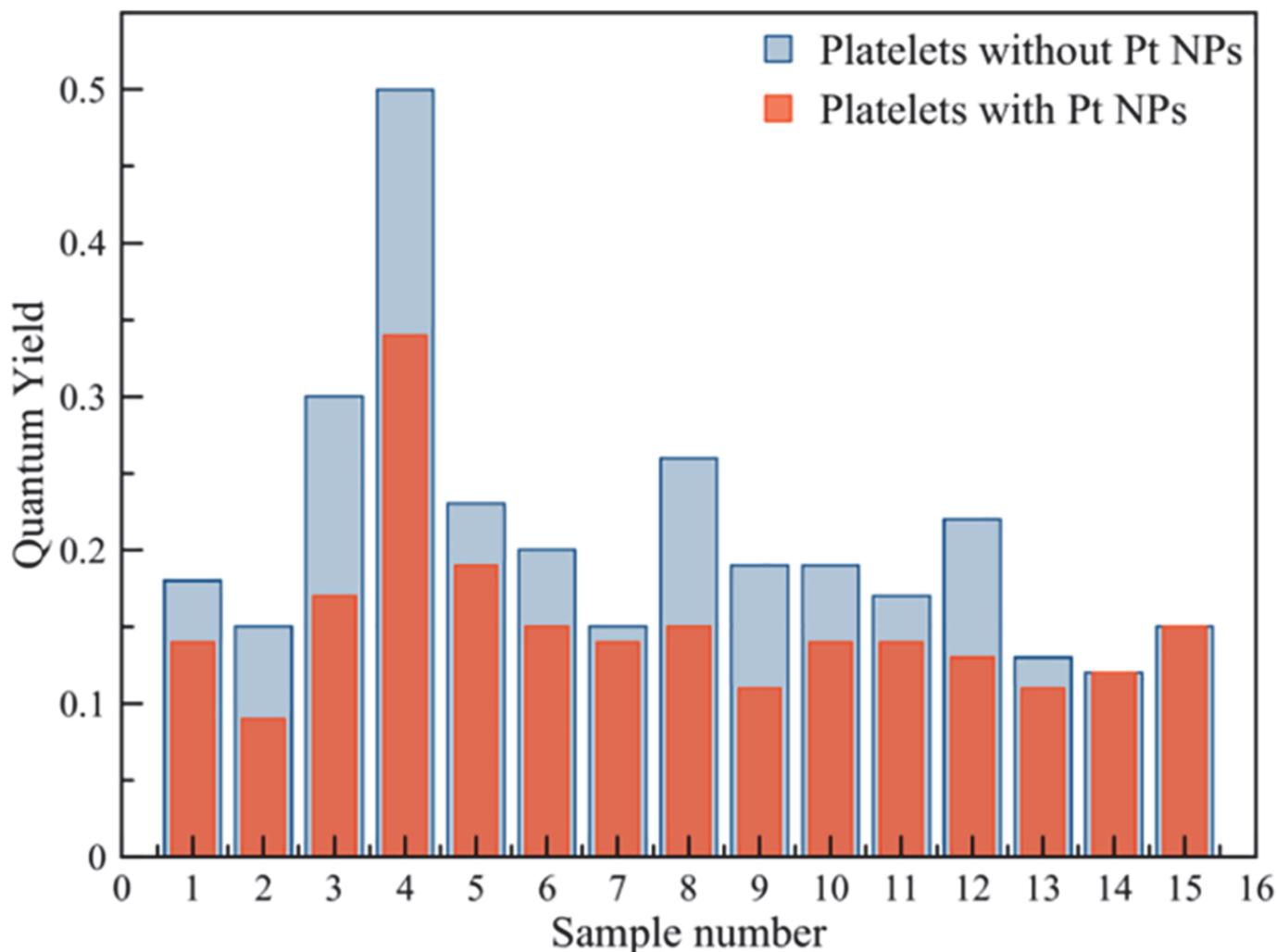


Рис. 69. Экспериментальные данные квантового выхода для образцов тромбоцитов без наночастиц Pt (синие столбцы) и с наночастицами Pt (красные столбцы).

При допировании тромбоцитарной массы НЧ Pt наблюдался меньший разброс интенсивности флуоресценции с соответствующими максимальными и минимальными значениями интенсивности в диапазоне  $1,78 \cdot 10^6$  и  $1,41 \cdot 10^6$ . Значения квантового выхода тромбоцитов существенно варьировали, достигая максимального значения 50% и минимального значения 12%. Достаточный разброс значений от образца к образцу, влекущий за собой снижение квантового выхода, может быть связан с переносом энергии между остатками Trp в растворе и на поверхности мембраны. [351]. Значения квантового выхода и тушение флуоресценции тромбоцитов снизились с максимальных 34% для образца PLT4 до минимальных 12% для образца PLT14 (Табл. 13).

Изменения времени жизни не показали существенных изменений как при допировании НЧ Pt, так и без них (Табл. 13). При наличии НЧ Pt время жизни достигло своего максимального значения 3,42 нс для образца PLT4 и минимального для PLT12 – 3,04 нс. В отсутствие НЧ Pt максимальное значение времени жизни (3,27 нс) наблюдалось для образца PLT11, а минимальное (3,04 нс) – для образца 4. Для образцов PLT1, PLT12, PLT13, PLT14 отмечено уменьшение времен жизни, а для остальных образцов произошло их увеличение. В ходе исследования была выдвинута

гипотеза о том, что изменения времени жизни отдельных аминокислот могут оказывать заметное влияние на общее время жизни флуоресценции. Это может быть связано с тем, что различные аминокислоты имеют разные фотофизические свойства и могут взаимодействовать друг с другом, создавая сложные динамические системы. Кроме того, авторы исследования предположили существование димеров [343] — молекул, состоящих из двух связанных аминокислот или их производных. Эти димеры могут значительно изменять фотофизические параметры системы, включая время жизни флуоресценции и интенсивность излучения. Появление димеров может быть связано с различными факторами, такими как концентрация аминокислот и условия окружающей среды, что делает их изучение важным для понимания молекулярных механизмов, происходящих в мембране тромбоцитов. Для расчетов энергетических характеристик комплексов была использована модель на основе FRET, с помощью которой выполнялось описание параметра переноса энергии из-за очевидного спектрального перекрытия между тромбоцитом и его аминокислотами (донор) и НЧ Pt (акцептор) (Рис. 69). Согласно теории FRET эффективность передачи энергии можно описать как [344]:

Таблица 13. Экспериментальные данные времени жизни флуоресценции тромбоцитов и квантового выхода [308].

Номер образца		Квантовый выход ( $\varphi$ )	Время жизни $\tau$ (нс)
PLT 1	*	$0.18 \pm 0.0085$	3.19
	**	$0.14 \pm 0.0103$	3.12
PLT 2	*	$0.15 \pm 0.0087$	3.18
	**	$0.09 \pm 0.0147$	3.19
PLT 3	*	$0.30 \pm 0.0063$	3.04
	**	$0.17 \pm 0.0111$	3.06
PLT 4	*	$0.50 \pm 0.0041$	3.21
	**	$0.34 \pm 0.0055$	3.42
PLT 5	*	$0.23 \pm 0.0097$	3.13
	**	$0.19 \pm 0.0081$	3.14
PLT 6	*	$0.20 \pm 0.0055$	3.17
	**	$0.15 \pm 0.0075$	3.27
PLT 7	*	$0.15 \pm 0.0093$	3.04
	**	$0.14 \pm 0.0099$	3.11
PLT 8	*	$0.26 \pm 0.0063$	3.11
	**	$0.15 \pm 0.0094$	3.14

PLT 9	*	$0.19 \pm 0.0063$	3.17
	**	$0.11 \pm 0.0125$	3.16
PLT 10	*	$0.19 \pm 0.0075$	3.11
	**	$0.14 \pm 0.0086$	3.28
PLT 11	*	$0.17 \pm 0.0068$	3.27
	**	$0.14 \pm 0.0088$	3.26
PLT 12	*	$0.22 \pm 0.0056$	3.11
	**	$0.13 \pm 0.0082$	3.04
PLT 13	*	$0.13 \pm 0.0089$	3.11
	**	$0.11 \pm 0.0101$	3.10
PLT 14	*	$0.12 \pm 0.0097$	3.22
	**	$0.12 \pm 0.0087$	3.18
PLT 15	*	$0.15 \pm 0.0076$	3.15
	**	$0.15 \pm 0.0064$	3.23

\*-С НЧ

\*\*-без НЧs

Эффективность переноса рассчитывалась по формуле:

$$E = 1 - \frac{I_{fl}}{I_{fl0}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (13)$$

где  $I_{fl}$  и  $I_{fl0}$  — интенсивность флуоресценции в присутствии и в отсутствие НЧ соответственно,  $r$  — расстояние между акцептором и донором,  $R_0$  — радиус Фёрстера, при котором эффективность составляет 50 %,  $D_A$  — время жизни донора в присутствии акцептора,  $D$  — время жизни донора в отсутствие акцептора.  $R_0$  можно рассчитать по формуле:

$$R_0 = 0.2108 \left\{ \frac{k^2 \varphi}{n^4} \int_0^\infty I_D(\lambda) \xi_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right\}^{\frac{1}{6}} \quad (14)$$

где  $k^2$  — коэффициент ориентации, для жидких сред равный 1/3,  $n$  — показатель преломления среды,  $\varphi$  — квантовый выход флуоресценции донора (D),  $I_D(\lambda)$  — интенсивность флуоресценции донора на длине волны  $\lambda$ ,  $\varepsilon_a(\lambda)$  — молярный коэффициент поглощения акцептора (A).

Скорость FRET рассчитывали по соотношению:

$$k_{dd} = \frac{1}{t_d} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (15)$$

Расстояние  $r$  между донором и акцептором рассчитывали по формуле:

$$r = R_0 \left( \frac{1}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} \quad (16)$$

Данные, полученные в результате расчетов, приведены в Табл. 14.

Таблица 14. Расчетные параметры FRET [308].

Номер образца	Интеграл перекрытия $(J)$ , $10^{17}$ нм <sup>4</sup> /(М·см)	Радиус Ферстера $R_0$ (А)	Расстояние НЧ-тромбоцит $r$ , А	$K_{dd}$ , $10^8$ с <sup>-1</sup>	Эффективность переноса $E$
PLT 1	5.17	38.8	65.5	1.67	0.02
PLT 2	5.17	38.8	77.1	1.06	0.01
PLT 3	5.16	38.7	66.2	1.91	0.04
PLT 4	5.17	38.8	58,6	1.68	0.06
PLT 5	5.16	38.7	77.1	0.69	0.01
PLT 6	5.17	38.8	77.1	2.19	0.03
PLT 7	5.16	38.7	65.1	2.00	0.02
PLT 8	5.16	38.7	69.3	0.61	0.01
PLT 9	5.20	39.0	77.1	0.84	0.01
PLT 10	5.17	38.8	77.9	3.72	0.05
PLT 11	5.14	38.5	77.6	0.94	0.01
PLT 12	5.15	38.6	60.1	1.37	0.02
PLT 13	5.14	38.5	76.7	1.23	0.01
PLT 14	5.14	38.5	69.2	1.33	0.01
PLT 15	5.15	38.6	76.7	2.92	0.03

По результатам расчетов установлено, что  $R_0$  не претерпевает существенных изменений и составляет 38 нм, тогда как расстояние между НЧ Pt и тромбоцитом колеблется в диапазоне 65 - 78 нм. Несмотря на то, что эффективность переноса была достаточно низкой (1-6%), скорость диполь-дипольного переноса была достаточно высокой, достигая для образца PLT3  $1,91 \cdot 10^8$  с<sup>-1</sup>. Высокая скорость передачи энергии может быть объяснена небольшим расстоянием между тромбоцитами и НЧ. Этот результат [308] коррелирует с механизмами передачи энергии и их объяснениями, описанными в [345,346]. Для расчета энергетических параметров применялась модель резонансного переноса энергии Ферстера. Выявлена возможность переноса энергии между НЧ Pt и белками тромбоцитов по механизму Ферстера. Сенсоры на основе НЧ Pt могут быть использованы для исследования мембран тромбоцитов и их рецепторов при контроле антитромбоцитарной медикаментозной терапии, процессов тромбообразования или других сердечно-сосудистых осложнений. Следует отметить, что другие аминокислоты, такие как His, также могут быть перспективными кандидатами для будущих флуоресцентных исследований с использованием длин волн возбуждения  $\lambda=200-250$  нм [347].

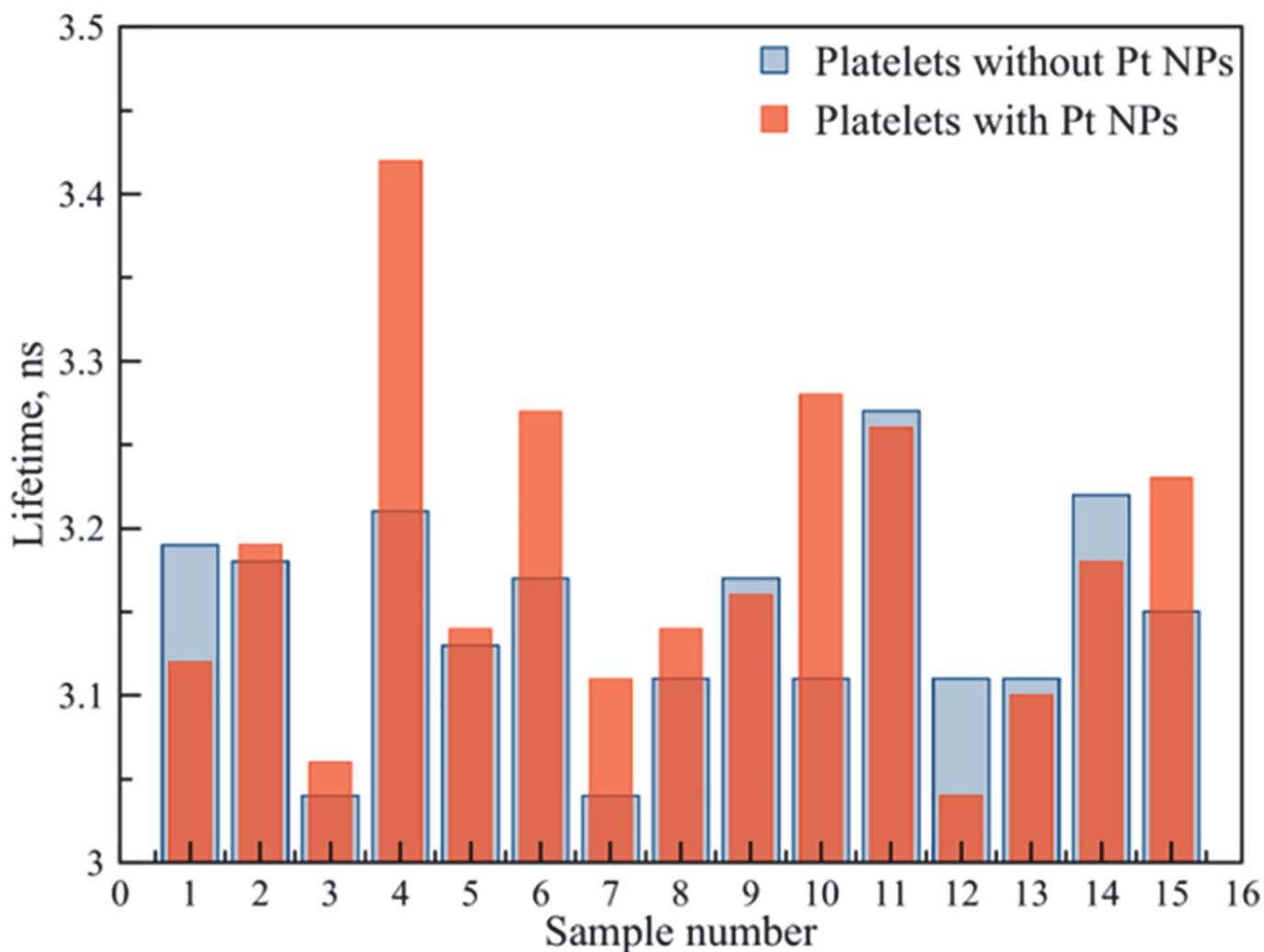


Рис. 70. Экспериментальные данные времени жизни флуоресценции для образцов тромбоцитов без НЧ Pt (синие столбцы) и с НЧ Pt (красные столбцы) [305].

Таким образом, была исследована динамика флуоресценции, квантового выхода и времени жизни аминокислот тромбоцитов в присутствии и без фемтосекундной абляции НЧ платины. Проведен флуоресцентно-спектроскопический анализ основных флуоресцентных аминокислот и их остатков (тирозина (Tyr), триптофана (Trp) и фенилаланина (Phe)), принадлежащих мембране тромбоцитов. Выявлена возможность переноса энергии между НЧ Pt и мембраной тромбоцитов. Модель FRET использовалась для количественной оценки параметров переноса энергии. Показана перспективность использования наночастиц Pt в сенсорике на основе эффекта тушения для патологий, основанных на конформации рецепторов тромбоцитов, таких как сердечно-сосудистые заболевания. Полученные результаты могут быть использованы для биофизических сенсоров на основе FRET, работающих в УФ-диапазоне. Полученные результаты опубликованы в статье [308].

### 3.4. Применение методов машинного обучения для анализа спектральных выборок и выявления биомаркеров различий

Отдельной задачей диссертации являлось разработка алгоритмов классификации полученных спектров и выделение конкретных колебательных мод, различающих выборки. Для этого для анализа массивов спектров и выделения различающих их спектральных биомаркеров были разработаны алгоритмы на базе машинного обучения и нейронных сетей. Одним из методов, используемых для классификации выборок, был применен метод  $k$ -ближайших соседей. Для этого были использованы библиотеки *Python* такие как *KNeighborsClassifier* из модуля *sklearn.neighbors*, используемых для создания модели KNN, а также модуль *metrics* для оценки результатов классификации. Для реализации метода был создан объект модели *KNeighborsClassifier* и установлен параметр *n\_neighbors* равный 5, что означало, что модель будет использовать 5 ближайших соседей для классификации нового параметра. Число 5 было выбрано путем эмпирических наблюдений. Поэтому значение *n\_neighbors* должно быть положительным целым числом и преимущественно выбираются значения от 1 до 10, но это также может варьироваться в зависимости от размера и характеристик набора данных.

Использование нескольких ближайших соседей позволило снизить влияние выбросов и ошибочных данных на процесс классификации. В случаях, когда отдельные точки данных содержали шум или неточности, учет более чем одного соседа способствовал сглаживанию их влияния и повышению качества классификации. Выбор слишком малого числа соседей приводил к высокому смещению и недообучению модели, тогда как избыточное количество соседей вызывало высокую дисперсию и переобучение. Оптимальным компромиссом между смещением и дисперсией оказалось использование пяти ближайших соседей.

Метод *fit()* вызывался на объекте модели *KNNModel*, принимая в качестве аргументов обучающие данные *X\_train* и соответствующие им метки классов *y\_train*. Модель использовала эти данные для обучения и настройки внутренних параметров, необходимых для предсказания меток классов на новых данных. Метод *predict()* использовался на обученной модели *KNN\_Model*, принимая в качестве аргументов тестовые данные *X\_test*. Для предсказания меток классов были использованы обучающие выборки на этих данных, результаты мы сохранили в переменной *y\_pred*. Функция *classification\_report()* из модуля *metrics* использовалась для генерации отчета о классификации. Она приняла в качестве аргументов истинные метки классов *y\_test* и предсказанные метки классов *y\_pred*. Отчет содержит различные метрики, такие как точность (*precision*), полноту (*recall*), F-меру (*F1-score*) для каждого класса, а также средние значения по всем классам. Алгоритм включал в себя следующие параметры: *weights* определяет веса, которые были присвоены каждому соседу при классификации, *algorithm* определяет алгоритм, используемый для вычисления ближайших соседей, *metric* определяет метрику расстояния, используемую для измерения расстояния между точками данных. После запуска алгоритма мы получили результаты, которые мы можем наблюдать в Таблице 15.

Таблица 15. Результаты применения метода ближайших  $k$ -соседей.

	Precision,%	Recall,%	F1-score,%	support
0	56	59	57	156
1	75	72	73	262
Accuracy			67	418
Macro avg	65	66	65	418
Weighted avg	68	67	67	418

В Таблице 15 обозначено 2 параметра для двух групп пациентов (здоровых и больных). *Precision* (точность) для класса 0 составлял 0.56, что означало, что 56% объектов, отнесенных к классу 0, являются принадлежащими этому классу. Для класса 1 точность составляла 0.75, что означает, что 75% объектов, отнесенных к классу 1, действительно принадлежат этому классу. Высокая точность указывала на то, что модель давала относительно небольшое количество ложных положительных результатов. *Recall* (полнота) означала, что модель правильно идентифицировала 59% объектов класса 0 и 72% объектов класса 1 из общего числа объектов этого класса. Высокая полнота указывала на то, что модель эффективно обнаруживала большую долю объектов каждого класса. Оценивался параметр *F1-score*, отражающий насколько одновременно хорошо модель находит объекты одной группы из всех объектов данной группы и какая доля из тех, кого алгоритм классифицировал в эту группу, действительно принадлежит данной группе. В этом случае параметр *F1-score* являлся гармоническим средним между точностью и полнотой. Для нулевого класса *F1-мера* составляла 57%, а для первого 73%. *Accuracy* определяла общую точность модели, она составляла 0.67, что означало, что модель правильно классифицировала 67% общего числа объектов. Оценки *macro average* и *weighted average* – являлись средним значением метрик по всем классам без учета их дисбаланса и дисбаланс классов путем усреднения с весами, пропорциональными количеству объектов в каждом классе.

В отчёте о классификации столбец *support* показывает количество данных в каждом классе: для класса 0 — 156 объектов, для класса 1 — 262.

Следующим алгоритмом, примененным для анализа спектральных выборок было дерево решений. Для этого был использован классификатор *DecisionTreeClassifier*, встроенный в модуль *scikit-learn*. Путем варьирования различных параметров, таких как *max\_depth* (максимальная глубина дерева), *criterion* (мера качества разделения) и других, и для того, чтобы оптимизировать производительность модели, применялся метод *fit*, который принял на вход обучающие данные ( $X_{train}$ ) и соответствующие метки классов ( $y_{train}$ ). Результат работы модели представлен ниже на Рис.80.

Таблица 16. Отчет по результатам применения метода дерева решений.

Parameter	Precision,%	Recall,%	F1-score,%	Support
0	51	56	54	156
1	72	69	70	262
Accuracy			64	418
Macro average	62	62	62	418
Weighted average	65	64	64	418

По результатам анализа точность для классов составляла 0.51, что ниже, чем в предыдущей модели  $k$ -ближайших соседей (56%). Для класса 1 точность составляла 75%, что выше, чем в предыдущей модели (72%). Таким образом, модель дерева решений более точно предсказывает класс 1, но менее точно справляется с классом 0. Для класса 0 полнота составляет 56%, что выше, чем в предыдущей модели. Полнота для класса 1 составляет 69%, что ниже, чем в предыдущей модели (72%). Это означает, что модель дерева решений лучше обнаруживает объекты класса 0, но менее эффективно обнаруживает объекты класса 1.  $F1$ -мера для класса 0 составляет 54%, а для класса 1 составляет 70%, оба результата немного хуже, чем в предыдущей модели. Это указывает на снижение сбалансированности модели дерева решений по сравнению с моделью  $k$ -ближайших соседей.  $Macro\ avg\ precision, recall$  и составляют примерно 62%, как и в предыдущей модели  $k$ -ближайших соседей.  $Weighted\ avg\ precision$  также составляют примерно 64%, что ниже, чем в предыдущей модели (67%).

Из отчета классификации видно, что значения точности и полноты для группы здоровых пациентов значительно ниже значений больной группы, что означает, что наблюдения с большей вероятностью будут определяться как больные, и процент верно определенных здоровых наблюдений составит 51%, а для группы больных – 72%. Гармоническое среднее значение точности и полноты составило 64%. Исходя из сравнения результатов, можно сделать вывод, что модель дерева решений дает немного худшие результаты по сравнению с моделью  $k$ -ближайших соседей в данном случае. Деревья решений обладают несколькими преимуществами, такими как хорошая интерпретируемость, способность работать с числовыми и категориальными признаками, а также автоматический отбор признаков. Однако они также могут быть склонны к переобучению, особенно если дерево имеет большую глубину и неограниченные разделения.

После проведенного анализа строился график важности признаков, которыми в данной работе являлись спектральные сдвиги. С помощью функции `importance = dtc.feature_importances_` был получен вес каждого признака из модели дерева решений. Функция `feature_importances_` возвратила массив значений, где каждое значение соответствует важности соответствующего признака. Далее создали новую фигуру с определенным размером: `plt.figure(figsize=(18, 8))`. В данном случае, была установлена ширину 18 и высота 8 дюймов. Далее применяли `plt.bar([x for x in range (400, 1805, 5)], importance)`, чтобы построить столбчатую диаграмму (гистограмму) с

использованием функции `bar` из библиотеки `matplotlib.pyplot`. Мы указываем на оси x значения от 400 до 1800 с шагом 5 (что создает равномерное распределение), а на оси y передаем значения важности признаков.

Таким образом, программа строила по нашему запросу гистограмму, где по оси x отображаются индексы признаков, а по оси y - их важность (*p*-критерий). Это позволяет наглядно визуализировать значимость каждого признака в модели дерева решений на Рис.71.

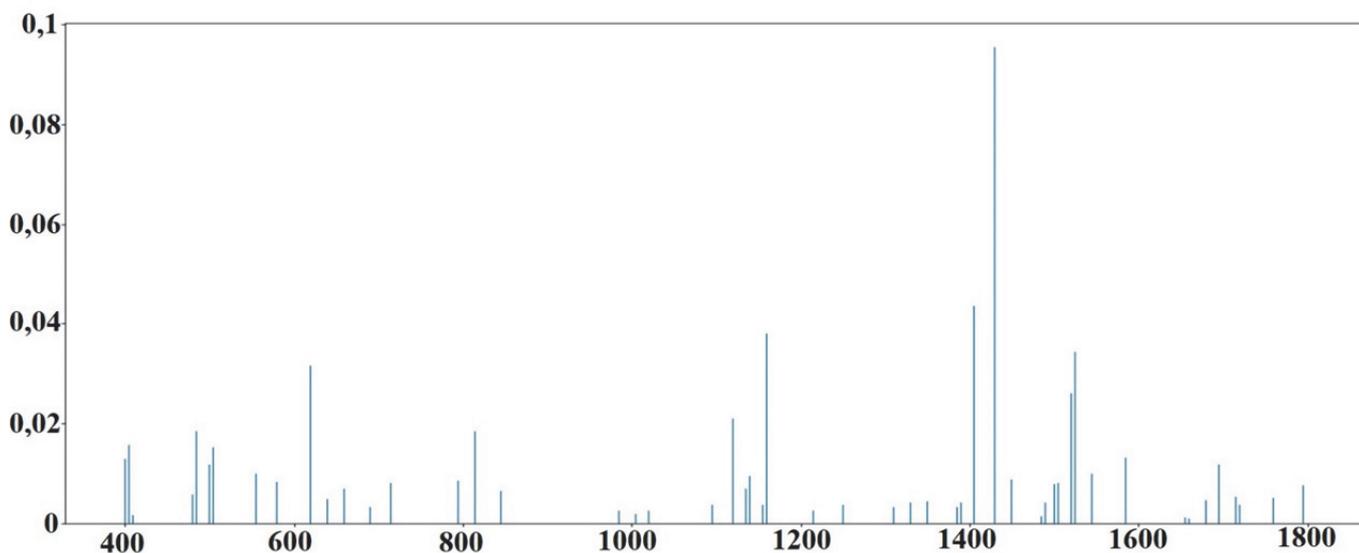


Рис. 71 График важности признаков для классификации здоровых и больных пациентов с помощью алгоритма дерева решений. На этом графике мы выявили несколько сдвигов с наиболее высокой значимостью. Данные отражены в таблице 17.

Таблица 17. наиболее важные при сравнении групп спектральные сдвиги и их спектральная идентификация интерпретация ( $p < 0,05$ ).

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Важность признака, %	Интерпретация
1405	4.3	-
1160	3.8	Валентные колебания ( $\nu$ ) С-С в белках
1525	3.4	NH <sub>3</sub> симметричные колебания в белках

Данные были классифицированы по группам пациентов с использованием алгоритма случайного леса. Была рассмотрена дифференциация спектров по группам здоровых пациентов без терапии (1-я группа) и больных с сердечно-сосудистой патологией без терапии (3-я группа). На рис. 72 показано одно из деревьев решений, разработанное для классификации спектров здоровых пациентов без терапии и пациентов с патологиями ССЗ.

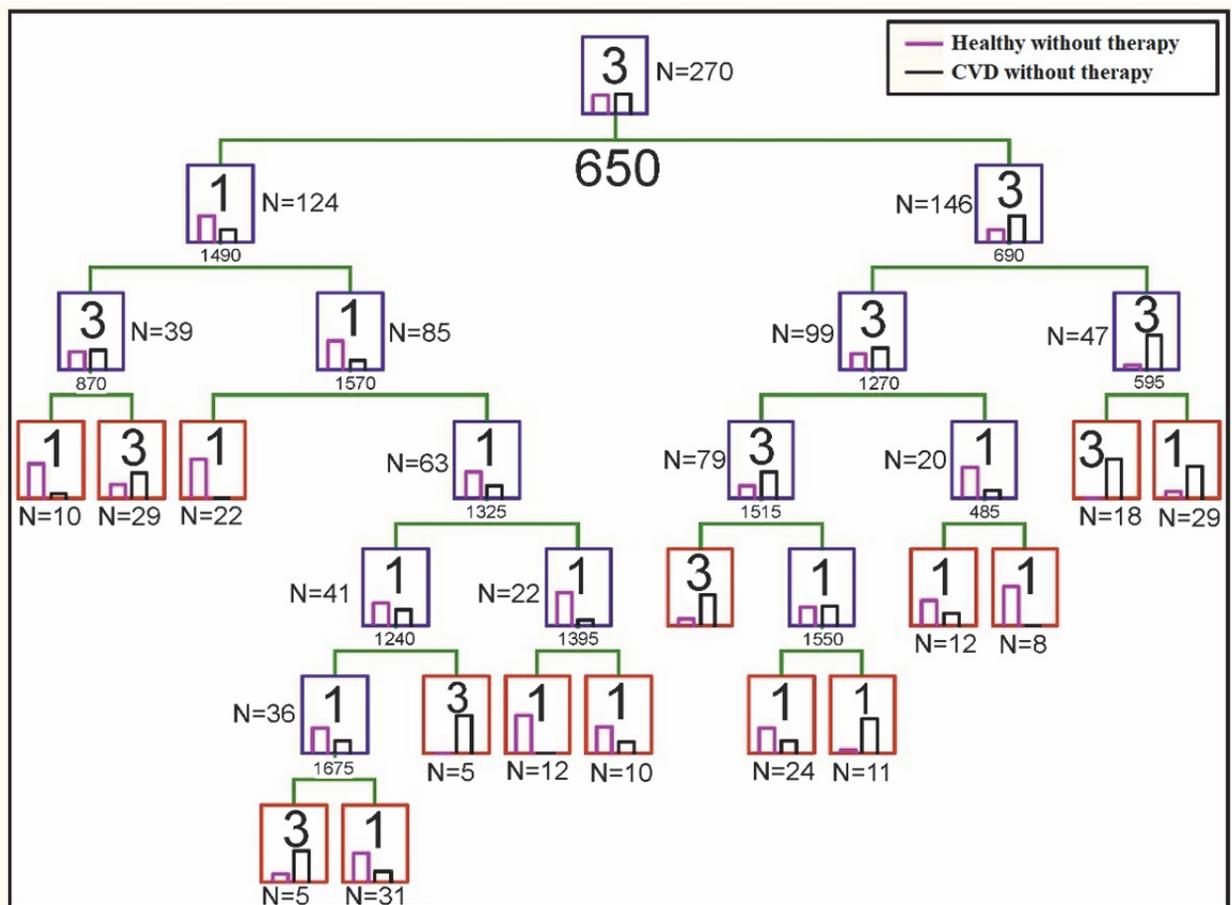


Рис. 72. Дерево решений при классификации спектров по группам здоровых пациентов без терапии (1-я группа) и больных с сердечно-сосудистыми патологиями без терапии (3-я группа) [401].

Большинство данных были правильно идентифицированы с помощью алгоритма случайного леса. Корректность алгоритма классификации наблюдений на группы здоровых пациентов без терапии и больных с сердечно-сосудистой патологией без терапии составила 83,4%, что показано и продемонстрировано в Таблице 18 [401].

Таблица 18. Матрица классификации для разделения здоровых от пациентов с ССЗ без лечения.

	Прогнозируемые здоровые без терапии	Прогнозируемые сердечно-сосудистые заболевания без терапии
Истинно здоровые без терапии	37.5%	10.07%
Истинно ССЗ без терапии	6.53%	45.9%

Количество правильно классифицированных спектральных данных по группам пациентов выделено зеленым цветом. Количество ошибочно классифицированных спектральных данных выделено красным цветом. При проведении этой классификации были выделены наиболее значительные спектральные сдвиги при разделении наблюдений на группы, представленные в Таблице 19. Интерпретация максимумов в таблицах 19, 20, 21 проведена в соответствии с [248].

Таблица 19. Наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретация для классификации здоровых пациентов от больных ССЗ без терапии.

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Важность признака, %	Интерпретация
1485	0.7	1485 плоскостные колебания (аденин/гуанин)
1155	0.6	С-С валентные колебания в белках
1395	0.7	Группа Амид

Кроме того, алгоритм случайного леса использовался для классификации здоровых пациентов, получающих и не получающих терапию, с точностью 76,26%, как видно из Таблицы 19.

Таблица 20. Матрица классификации для отделения здоровых пациентов без терапии от здоровых пациентов, получающих терапию.

	Прогнозируемо здоровые без терапии	Прогнозируемо здоровые на терапии
Истинно здоровые без терапии	69.38%	11.88%
Истинные здоровые на терапии	11.88%	6.88%

Были выделены наиболее значимые спектральные сдвиги и их интерпретация для классификации здоровых пациентов без и на терапии, показанные в Таблице 21 [401].

Таблица 21. Наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретация для классификации здоровых пациентов без терапии и на фоне терапии [401]

Спектральный сдвиг см <sup>-1</sup>	Значимость признака, %	Интерпретация
1040	0,7	Ненасыщенные жирные кислоты
1035	0,7	β(CH) в липидах
1685	0,6	Белковый бета-лист и полипролиновая спираль
980	0,6	β(CH) в липидах
1165	0,5	ν(C-C) в липидах
1305	0,5	τ(CH <sub>2</sub> ), δ(=CH) в липидах

При классификации пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями на терапии и без терапии была достигнута точность 70%, как показано в таблице 22.

Таблица 22. Классификационная матрица для разделения пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, не получавших лечения, от пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, ранее не получавших лечения.

	Прогнозируемые сердечно-сосудистые заболевания без терапии	Прогнозируемые сердечно-сосудистые заболевания на терапии
Истинный ССЗ без терапии	59.5%	3.0%
Истинный ССЗ на терапии	27.0%	10.5%

Таблица 23 выделяет наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретацию для классификации пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями без терапии и на фоне терапии.

Таблица 24. Наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретация для классификации больных ССЗ без лечения и на фоне терапии.

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Значимость признака, %	Интерпретация
1565	0,7	Валентные колебания C-N
1425	0,6	Полоса 1420 см <sup>-1</sup> , наблюдаемая для насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, практически не видна в спектрах ненасыщенных соединений
1055	0,6	Липидная углеводородная цепь
1440	0,6	CH <sub>2</sub> плоскостные колебания (Липиды)
1385	0,6	Водородная связь в белке
1125	0,6	V(C <sub>B</sub> -methyl)

Завершающим алгоритмом дифференциации спектральных данных, примененным в данной работе стала модель логистической регрессии, которая использует логистическую функцию (также известную как сигмоидная функция) для преобразования линейной комбинации признаков в вероятность отнесения объекта к классу.

В итоге, была создана и обучена модель логистической регрессии с помощью функций `model_logreg = LogisticRegression()` и `fit(X_train, y_train)`, анализирующая зависимости между признаками и целевой переменной. Было выполнено прогнозирование на тестовом наборе: `y_pred = model_logreg.predict(X_test)`, которое использовало обученную модель для прогнозирования целевой переменной на тестовом наборе данных (`X_test`). Результаты прогнозирования сохранялись в переменной `y_pred`. Для оценки качества брали `classification_report(y_test, y_pred)` из модуля `sklearn.metrics`, таким образом, сгенерировали полный отчет о метриках качества модели на тестовом наборе данных. В отчете были отражены значения `precision`, `recall`, `f1-score` и `support` для каждого класса, а также усредненные значения для всех классов. В результате такие метрики позволили оценить эффективность модели логистической регрессии в классификации данных и сравнить с ранее построенными моделями.

Таблица 25. Отчет по модели метода логистической регрессии

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение «F1-Score»,%	Значение «Support»
0	51	56	54	156
1	72	69	70	262
Accuracy			64	418
Macro average	62	62	62	418
Weighted average	65	64	64	418

Анализируя результаты отчета о классификации для модели логистической регрессии, было установлено, что для класса 0 точность составляла 0.67, что означало, что 67% объектов, отнесенных к классу 0, действительно являются объектами этого класса. Для класса 1 точность составляет 0.82, что означает, что 82% объектов, отнесенных к классу 1, действительно принадлежат к этому классу. Высокие значения точности указывали на хорошую способность модели правильно классифицировать объекты. Для класса 0 полнота составляла 0.71, что означало, что 71% объектов класса 0 было правильно определено, а для класса 1 полнота составляла 0.79, что означало, что 79% объектов класса 1 были верно определены моделью. Полнота оценивала способность модели правильно обнаруживать объекты данного класса. Для класса 0 значение F1-меры составляло 0.69, а для класса 1 - 0.81. F1-мера является средневзвешенной метрикой, которая учитывала и точность, и полноту. Значения F1-меры было близко к 1, что указывало на хорошее сбалансированное сочетание точности и полноты для обоих классов. Общая точность модели составляла 0.76, что означало, что модель правильно классифицировала 76% объектов из тестового набора данных. Высокое значение точности говорит о хорошей способности модели обобщать и делать правильные прогнозы на новых данных. Средние значения для макро-усреднения и взвешенного усреднения метрик также указывают на

хорошую способность модели классифицировать объекты для обоих классов. В целом, результаты оценки модели логистической регрессии показывали неплохую производительность с высокими значениями точности, полноты и F1-меры для обоих классов.

Затем, вычислялась значимость признаков. График значимости признаков представлял собой столбчатую диаграмму, где каждый столбец соответствовал определенному значению спектрального сдвига. Высота столбца отражала значимость соответствующего признака, то есть более высокие столбцы указывали на признаки, которые имели большее влияние на модель логистической регрессии при принятии решений о классификации объектов.

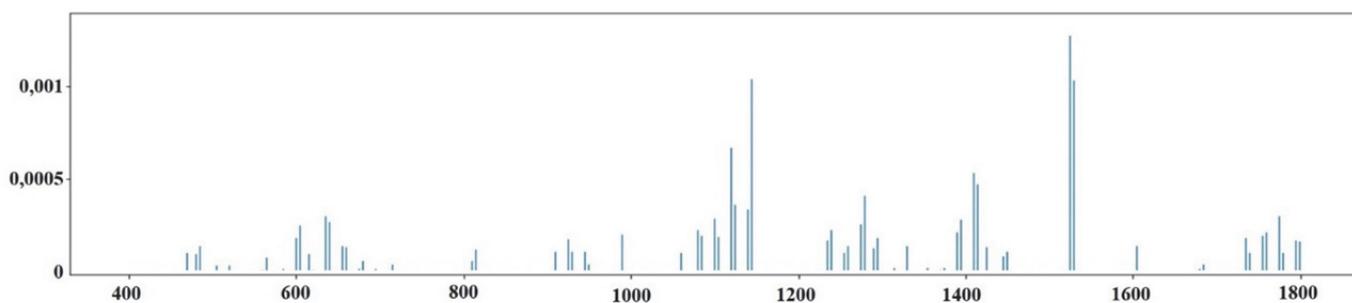


Рис. 73. График важности признаков для классификации здоровых и больных пациентов с помощью алгоритма логистической регрессии.

Анализируя график, было определено, какие значения спектрального сдвига являются наиболее информативными и вносят наибольший вклад в процесс классификации. Как мы видим, спектральный сдвиг  $1525 \text{ см}^{-1}$  имел наибольшую важность среди всех признаков, со значимостью 0,01%. Это может указывать на то, что этот спектральный сдвиг содержит информацию, которая сильно влияет на различия между группами. Наиболее важные при сравнении групп спектральные сдвиги и их интерпретация выделены в таблице 26.

Таблица 26. Сдвиги и их важность алгоритма логистической регрессии

Спектральный сдвиг, $\text{см}^{-1}$	Важность признака	Интерпретация
1525	0.001272	-
1145	0.001034	Ассимметричные колебания скелета белка
1530	0.001032	-

Выделяя самые важные признаки из графика, мы можем сделать вывод, что спектральные сдвиги в окрестности  $1525 \text{ см}^{-1}$ ,  $1145 \text{ см}^{-1}$  и  $1530 \text{ см}^{-1}$  играют важную роль в классификации и разделении групп спектров, их значение и направление влияния на результаты классификации могут быть использованы для интерпретации данных и принятия решений.

Заключительным шагом, было проведено сравнение используемых алгоритмов и построенных моделей, в котором мы провели сравнение применяемых алгоритмов машинного

обучения с помощью матриц неточностей, (рис. 74). инструмента, используемого в машинном обучении для оценки производительности классификационных моделей. Она представляла собой таблицу, которая позволяла анализировать качество классификации объектов моделью. В каждой ячейке матрицы указывалось количество объектов, которые были правильно или неправильно классифицированы моделью. Матрица содержала следующие понятия: True Negative (TN) - корректно предсказанные отрицательные, False Positive (FP) - ошибочно предсказанные положительные, False Negative (FN) - ошибочно предсказанные отрицательные и True Positive (TP) - корректно предсказанные положительные.

Матрица помогала выявить типы ошибок, которые совершала модель. Например, она позволяла определить, сколько объектов было ложно классифицировано как положительные или отрицательные, что является полезной информацией для дальнейшего улучшения модели.

Матрица ошибок создавалась с помощью функции `confusion_matrix` из библиотеки `scikit-learn`.

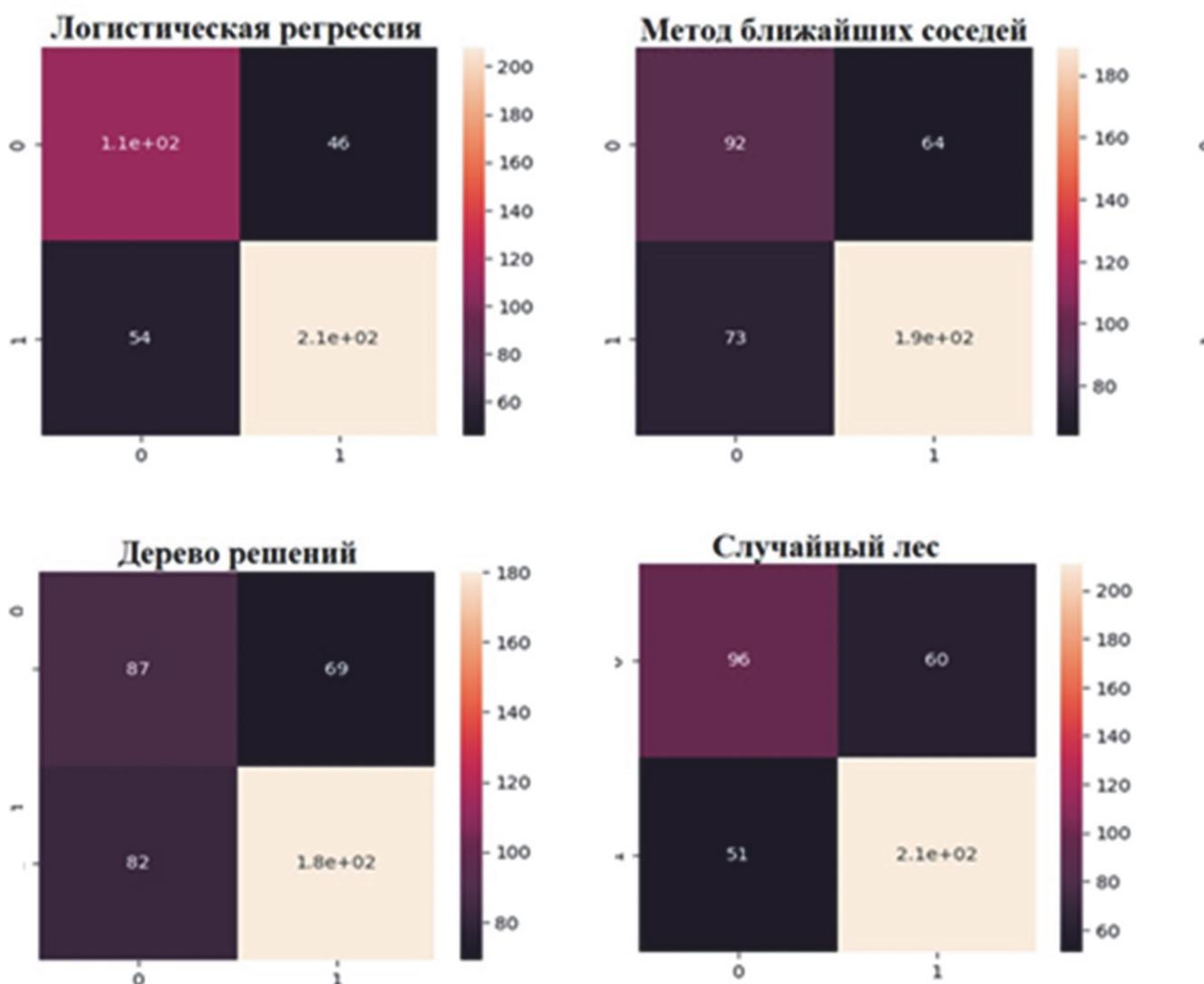


Рис. 74. Матрицы ошибок

Таблица 27. Результаты сравнения методик

Метод	Тренировочный результат, %	Тестовый результат, %
Логистическая регрессия	75	76
Метод ближайших соседей	78	67
Случайный лес	100	73
Дерево решений	100	63

Из полученных матриц видно, что наилучшие результаты точности определения наблюдений в верные группы показывает алгоритм логистической регрессии. Далее выводилось несколько первых строк (по умолчанию пять) из набора данных.

Таблица 28. Отчет классификации для здоровых пациентов без терапии и с терапией

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Истинное значение	Регрессия	Метод ближайших соседей	Случайный лес	Дерево решений
1209	1	1	1	1	1
749	1	0	1	1	1
127	0	1	1	0	0
742	1	1	1	1	0
700	1	1	1	1	1

Анализ таких результатов позволил понять, какие модели давали согласованные предсказания с истинными значениями, а какие модели имели различные ошибки классификации. Это позволяет оценить производительность моделей и принять решение о выборе наиболее подходящей модели для дальнейшего использования. Из графика видно, что наиболее схожие результаты для тестовых и тренировочных данных имеет алгоритм логистической регрессии. Поэтому для классификации следующих групп пациентов был выбран именно он. Было проведено еще одно сравнение алгоритмов для выявления наиболее точного метода, используя различные метрики оценки качества моделей на тренировочном и тестовом наборах данных. Для построения нового графика была вычислена оценка точности (ассигасу) для каждой модели на тренировочном и тестовом наборах данных с помощью метода `score`. Затем был выбран объект `DataFrame scores`, в котором сохранялись результаты тренировочной и тестовой точности для каждой модели. Колонки “Тренировочный” результат и “Тестовый результат” содержали соответствующие значения точности для каждой модели. Индексы *Logistic Regression*, *KNN*, *RandomForest* и *DecisionTree* указывали на используемые модели. Далее, была построена столбчатая диаграмма (`bar plot`), используя метод `plot.bar()`, где отображались значения тренировочной и тестовой точности для каждой модели. Заголовок диаграммы устанавливался с помощью функции `plt.title()`,

где указывалось значение "Тренировочные и тестовые результаты". Наконец, с помощью *plt.show()* отобразили график. Этот график позволяет наглядно сравнить результаты тренировочной и тестовой точности для каждой модели и оценить их производительность на основе выбранных метрик.

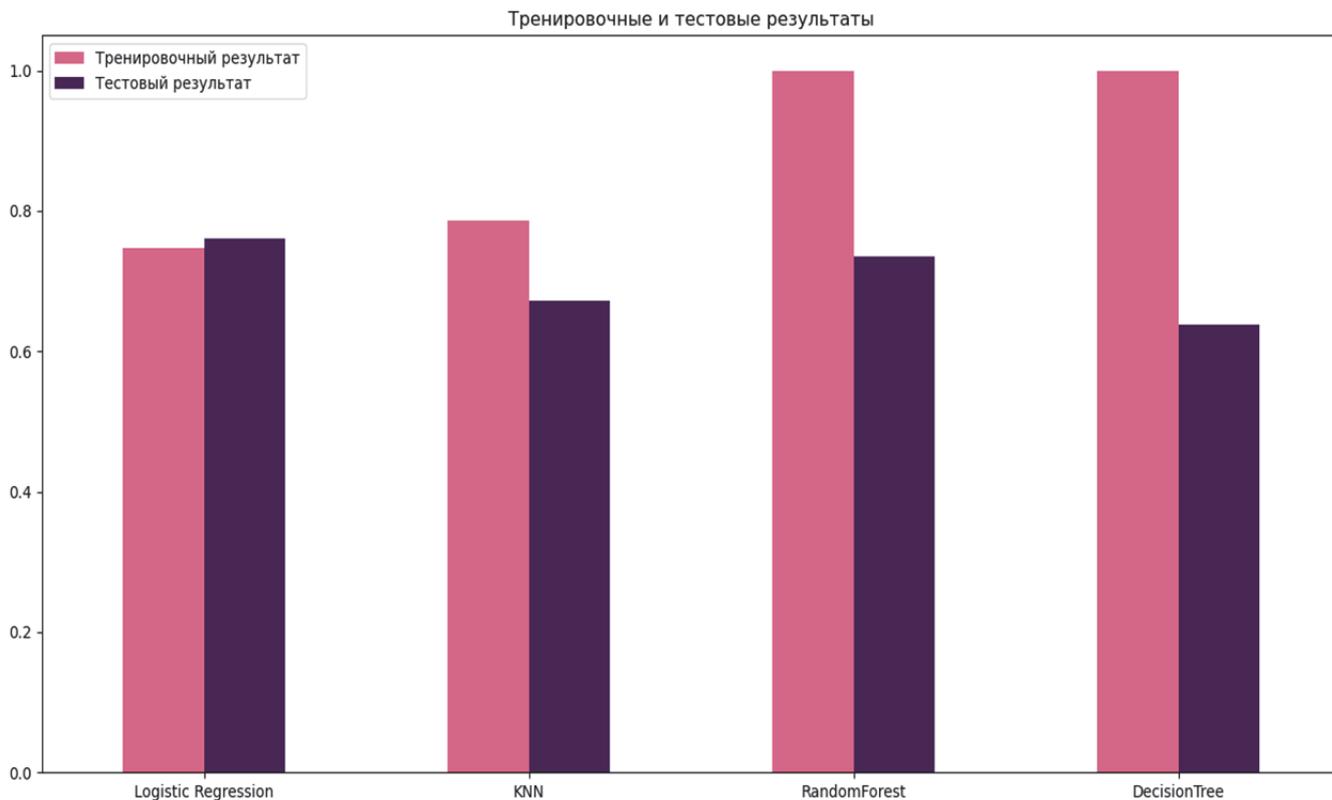


Рис. 75. Графики сравнения алгоритмов машинного обучения

Также мы вывели несколько первых строк из сравнительного анализа и получили следующую таблицу, представленную ниже

Таблица 29. Отчет классификации для здоровых пациентов без терапии и с терапией

Метод	Тренировочный результат,%	Тестовый результат,%
Логистическая регрессия	75	76
Метод ближайших соседей	78	67
Случайный лес	100	73
Дерево решений	100	63

В целом, модель Logistic Regression показала наилучшие результаты с более высокой точностью, как на тренировочном, так и на тестовом наборе данных, по сравнению с другими моделями. KNN показала высокую точность на тренировочных данных, но ее точность на тестовых данных ниже. Это может свидетельствовать о переобучении модели или ее ограниченной способности обобщать данные. Другие модели, такие как KNN, RandomForest и DecisionTree, могут быть полезными в определенных сценариях, но они могут требовать

дополнительной настройки и учета особенностей данных для достижения лучших результатов. Важно также учитывать, что точность моделей не является единственной метрикой для оценки их производительности. Для полной оценки моделей мы рассматривали и другие метрики, такие как полнота, точность, F1-мера и т. д., а также провели анализ ошибок и проверить их интерпретируемость и практическую применимость в конкретной задаче.

Так как логистическая регрессия показала наилучшие результаты, мы использовали для дальнейшей классификации именно эту модель.

### 3.5. Углубленное классифицирование для анализа спектральных выборок и выявления биомаркеров различий

#### 3.5.1. Вторичная классификация здоровых пациентов

После построения нескольких моделей и определения наиболее работоспособной из них, была проведена более точная дифференциация 5 следующих категорий:

1. Здоровые без терапии (ЗБТ)
2. Здоровые с терапией (ЗСТ)
3. После инфаркта (ПИ)
4. Больные без терапии (ББТ)
5. Больные с терапией (БСТ)

Первым шагом являлось построение модели для здоровых пациентов. Был создан экземпляр модели логистической регрессии с помощью конструктора `LogisticRegression()` из библиотеки `sklearn.linear_model`. Эта модель использовалась для нашей задачи классификации данных. Используя метод `predict_proba()`, были получены вероятности принадлежности к классам для тестового набора данных. Далее был установлен порог (в данном случае 0.25) для определения класса и преобразования вероятности в соответствующие метки классов с помощью метода `astype(int)`. Далее, используя метки классов и истинные значения `y_test`, мы сгенерировали отчет о классификации с помощью функции `classification_report()` из библиотеки `sklearn.metrics`. Этот отчет содержит различные метрики оценки производительности модели для здоровых пациентов.

Таблица 30. Отчет классификации для здоровых пациентов без терапии и с терапией

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение «F1- score»,%	Значение «Support»,%
0	89	73	81	127
1	48	48	58	42
Accuracy			73	169
Macro average	69	69	69	169
Weighted average	79	79	75	169

Здесь группа 0 - это здоровые пациенты без терапии, а группа 1 - с терапией. Точность (accuracy) была равна 0.73, что означает, что модель правильно классифицировала 73% объектов в тестовом наборе данных. Видно, что точность определения группы здоровых пациентов без терапии достаточно высокая, но так как значение полноты больше у группы здоровых пациентов с терапией, то алгоритм вероятнее будет определять наблюдения в группу здоровых с терапией. При этом вероятность определения верно классифицированных наблюдений здоровой группы без терапии составила 91%, а вероятность определения верно классифицированных наблюдений здоровой группы с терапией - 50%. Для оценки алгоритма используем гармоническое среднее значение точности и полноты, которое составило 75%. Также были выделены неверно определенные наблюдения, их количество составило 42. Мы также добавили два столбца 'p1' и 'p2' в `X_test1`, которые содержат вероятности предсказания модели для класса 0 ('p1') и класса 1 ('p2') на основе `model_zdorov`. Произвели фильтрацию `X_test1`, чтобы оставить только те строки, где фактические значения (true) не совпадают с предсказанными значениями (predict). Таким образом, новая часть кода позволяет нам идентифицировать строки в тестовом наборе данных, где модель ошиблась в своих предсказаниях.

Далее создавался визуализированный отчет с оценкой важности каждого признака в модели логистической регрессии `model_zdorov`. Более высокие столбцы указывают на более значимые признаки.

Таблица 31. Наиболее важные признаки изменений в группе.

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Важность признака
1430	0.095531
1405	0.043469
1160	0.038020
1525	0.034307

### 3.5.2 Оптимизация гиперпараметров для здоровых пациентов

Чтобы улучшить имеющуюся модель, был использован метод для систематического перебора различных комбинаций гиперпараметров модели с целью определения наилучших параметров `GridSearchCV`. Этот алгоритм выполнял перебор всех возможных комбинаций параметров, обучал модель на каждой комбинации и оценивал ее качество с использованием кросс-валидации, которая позволила оценить качество модели, разделяя доступные данные на обучающую и тестовую выборки.

После завершения поиска наилучших параметров, `GridSearchCV` предоставлял информацию о наилучших параметрах и соответствующем значении метрики качества, которую можно использовать для создания модели с оптимальными параметрами.

В данном случае, были использованы параметры '*penalty*' (тип регуляризации) и '*C*' (обратная сила регуляризации). Значения параметров для перебора указаны в списке *LogReg\_parameters*. *LogReg\_grid\_search.best\_params\_* выводит наилучшие параметры, найденные в процессе поиска. *LogReg\_grid\_search.best\_score\_* выводит значение наилучшего среднего показателя оценки качества модели при использовании наилучших параметров.

Результаты *GridSearchCV* указывали на то, что лучшие параметры модели *LogisticRegression* для данного набора данных являются  $C = 100$  и  $penalty = "l2"$ . Кроме того, лучший показатель метрики *best\_score\_* полученный с использованием *GridSearchCV* составляет 0.7634. Это значение является мерой качества модели на обучающем наборе данных при использовании лучших параметров.

После определения лучших параметров мы создали новый экземпляр модели *LogReg\_model\_GS\_z* с использованием улучшенных параметров, полученных из *GridSearchCV*, и построили отчет классификации.

Таблица 32. Отчет по модели метода логистической регрессии с оптимизированными параметрами.

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение «F1- score»,%	Значение «Support»,%
0	81	91	86	127
1	56	36	43	42
Accuracy			77	169
Macro average	68	63	64	169
Weighted average	75	77	75	169

Сравнивая с прошлым отчетом модели, мы можем наблюдать некоторое улучшение. Точность для класса 1 была раньше 48%, а стала 56%. Полнота для класса 0 в прошлой модели соответствовала 73% против 91% в текущей модели. Можно сделать вывод, что модель с настройкой гиперпараметров по сравнению с моделью без настройки гиперпараметров обладает более высокой точностью предсказания.

### 3.5.3 Вторичная классификация больных пациентов

На данном этапе было проведено дальнейшее разделение пациентов с ССЗ на 2 группы: с терапией и без терапии, используя модель логистической регрессии, так как она показала наилучшие результаты по сравнению с другими моделями. После разделения данных и их обучения мы вывели параметры модели в отчет, представленные на Рис.91.

Таблица 33. Отчет по модели метода логистической регрессии для больных пациентов.

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение score»,%	«F1- Значение «Support»,%
0	55	75	64	108
1	74	54	62	142
Accuracy			63	250
Macro average	64	64	63	250
Weighted average	66	63	63	250

На этом отчете видно, что модель корректно определила 55% больных пациентов на терапии и 74% без терапии.

### 3.5.4 Оптимизация гиперпараметров для больных пациентов

Далее проводилось улучшение существующей модели регрессии, используя тот же метод, что и в случае со здоровыми пациентами, а именно *GridSearch*. Был создан объект *LogReg\_grid\_search* класса *GridSearchCV*, который принимает в качестве аргументов модель *LogReg\_model\_GS\_b* и параметры *LogReg\_parameters*. Далее делали перебор всех возможных комбинаций значений параметров и обучение моделей с каждым набором параметров. После завершения подбора параметров, мы вывели лучшие параметры модели с помощью *best\_params\_* и лучший результат (среднее значение метрики) с помощью *best\_score\_*. Результаты метода отображены ниже как результат метода *GridSearch*.

Далее была построена модель логистической регрессии, используя оптимальные гиперпараметры, полученные ранее, в результате которой выводился отчет о классификации с использованием метрик *precision*, *recall*, *f1-score* и *support* сравнения истинных меток *y\_test* и предсказанных меток *y\_pred* с помощью функции *classification\_report* из модуля *metrics*.

Таблица 34. Отчет по модели метода логистической регрессии для больных пациентов.

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение score»,%	«F1- Значение «Support»
0	55	63	59	108
1	68	61	64	142
Accuracy			62	250
Macro average	62	62	61	250
Weighted average	62	62	62	250

Для класса 0 метрики *precision*, *recall* и *f1-score* составляли 0.55, 0.63 и 0.59 соответственно, для класса 1 метрики они составляли 68%, 61% и 64%, общая точность модели (accuracy) на тестовых данных составляла 62%, среднее значение метрик для *precision*, *recall* и *f1-score* составляла 62%, взвешенное среднее значение метрик также составляла 62%.

### 3.6 Применение нейросетей в задаче классификации

На последнем этапе были применены нейросети для имеющейся у нас задачи классификации пациентов. Для анализа была использована нейросеть MLPClassifier (Multi-Layer Perceptron Classifier).

Многослойный перцептрон (MLP) представляет собой разновидность искусственной нейронной сети прямого распространения, широко используемую для задач классификации в машинном обучении. На начальном этапе инициализируются случайные веса для всех связей между нейронами. Входные признаки подаются в входной слой сети, после чего информация передаётся через скрытые слои к выходному. Каждый нейрон суммирует взвешенные входные значения и применяет функцию активации для формирования выходного сигнала. После получения выходных значений вычисляется ошибка предсказания, которая затем распространяется обратно по сети для расчёта градиентов весов. Метод градиентного спуска используется для их обновления с целью минимизации ошибки. Процесс прямого и обратного распространения повторяется в течение нескольких эпох, пока модель не достигнет заданного критерия остановки или оптимальных весовых коэффициентов. После завершения обучения модель применяется для классификации новых данных. Входные значения подаются в обученную сеть, которая выдаёт предсказанные метки классов. Оценка качества модели проводилась с использованием различных метрик, ранее применённых при анализе алгоритмов машинного обучения.

Для использования нейросети MLPClassifier в анализе данных были выполнены соответствующие команды в Jupyter Notebook. Вначале импортирован класс MLPClassifier из библиотеки `sklearn.neural_network`, затем создан классификатор и определены его основные параметры.

Здесь `hidden_layer_sizes` указывал количество и размеры скрытых слоев нейронной сети. В данном случае использовалась сеть с 128 нейронами. Функция `activation` определяла функцию активации, которая использовалась в нейронах, здесь это был гиперболический тангенс. Для параметра `solver`, алгоритма оптимизации, мы выбрали адаптивный метод оптимизации ADAM. Размер пакета (`batch size`) для обучения нейронной сети составил 16 единиц и определял количество образцов, которые использовались для одного обновления весов. Из стратегий обновления скорости обучения была выбрана постоянная скорости обучения. Функцией `shuffle=True` мы определили, перемешивать ли данные перед каждой эпохой обучения. Коэффициент момента `momentum=0.9` определял влияние предыдущих обновлений весов на текущее обновление. Параметр `early_stopping=True` позволял использовать раннюю остановку, чтобы остановить обучение, если ошибка на валидационном наборе переставала улучшаться. `n_iter_no_change=10` определял количество эпох без улучшения на валидационном наборе, после которых обучение останавливается, если параметр `early_stopping` установлен в `True`. Максимальное количество эпох обучения выбиралось в 1000 единиц.

После создания классификатора необходимо было обучить модель на обучающих данных, используя метод `fit()`. `X_train` представлял собой матрицу признаков обучающего набора данных, а

$y_{train}$  - соответствующий вектор целевых значений. После обучения модели можно использовать ее для прогнозирования классов для новых данных с помощью метода *predict()*, где  $X_{test}$  представляет собой матрицу признаков тестового набора данных, а  $y_{pred}$  - предсказанный вектор классов.

Была также использована модель *MLPClassifier* для предсказания меток классов и расчета точности классификации на тренировочном и тестовом наборах данных

В полученных результатах предсказания для тренировочного набора данных точность составляет 0.720, что означает, что модель *MLPClassifier* правильно классифицирует примерно 70.2% образцов в тренировочном наборе данных. Для тестового набора данных точность составляет с округлением 0.732, что означает, что модель *MLPClassifier* правильно классифицировала примерно 73.2% образцов в тестовом наборе данных.

Для оценки производительности модели можно использовать различные метрики, такие как точность (accuracy), матрица неточностей (confusion matrix), отчет о классификации (classification report) и др.

Таблица 35. Отчет по модели нейронной сети

Параметр	Значение «Precision»	Значение «Recall»	Значение «F1-score»	Значение «Support»
0	67%	72%	69%	106
1	79%	74%	76%	148
Accuracy			73%	254
Macro average	73%	73%	73%	254
Weighted average	74%	73%	73%	254

Accuracy (точность) модели была равна 0.73, что означает, что она правильно классифицировала 73% образцов в общей выборке. Исходя из этих результатов, можно сказать, что модель показывает хорошую способность к предсказанию как класса 1, так и класса 0. Матрица неточностей для модели *MLPClassifier* была отображена на Рис.76

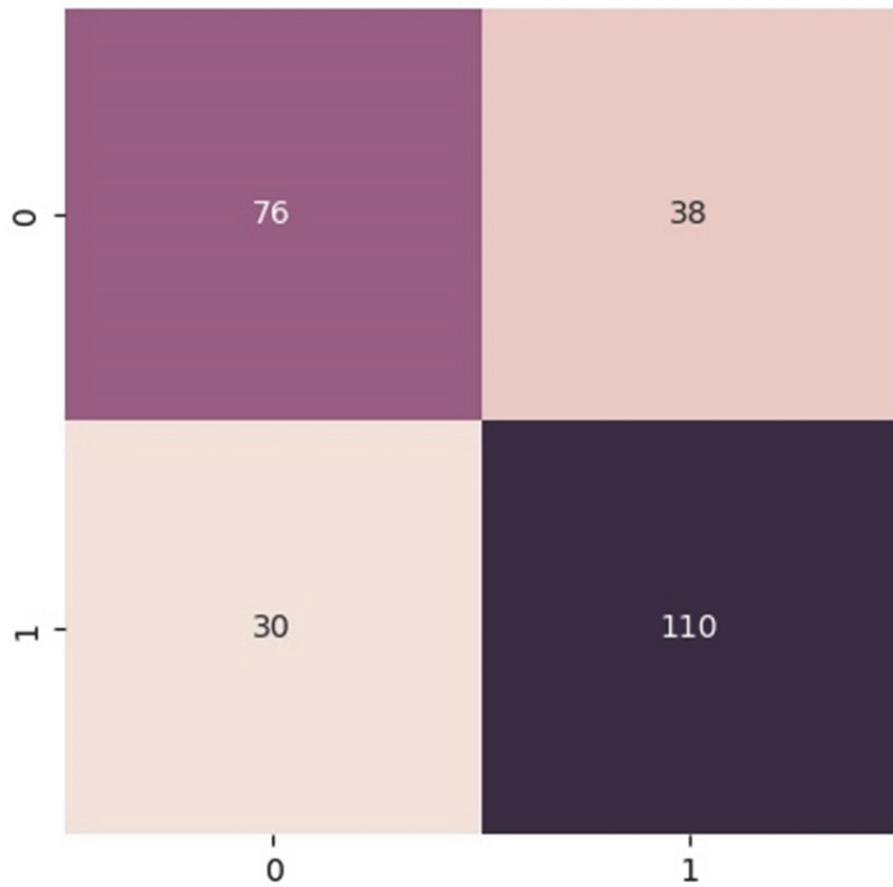


Рис.76. Матрица неточностей для модели нейросети

Далее была проведена дальнейшая вторичная классификацию для здоровых пациентов, матрица неточностей для модели представлена на Рис.77.

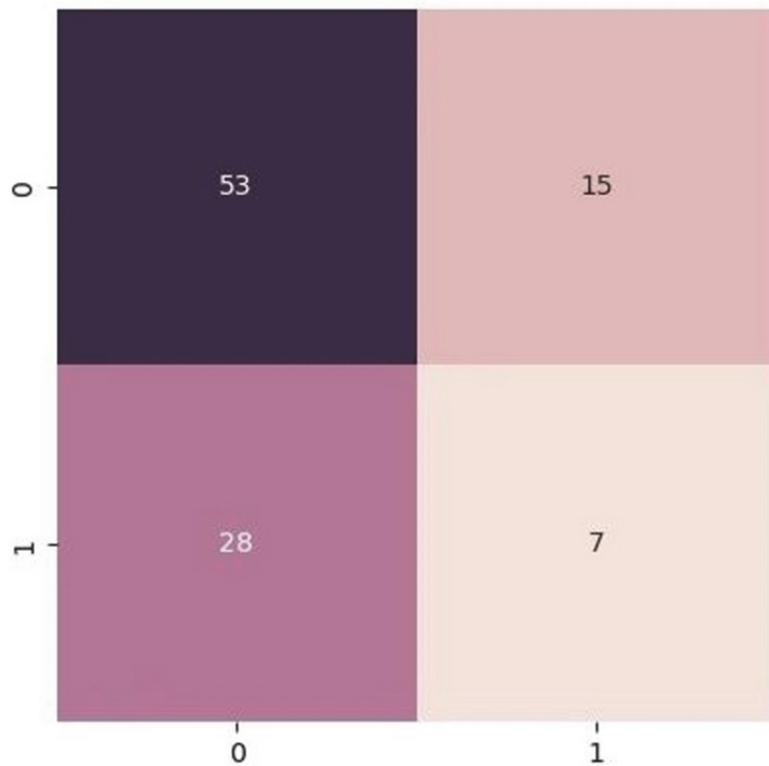


Рис.77 Матрица неточностей для модели классификации здоровых пациентов.

Также была создана модель дальнейшей классификации и для больных пациентов, матрица неточностей представлена ниже на Рис.78.

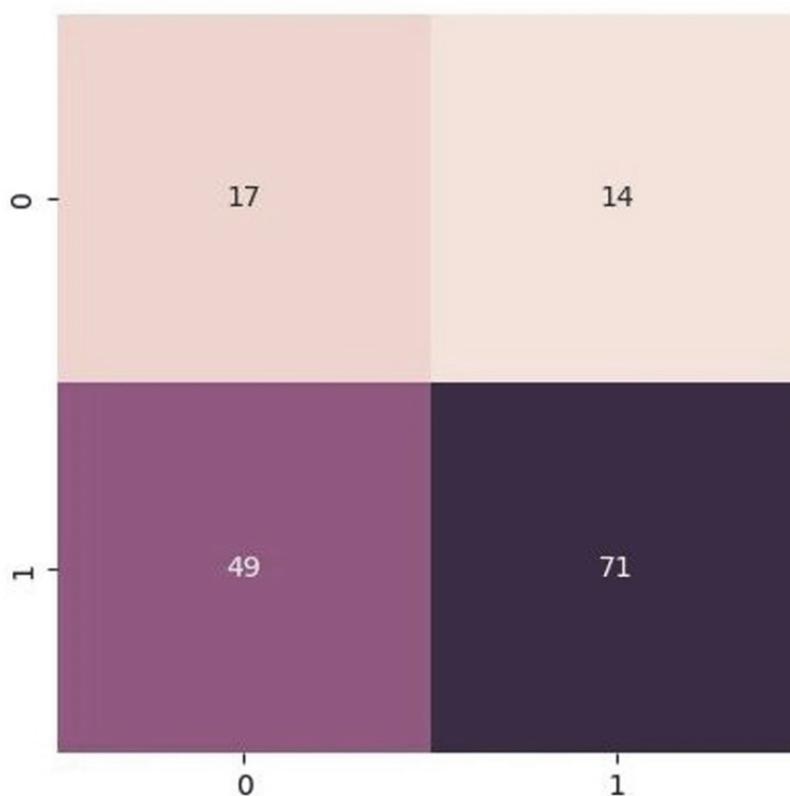


Рис.78 Матрица неточностей для модели классификации больных пациентов.

На представленных выше рисунках видно, что точности классификации тестовых наборов данных моделей нейросети составляют 58%, что является хорошим показателем, учитывая специфику имеющихся данных

В итоге было собрано порядка 2318 спектров КРС различных групп пациентов, включая группу с ОКС, спектры которой были добавлены в данном проекте. Рассмотрим диаграммы распределения пациентов по группам (Рисунок 80). На них обозначены следующие группы пациентов:

- Здоровые без терапии (ЗБТ)
- Здоровые с терапией (ЗСТ)
- После инфаркта (ПИ)
- Больные без терапии (ББТ)
- Больные с терапией (БСТ)
- Пациенты с острым коронарным синдромом (ОКС)

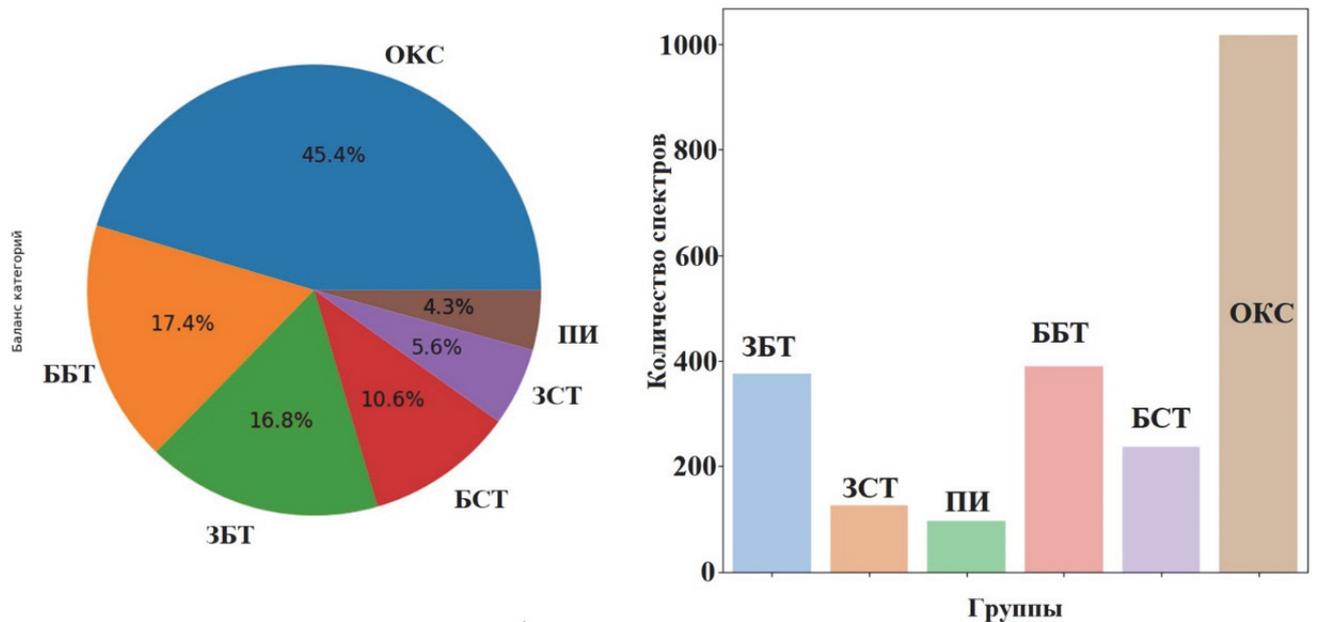


Рис. 79. Диаграммы распределения наблюдений пациентов по группам

На рисунке 100 видно, что после добавления спектров пациентов с ОКС распределение здоровых (22.4 %) и больных (77.6 %) пациентов стало неравномерным.

На примере классификации наблюдений пациентов на здоровую и больную группы рассмотрим несколько алгоритмов классификации с помощью машинного обучения. Для этого разделим первоначальные группы на две: здоровые (0) и больные (1), код реализации процесса был отражен на рисунке 105. В рамках работ данной подглавы был применен алгоритм «XGBoostClassifier». Данный алгоритм работает путем построения данных в дерево решений и использования остатков для повторного построения в следующем дереве решений последовательно.

Также было проведено сравнение алгоритмов для выявления наиболее точного метода (Рисунок 80).

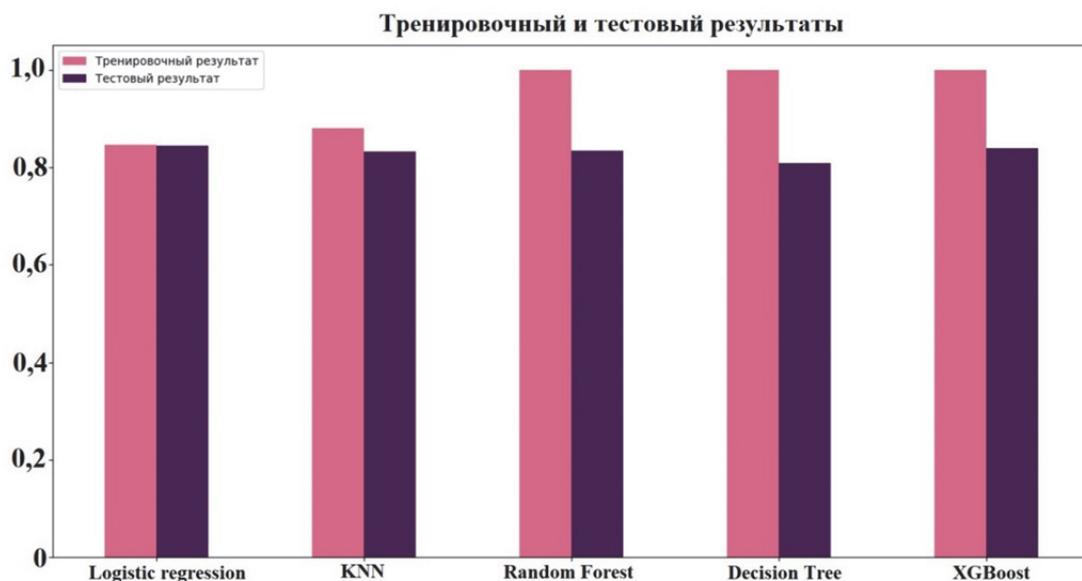


Рис. 80. График сравнения алгоритмов машинного обучения в применении к задачам классификации тромбоцитов.

На рисунке 80 видно, что лучшим алгоритмом для классификации здоровых и больных пациентов был выделен алгоритм логистической регрессии с точность (accuracy) 84,46%. В дальнейшем по данному принципу будут проводиться классификации с помощью данных алгоритмов и их сравнение. Далее была проведена классификация каждой из подгрупп пациентов.

### 1. Здоровые и больные пациенты

В результате проведенной работы был определен лучший классификатор. На Рисунке 80 можем заметить, что лучше справились алгоритмы логистической регрессии и XGBoostClassifier.

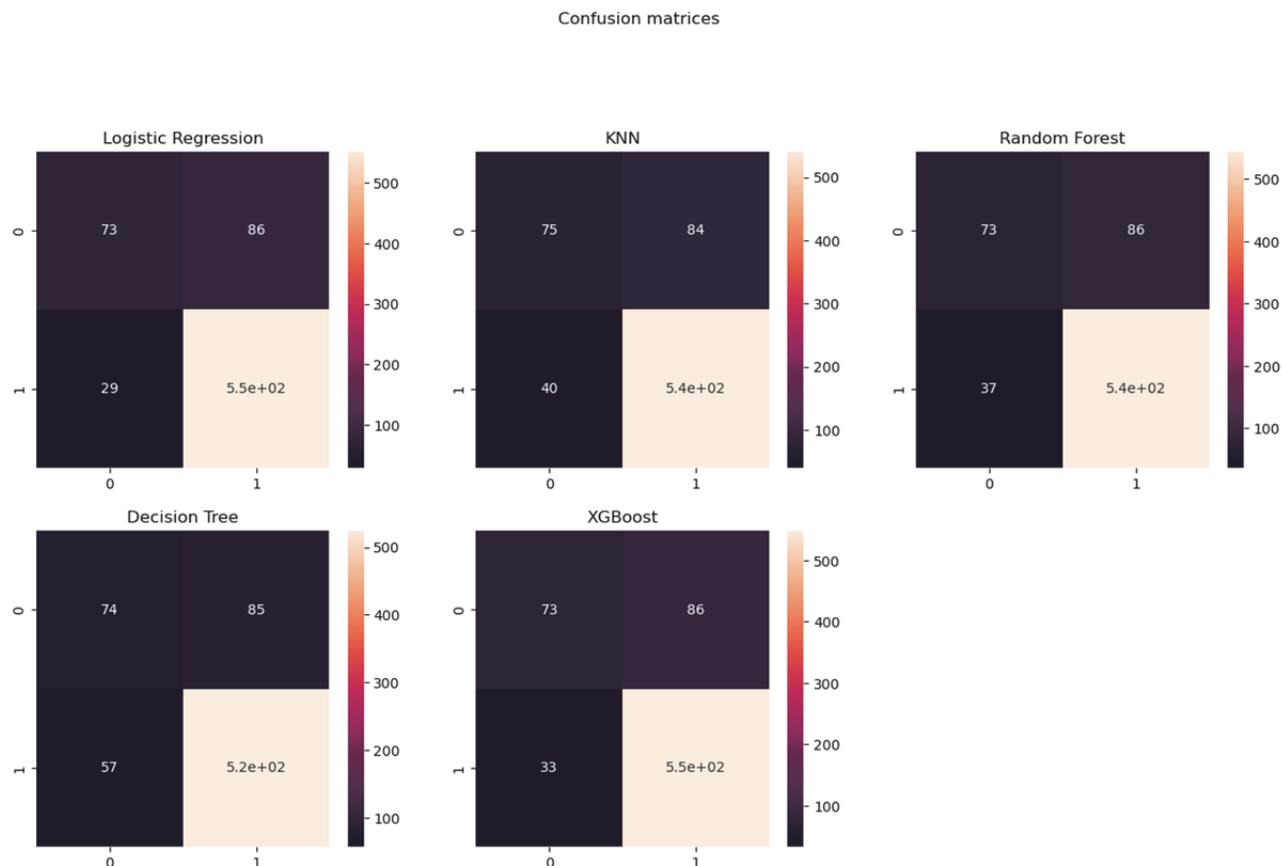


Рис. 81. Матрица ошибок для здоровых и больных пациентов

Далее рассмотрим отчет классификации для логистической регрессии (Таблица 36), так как он был выделен, как наилучший метод дифференциации спектров КРС для здоровых и больных пациентов.

Таблица 36. Отчет по модели нейронной сети

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение score»,%	«F1- Значение «Support»,%
0	72	46	56	159
1	87	95	91	581
Accuracy			84	740
Macro average	79	70	73	740
Weighted average	83	84	83	740

Анализируя результаты полученных метрик классификации для модели логистической регрессии, мы сделали некоторые наблюдения. Для класса здоровых пациентов (0) точность (*precision*) составляет 0,72, что означает, что 72% объектов, отнесенных к классу 0, действительно являются объектами этого класса. Для класса больных пациентов (1) точность (*precision*) составляет 0,87, что означает, что 87% объектов, отнесенных к классу 1, действительно принадлежат к этому классу. Высокие значения точности указывают на хорошую способность модели правильно классифицировать объекты. Для класса 0 полнота (*recall*) составляет 0,46, что означает, что 46% объектов класса 0 были правильно определены, а для класса 1 полнота (*recall*) составляет 0,95, что означает, что 95% объектов класса 1 были верно определены моделью. Полнота (*recall*) оценивает способность модели правильно обнаруживать объекты данного класса. Небольшое значение для 0 класса полноты объясняется тем, что класс не сбалансированы, поэтому у меньшего класса значения хуже.

### 1. Здоровые и пациенты с ОКС

Рассмотрим матрицы неточностей для данной классификации на Рисунке 82, чтобы выделить наиболее точный алгоритм. Можно заметить, что лучшие результаты показал алгоритм логистической регрессии.

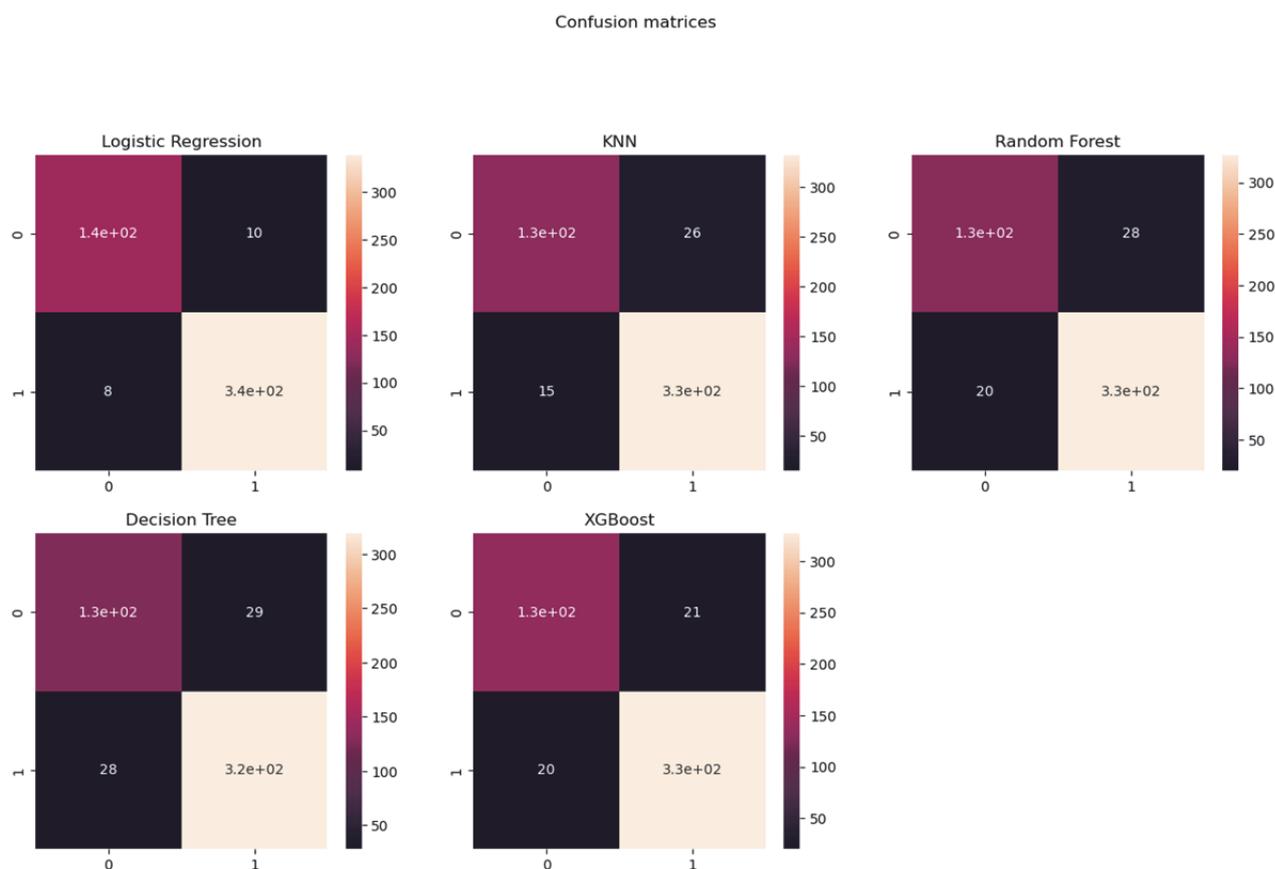


Рис. 82. Матрица неточностей для здоровых и пациентов с ОКС

Далее был рассмотрен отчет классификации для логистической регрессии (Рисунок Таблица 37), так как он был выделен, как наилучший метод дифференциации спектров КРС для здоровых и пациентов с ОКС.

Таблица 37. Отчет по модели нейронной сети

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение «F1-score»,%	Значение «Support»
0	95	94	94	155
1	97	98	97	347
Accuracy			96	502
Macro average	96	96	96	502
Weighted average	96	96	96	502

Анализируя результаты полученных метрик классификации для модели логистической регрессии, мы сделали следующие наблюдения. Для класса здоровых пациентов (0) точность (precision) составляет 95%, означает, что объектов, отнесенных к классу 0, действительно являются объектами этого класса. Для класса пациентов с ОКС (1) точность (precision) составляет 0,97, что означает, что 97% объектов, отнесенных к классу 1, действительно принадлежат к этому классу. Для класса 0 полнота (recall) составляет 0,94, что означает, что 94% объектов класса 0 были правильно определены, а для класса 1 полнота (recall) составляет 0,98, что означает, что 98% объектов класса 1 были верно определены моделью. Общая точность классификации (ассигасу) составила 96%.

## 2. Больные и пациенты с ОКС

На Рисунке 83 изображены матрицы неточностей для данной классификации. Можно заметить, что лучшие результаты показал алгоритм логистической регрессии.



Рис.83. Матрица неточностей для больных и пациентов с ОКС

Далее рассмотрим отчет классификации для логистической регрессии, так как он был выделен, как наилучший метод дифференциации спектров КРС для больных и пациентов с ОКС.

Таблица 38. Отчет классификации больных и пациентов с ОКС для логистической регрессии

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение «F1-score»,%	Значение «Support»
0	93	91	92	221
1	94	96	95	353
Accuracy			94	574
Macro average	94	93	94	574
Weighted average	94	94	94	574

Далее выполнялись наблюдения после анализа результатов полученных метрик классификации для модели логистической регрессии. Для класса больных пациентов (0) точность (precision) составляет 0,93, что означает, что 93% объектов, отнесенных к классу 0, действительно являются объектами этого класса. Для класса пациентов с ОКС (1) точность (precision) составляет 0,94, что означает, что 94% объектов, отнесенных к классу 1, действительно принадлежат к этому классу. Для класса 0 полнота (recall) составляет 0,91, что означает, что 91% объектов класса 0 были правильно определены, а для класса 1 полнота (recall) составляет 0,96, что означает, что 96% объектов класса 1 были верно определены моделью. Общая точность классификации (accuracy) составила 94%.

### 3. Больные без терапии и пациенты с ОКС

Далее были рассмотрены матрицы неточностей для данной классификации (Рисунок 84). Можно заметить, что лучшие результаты показал алгоритм логистической регрессии.

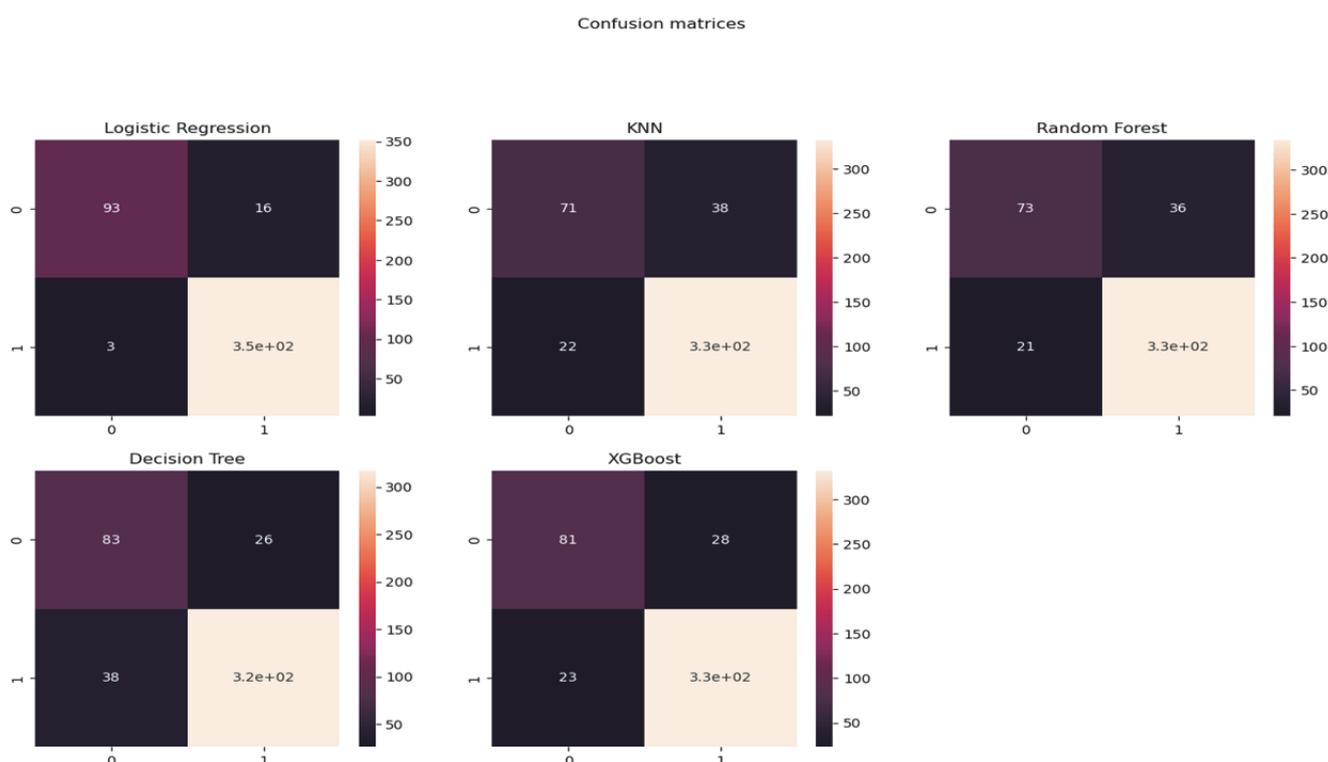


Рис. 84. Матрица неточностей для больных без терапии и пациентов с ОКС

Далее рассмотрим отчет классификации для логистической регрессии (Таблица 39), так как он был выделен, как наилучший метод дифференциации спектров КРС для больных без терапии и пациентов с ОКС.

Таблица 39. Отчет классификации больных и пациентов с ОКС для логистической регрессии

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение «F1-score»,%	Значение «Support»
0	97	85	91	109
1	96	99	97	355
Accuracy			96	464
Macro average	96	92	96	464
Weighted average	96	96	96	464

Были сделаны следующие наблюдения после анализа результатов полученных метрик классификации для модели логистической регрессии. Для класса ББТ (0) точность (*precision*) составляет 0,97, что означает, что 97% объектов, отнесенных к классу 0, действительно являются объектами этого класса. Для класса пациентов с ОКС (1) точность (*precision*) составляет 0,96, что означает, что 96% объектов, отнесенных к классу 1, действительно принадлежат к этому классу. Для класса 0 полнота (*recall*) составляет 0,85, что означает, что 85% объектов класса 0 были правильно определены, а для класса 1 полнота (*recall*) составляет 0,99, что означает, что 99% объектов класса 1 были верно определены моделью. Общая точность классификации (*accuracy*) составила 96%.

#### 4. Классификация больных пациентов на 4 группы

Рассмотрим матрицы неточностей для данной классификации (Рисунок 85). В данном случае была проведена классификация сразу 4 групп. Можно заметить, что лучшие результаты показал алгоритм XGBoostClassifier.

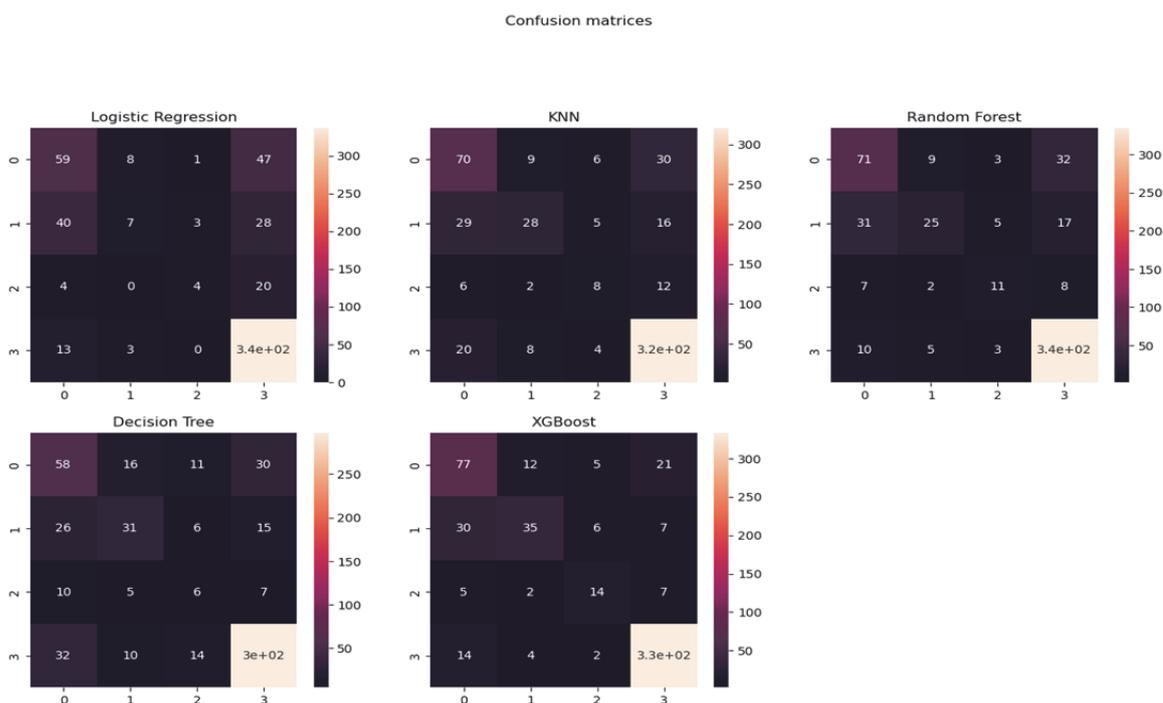


Рис.85. Матрица неточностей для больных пациентов 4 групп

Далее рассмотрим отчет классификации для алгоритма XGBoostClassifier (Таблица 40), так как он был выделен, как наилучший метод дифференциации спектров КРС для больных пациентов 4 групп.

Таблица 40. Отчет классификации больных и пациентов с ОКС для логистической регрессии

Параметр	Значение «Precision»,%	Значение «Recall»,%	Значение «F1-score»,%	Значение «Support»
0	61	67	64	115
1	66	45	53	78
2	52	50	51	28
3	90	94	92	353
Accuracy			80	574
Macro average	96	92	65	574
Weighted average	96	80	79	574

Можем заметить, что общая точность классификации (ассурасу) составила 80%. Но модель научилась хорошо дифференцировать только класс ББТ (0) и пациентов с ОКС (3), так как количество таких данных в датафрейме наибольшее. Класс БСТ (1) и пациенты после инфаркта (2) намного хуже дифференцируются, так как их количество намного меньше.

В итоге, в результате применения методов машинного обучения были выделены алгоритмы классификации для каждой из групп были выделены важные спектральные сдвиги, влияющие на дифференциацию спектров. Были определены различия между выборками и проведена их интерпретация.

### 1. Здоровые и больные пациенты

При использовании алгоритма логистической регрессии были получены наиболее важные при сравнении групп спектральные сдвиги и их интерпретация показаны в Таблице 41.

Таблица 41. Наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретация для здоровых и больных пациентов

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Важность признака	Интерпретация
1165	0.001282	v(C-C) в липидах

### 2. Здоровые и пациенты с ОКС

Для данной классификации был выбран алгоритм логистической регрессии и были получены спектральные сдвиги из таблицы 42.

Таблица 42. Наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретация для здоровых и больных пациентов

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Важность признака, %	Интерпретация
1165	0.2	$\nu(\text{C-C})$ в липидах
1500	0.1	Группа Амид II в белках
1160	0.1	$\nu(\text{C-C})$ в липидах

### 3. Больные и пациенты с ОКС

Алгоритм логистической регрессии показал следующие результаты для графика важности признаков, изображенные на Рисунке 114.

Наиболее важными при сравнении групп с помощью алгоритма логистической регрессии оказались спектральные сдвиги из таблицы 43.

Таблица 43. Наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретация для здоровых и больных пациентов

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Важность признака, %	Интерпретация
1160	0.11	$\nu(\text{C-C})$ в липидах
1500	0.12	Группа Амид II в белках

### 4. Больные без терапии и пациенты с ОКС

Таблица 44. Наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретация для здоровых и больных пациентов

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Важность признака, %	Интерпретация
1160	0.14	$\nu(\text{C-C})$ в липидах
1165	0.14	$\nu(\text{C-C})$ в липидах
1500	0.12	Группа Амид II в белках

### 5. Классификация больных пациентов на 4 группы

Также были рассмотрены наиболее значимые спектральные сдвиги для классификации пациентов с ОКС, пациентов после инфаркта, больных без терапии и больных с терапией.

Наиболее важные при сравнении групп спектральные сдвиги и их интерпретация показаны

в Таблице 45.

Таблица 45. Наиболее важные спектральные сдвиги и их интерпретация для здоровых и больных пациентов

Спектральный сдвиг, см <sup>-1</sup>	Важность признака, %	Интерпретация
1005	2,1	Фенилаланин
1275	1,9	Ненасыщенные жирные кислоты
1455	1,7	Липиды
1420	0,14	Колебания С-Н в липидах

В результате работы были разработаны и уточнены алгоритмы классификации групп пациентов, построены корреляции медицинских и спектральных данных, выделены спектральные биомаркеры, характеризующие различия групп пациентов.

Было выяснено, что для бинарной классификации спектров больше всего подходит алгоритм логистической регрессии, а для многоклассовой – XGBoostClassifier.

Важно отметить, что наиболее характеристическими группами изменений являются фенилаланин, ненасыщенные жирные кислоты, липиды. Изменения фенилаланина можно соотнести с конформацией интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , данные, опубликованные в [450] указывают на то, что сигнализация интегринов снаружи внутрь приводит к тирозиновому фосфорилированию  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  под действием сигналов изнутри наружу и к образованию больших белковых сигнальных комплексов между цитоплазматическими доменами  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  и внутритромбоцитарными белками, такими как FAK, талин, миозин,  $\beta_3$ -эндонексин, CIB1, Shc, Src и Syk, тирозиновая фосфатаза PRP-1b и PKC $\alpha$ , среди прочих. Важность внешней сигнализации  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  в усилении агрегации тромбоцитов была продемонстрирована с помощью создания мышей knock-in, у которых остатки тирозина Tyr-747 и Tyr-759 были мутированы в фенилаланин, изменения в котором и проявляются в спектрах КРС. В настоящее время начинают раскрываться конкретные механизмы связей внутритромбоцитарных белков с  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  и их физиологическая значимость для сигнализации интегринов «снаружи-внутри», которые могут быть оценены на основе данного маркера. Обсуждая биомаркеры, связанные с липидами и липопротеинами, стоит отметить, что липопротеины высокой плотности представляют собой гетерогенную группу молекул, состоящую из апопротеина I или комбинации апопротеинов I и II или апопротеина E, фосфолипидов, сфингомиелина, холестерилэфиров, небольшого количества триглицеридов и неэстерифицированного холестерина.

Липопротеины высокой плотности оказывают защитное действие против атеротромбоза. Они участвуют в нескольких регуляторных механизмах, таких как способность к эффлюксу холестерина (перенос холестерина из внепеченочных тканей в печень для дальнейшего метаболизма и экскреции), антиоксидантная, антитромботическая, противовоспалительная и

антиапоптотическая активность. Кроме того, ЛПВП признаны значимым независимым предиктором образования тромбов. В этом случае характеристические биомаркеры, выделенные по результатам разработки спектральных данных могут свидетельствовать о развитии тромбоза [451].

Полученные результаты могут быть использованы для разработки перспективных методов оптической диагностики в клинической кардиологии. В частности, очень сложно обнаружить молекулярные изменения в тромбоцитах с помощью традиционного биохимического анализа и оптической микроскопии из-за сниженной способности идентифицировать небольшое количество тромбоцитов. Кроме того, традиционные методы не могут предоставить быстрый и точный диагностический инструмент для определения как ингибирования агрегации одиночных тромбоцитов, так и конформации их структуры, что необходимо для экспресс-диагностики эффективности терапии, что определяет дальнейший выбор терапии. Этот факт открывает определенные перспективы как для фундаментальных, так и для прикладных исследовательских целей SERS. Также возможно выявление единичных тромбоцитов и исследование их структуры в материале пациента с помощью SERS, что может быть полезно для выбора адекватного лечения и прогноза терапии пациента. В результате этого исследования были продемонстрированы первые результаты по разработке методов машинного обучения для дифференциации спектров КР у пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями и без них.

В работе применены подходы к обработке массивов спектральных данных, состоящих из 1266 спектров, для различных групп пациентов: здоровых пациентов, пациентов с патологией сердечно-сосудистых заболеваний, здоровых пациентов, получающих терапию, и пациентов с патологией сердечно-сосудистых заболеваний, получающих терапию. Показана применимость алгоритма случайного леса. Выявлены потенциальные биомаркеры различий между группами пациентов, несущие информацию об ингибировании рецепторов при внешнем воздействии на него, на которых тестировались данные алгоритмы. Достигнутая точность классификации с помощью алгоритма случайного леса спектров по группам здоровых пациентов без терапии и больных с сердечно-сосудистой патологией без терапии составила 83,4%. При классификации терапии у здоровых пациентов точность составила 76,26%, у больных с сердечно-сосудистой патологией - 70%. Точность классификации спектральных выборок с помощью нейросетей составила 58%. Данные по классификации массивов спектров тромбоцитов были отражены в [409].

# ГЛАВА 4. СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО И ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА В ИССЛЕДОВАНИЯХ ВНУТРИШТАММОВЫХ РАЗЛИЧИЙ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТАМ

## 4.1 Исследования антибиотикорезистентности клеток *E. Coli*

Спектроскопия комбинационного рассеяния дает детальную информацию о различных компонентах внутри бактериальных клеток: ДНК/РНК, углеводы, белки, липиды, амидные группы. В результате выполнения работы был проведен последовательный анализ основных спектральных компонент был проведен в области «отпечатка пальца»  $600-1800\text{ см}^{-1}$ . Спектральная обработка проводилась с помощью программного пакета KnowItAll Spectroscopy Edition (лиц. № 112029). Для реализации целей и задач диссертации необходимо было максимально детальную спектральную идентификацию компонент стенки бактерий, затем осуществить спектральную съемку штаммов, выявить спектральные различия определить наличие принципиально изменяющихся колебаний при действии антибиотиков. На Рисунке 117 изображен характерный спектр чувствительного штамма *E. Coli* без спектральной обработки, а на Рисунке 86 КРС спектр со спектральной обработкой.

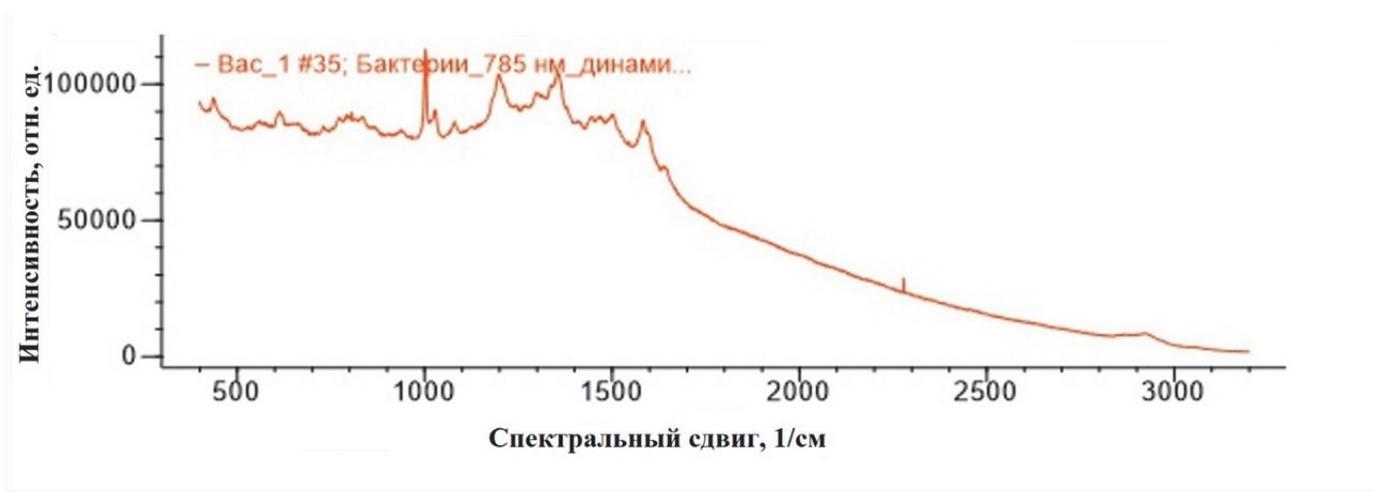


Рис. 86. КРС спектр бактерии *E.coli* без коррекции базовой линии

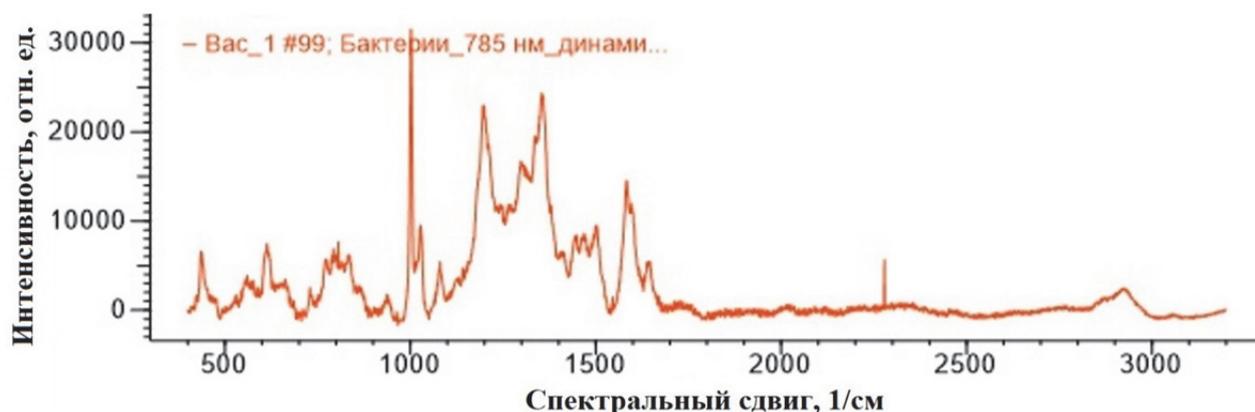


Рис. 87. КРС спектр бактерии *E.coli* без коррекции после проведения процедур коррекции

Для повышения точности анализа полученные спектры комбинационного рассеяния света были нормированы по максимальной интенсивности, после чего проведена коррекция базовой линии. В результате анализа колебательных спектров определены соответствующие частоты, сведённые в Таблицу 46. В данной таблице представлены колебательные максимумы для низкочастотной и среднечастотной областей спектра. Проведена детальная идентификация спектральных колебаний, характерных для липидов, пептидов, ДНК, аминокислот и других молекулярных компонентов, входящих в состав бактериальной клетки [374].

Таблица 46. Спектральный профиль бактерий *E.coli*

<b>E.Coli, спектральный сдвиг, см<sup>-1</sup></b>	<b>Интерпретация колебательной моды</b>
520-540	S-S валентные колебания
540	СОС гликозидное кольцо
	деформационные колебания
620	Фенилаланин
640	Тирозин
665	Гуанин
720	Аденин
785	Цитозин, урацил (колебания ароматического кольца)
829	Тирозин на поверхности клеточной стенки
852	Тирозин внутри клетки
858	С-С скелетные, С=О=С 1,4 гликозидная связь
897	СОС валентные колебания
1004	Фенилаланин
1061	С-N and С-С валентные колебания
1085	С-О валентные колебания
1098	СС скелетные и СОС валентные колебания от гликозидной связи
1102	>РО <sub>2</sub> - валентные колебания (симметричные)
1129	С-N и С-С валентные колебания
1230-1295	Амид III
1295	СН <sub>2</sub> деформационные колебания
1440-1460	С-Н <sub>2</sub> деформационные колебания
1575	гуанин, аденин (растяжение аром. кольца)
1606	Фенилаланин
1614	Тирозин
1650-1680	Амид I
1735	>С=О валентные колебания
2870-2890	СН <sub>2</sub> валентные колебания
2935	СН <sub>3</sub> and СН <sub>2</sub> валентные колебания
2975	СН <sub>3</sub> валентные колебания
3059	(С=С-Н) (ароматич) валентные колебания

Следующим шагом было выявление спектральных различий между контролем и штаммами под действием антибиотика на бактерию. Для разработки метода необходимо было, во-первых прояснить спектральные изменения в структуре клеточной стенки при действии препарата и выделить изменяющиеся колебательные моды. Таким образом, после обнаружения бактерий проводилась спектральная съёмка при следующих условиях: динамическая съёмка в диапазоне обратных волновых чисел  $350\text{-}3200\text{ см}^{-1}$ , 30 секунд, длина волны лазера 785 нм, мощность лазера варьировалась от 45 мВт до 15 мВт. Такие условия съёмки были обусловлены несколькими факторами, решающими, среди которых были получение спектра бактерий без засвета образца и посторонних шумов.

Полученные спектры сохранялись в формате txt с целью дальнейшей обработки в программе Origin 2021. После снятия спектра бактерий (контроль) с помощью автоматической пипетки Eppendorf Research с наконечником на бактерии была нанесена 1 капля по 1 мкл выбранного антибиотика. В течение 5 минут происходило высыхание лекарственного препарата, и съёмка возобновилась при тех же условиях, что и бактерии без лекарственного препарата. Измерения колебательных спектров производилось каждые 5 минут с целью наблюдения за динамикой изменения бактериальной стенки под воздействием антибиотика. Съёмка прекращалась, когда на протяжении 3-х изменений спектральная картина не изменялась. Полученные спектры сохранялись в формате .txt с целью дальнейшей обработки в программе Origin 2021. В процессе обработки данных было принято решение ограничить исследуемую область диапазоном «отпечатка пальца» с целью сохранения информативности спектров и исключения фонового шума, проявляющегося в области высоких волновых чисел. Для каждого антибиотика было собрано три ключевых экспериментальных спектра: спектр чувствительного штамма бактерий *E.Coli* (контроль), снятый непосредственно до добавления лекарственного препарата; спектр антибиотика рабочей концентрации, который был использован для наблюдения изменений в структуре бактерий; спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом, отражающий изменения структуры исследуемого образца. После отработки методики, получаемые спектры имели хорошую повторяемость и не отличались ни по интенсивности максимумов, ни по положению пиков.

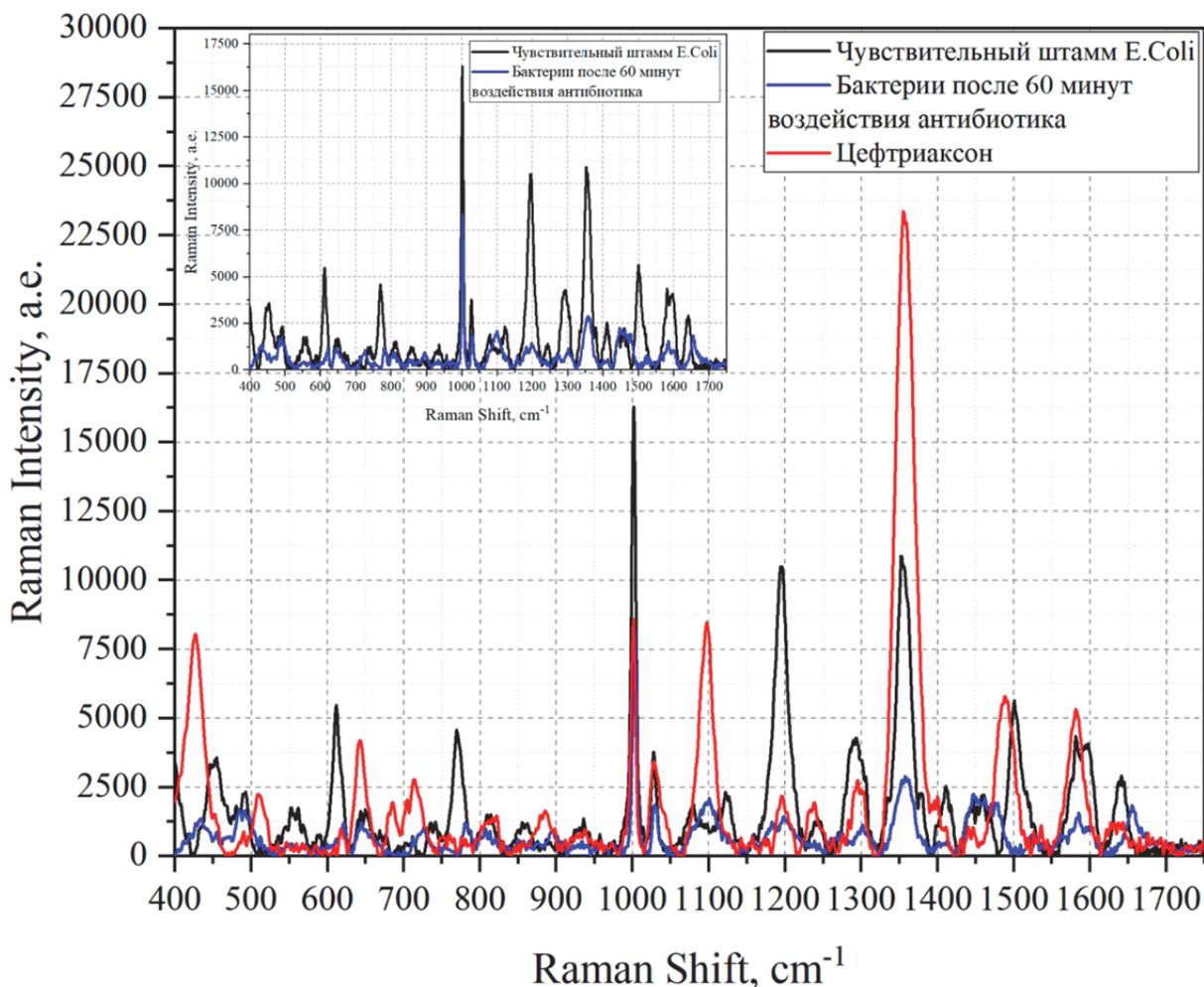


Рис. 88. ГКРС спектры бактерий *E.coli* и антибиотика Цефтриаксон. Чёрный спектр - спектр чувствительного штамма бактерий. Красный спектр –спектр антибиотика рабочей концентрации 7,5 мг/мл. Синий спектр – спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом. На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма и чувствительного штамма под воздействием бактерий.

Анализируя полученные графики, можно заметить несколько характерных особенностей воздействия цефтриаксона на чувствительный штамм *E.coli* для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Для нуклеиновых кислот наблюдается сдвиг максимумов с  $735\text{ см}^{-1}$  на  $727\text{ см}^{-1}$ , с  $771\text{ см}^{-1}$  на  $785\text{ см}^{-1}$ , уменьшение интенсивности максимумов нуклеиновых кислот на  $672\text{ см}^{-1}$ ,  $812\text{ см}^{-1}$  и  $1575\text{ см}^{-1}$ , однако на  $1483\text{ см}^{-1}$  можно наблюдать увеличение интенсивности. Для белковых полос можно наблюдать снижение интенсивности максимумов на  $855\text{ см}^{-1}$ ,  $1003\text{ см}^{-1}$ ,  $1031\text{ см}^{-1}$ ,  $1246\text{ см}^{-1}$ . Для липидной полосы было определено уменьшение интенсивности на  $1064\text{ см}^{-1}$ , уменьшение интенсивности и сдвиг с  $1295\text{ см}^{-1}$  на  $1300\text{ см}^{-1}$ .

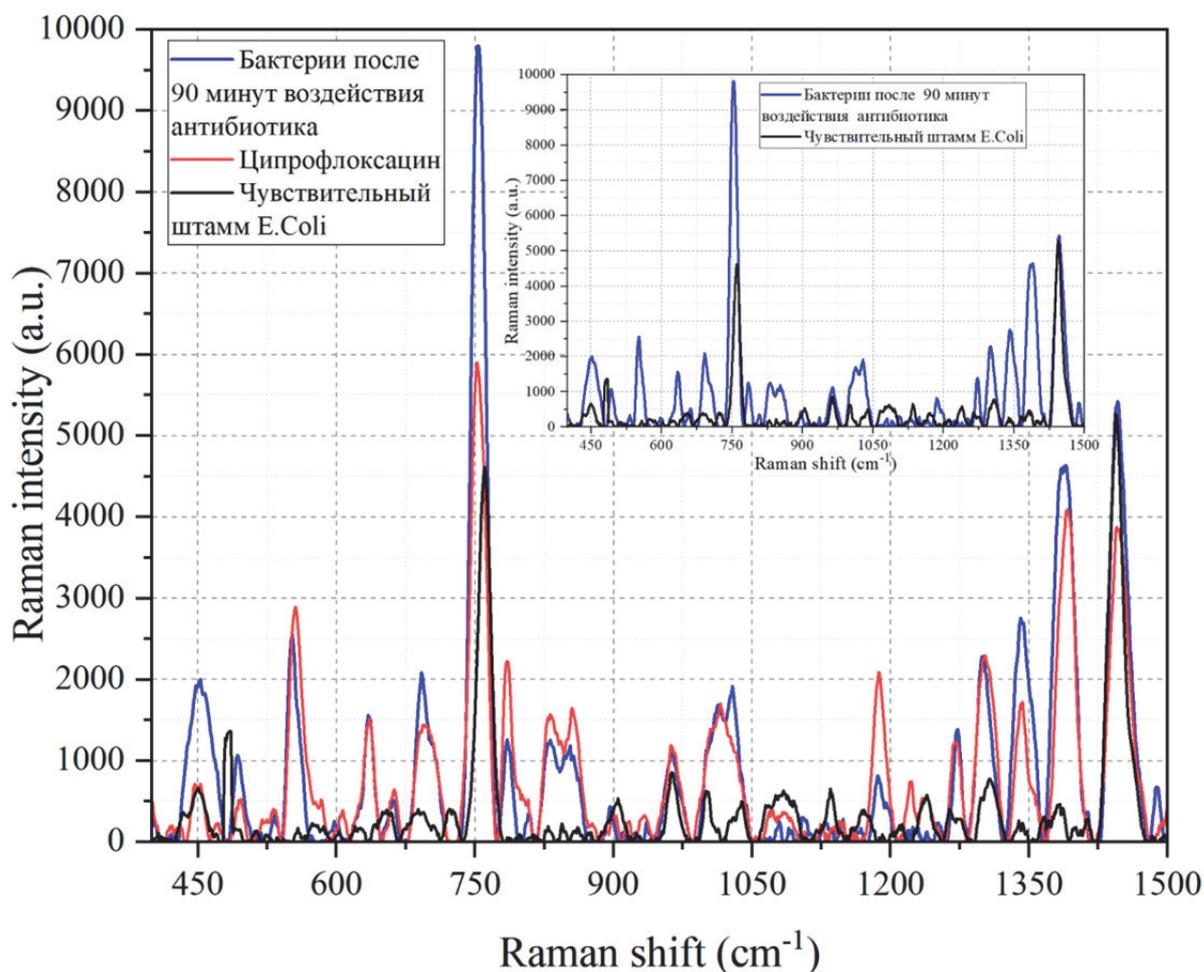


Рис. 89. ГКРС спектры бактерий *E.coli* и антибиотика ципрофлоксацин. Чёрный спектр - спектр чувствительного штамма бактерий. Красный спектр –спектр антибиотика рабочей концентрации 0,02 мг/мл. Синий спектр –спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом. На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма и чувствительного штамма под воздействием бактерий.

Анализируя полученные графики, можно заметить несколько характерных особенностей воздействия ципрофлоксацина чувствительный штамм *E.coli* для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Интенсивность колебательных полосы нуклеиновых кислот на  $672\text{ см}^{-1}$  и  $727\text{ см}^{-1}$  после взаимодействия с лекарственным препаратом увеличилась. Интенсивность максимумов на  $785\text{ см}^{-1}$ ,  $812\text{ см}^{-1}$  и  $1483\text{ см}^{-1}$ , наоборот, уменьшились так, что с трудом можно их идентифицировать. Колебательная полоса на  $1095\text{ см}^{-1}$  также изменила свою интенсивность. Однако это увеличение тяжело приписать только к изменению нуклеиновой группы, поскольку форма спектра ципрофлоксацина в области  $1057\text{ см}^{-1}$  -  $1105\text{ см}^{-1}$  имеют одинаковую форму с формой бактерий под воздействием препарата. Так что это изменение может быть результирующей от двух анализируемых образцов: бактерии и антибиотика.

Для липидной группы характерен максимум на  $1300\text{ см}^{-1}$ . Несмотря на то, что три анализируемых графика имеют максимум в этой области, у бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом происходит уменьшение интенсивности так, что можно говорить о

действию лекарственного препарата на образец, а не на получение результирующего спектра. Максимум на  $1440\text{ см}^{-1}$  также становится менее интенсивным. При рассмотрении белковых групп было определено следующее: колебательная мода на  $832\text{ см}^{-1}$  становится менее интенсивной и сдвигается на  $827\text{ см}^{-1}$ , а максимум с  $855\text{ см}^{-1}$  сдвигается на  $862\text{ см}^{-1}$ . Происходят спектральные сдвиги с  $1010\text{ см}^{-1}$  на  $1001\text{ см}^{-1}$  и с  $1030\text{ см}^{-1}$  на  $1040\text{ см}^{-1}$  с уменьшением интенсивности.

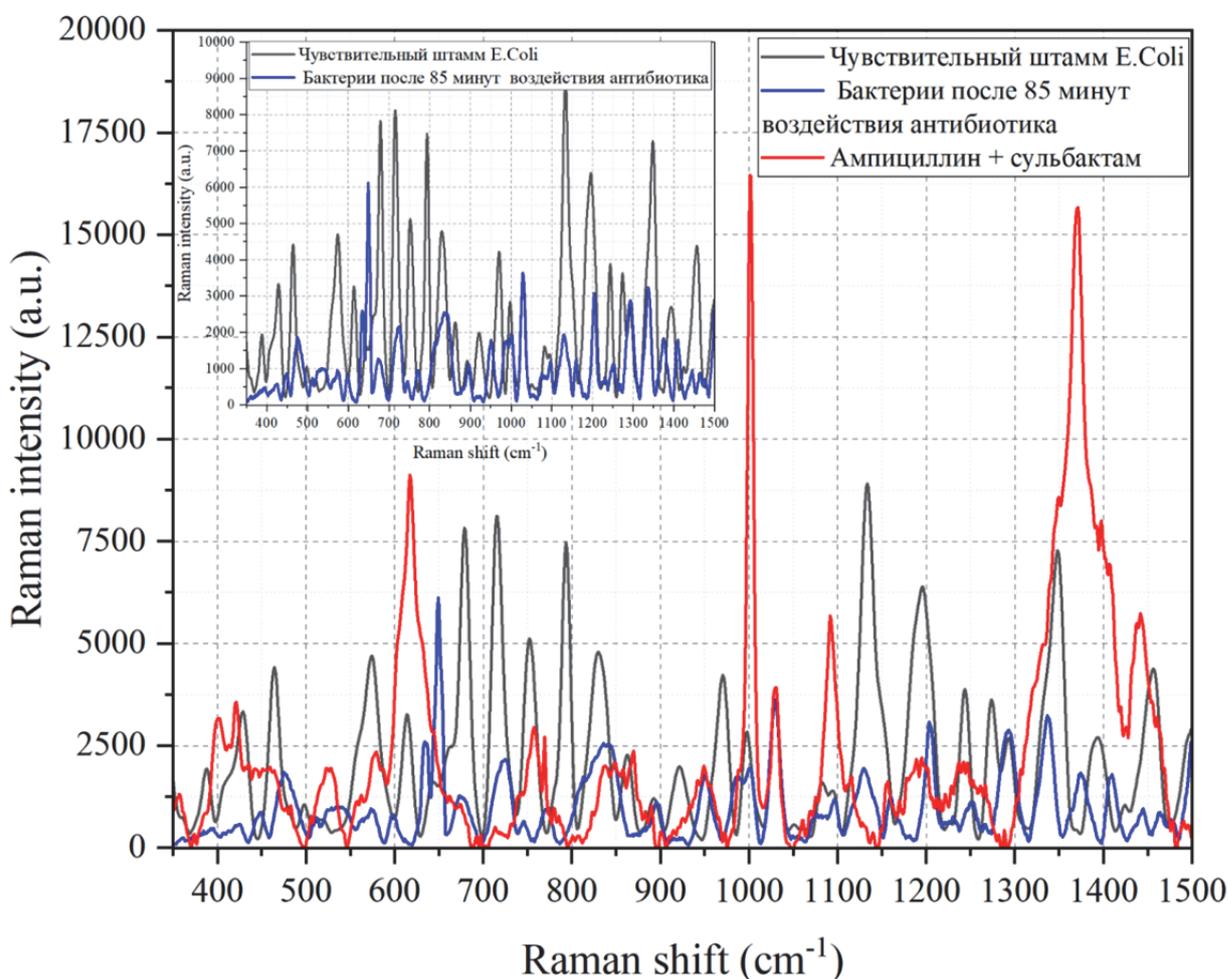


Рис. 90. ГКРС спектры бактерий *E.coli* и антибиотика ампициллина + сульбактама. Чёрный спектр - экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий. Красный спектр – экспериментальный спектр антибиотика рабочей концентрации 0,02 мг/мл. Синий спектр – экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом. На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма и чувствительного штамма под воздействием бактерий.

Анализируя полученные графики, можно заметить несколько характерных особенностей воздействия ампициллина совместно с сульбактамом на чувствительный штамм *E.coli* для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Удалось определить изменения в некоторых колебательных полос нуклеиновых кислот: максимум на  $1095\text{ см}^{-1}$  у бактерий после взаимодействия с ампициллином совместно сульбактамом становится менее интенсивным.

В колебательных спектрах липидной группы зафиксированы изменения интенсивности полос при  $1065\text{ см}^{-1}$  и  $1293\text{ см}^{-1}$ . Кроме того, при анализе максимума, расположенного на

1455  $\text{cm}^{-1}$ , выявлено не только снижение интенсивности после взаимодействия с препаратом, но и его сдвиг до 1443  $\text{cm}^{-1}$ . При дифференциации полос белков было определено уменьшение интенсивности и сдвиг максимума с 830  $\text{cm}^{-1}$  на 837  $\text{cm}^{-1}$ . Максимум на 855  $\text{cm}^{-1}$  у бактерий под действием лекарственного препарата не был идентифицирован, в отличие от контроля.

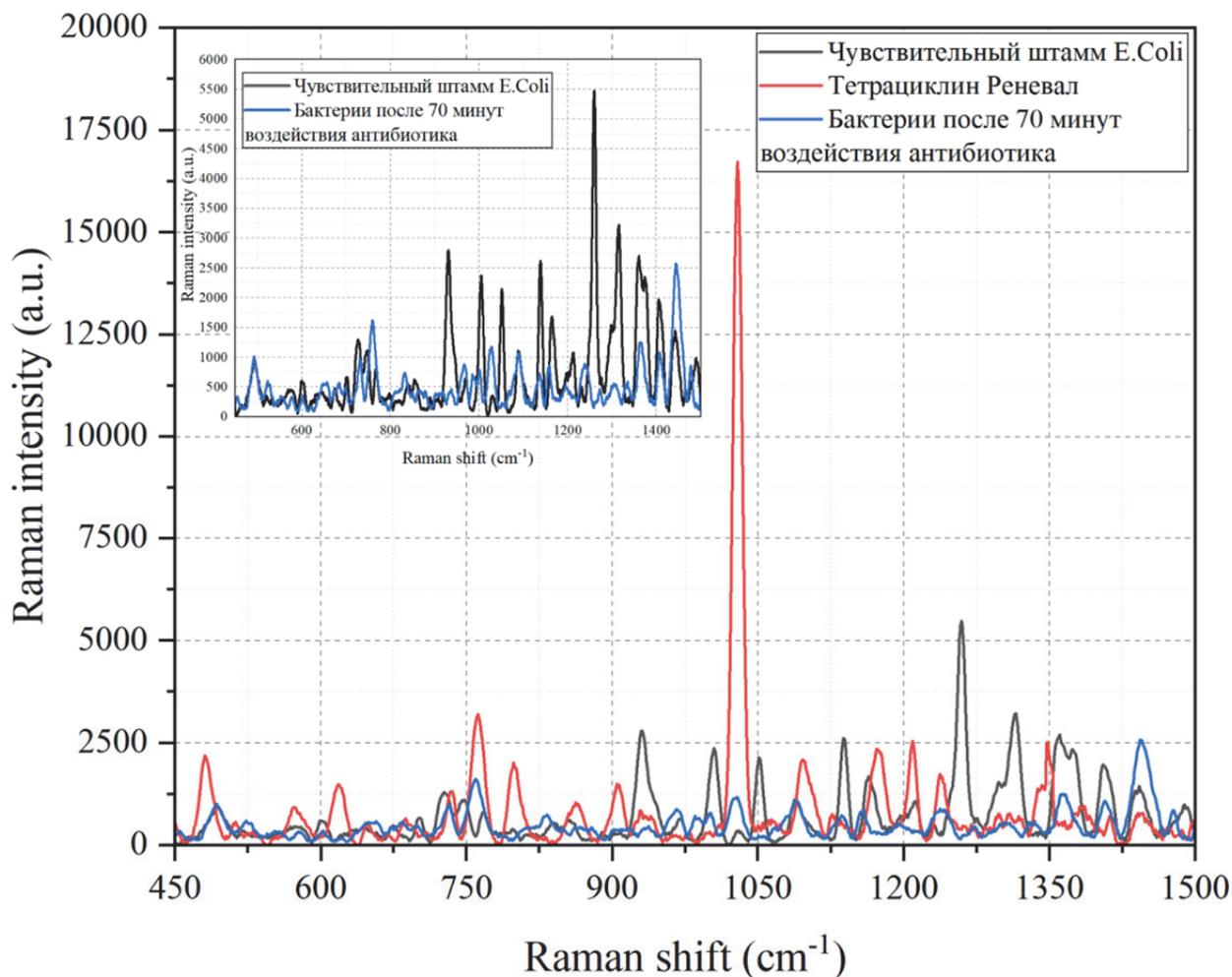


Рис. 91. ГКРС спектры бактерий *E.coli* и антибиотика Тетрациклин Реневал. Чёрный спектр - спектр чувствительного штамма бактерий. Красный спектр – спектр антибиотика рабочей концентрации 0,02 мг/мл. Синий спектр – спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом. На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма и чувствительного штамма под воздействием бактерий.

Полученные графики демонстрируют несколько специфических изменений, связанных с воздействием Тетрациклина Реневала на чувствительный штамм *E. coli*, особенно в отношении органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Для нуклеиновых кислот зафиксированы сдвиги некоторых спектральных максимумов, например, с 726 до 731  $\text{cm}^{-1}$  с одновременным снижением интенсивности, а также с 1483 до 1478  $\text{cm}^{-1}$ . В спектральных характеристиках липидной группы также наблюдаются изменения. Максимум при 1065  $\text{cm}^{-1}$  в контрольном образце *E. coli* выражен слабо, однако после воздействия Тетрациклина Реневала его интенсивность увеличивается. В то же время максимум при 1300  $\text{cm}^{-1}$ , присутствующий в контрольной группе, после обработки препаратом значительно ослабевает.

Максимумы на  $1440$  и  $1452\text{ см}^{-1}$  после добавления ципрофлоксацина сдвигаются на  $1445$  и  $1458\text{ см}^{-1}$  соответственно. Для белковой группы также наблюдается спектральный сдвиг полос: с  $840\text{ см}^{-1}$  на  $830\text{ см}^{-1}$ , сдвиг с уменьшением интенсивности с  $1004\text{ см}^{-1}$  на  $1000\text{ см}^{-1}$ , сдвиг с увеличением интенсивности с  $1032\text{ см}^{-1}$  на  $1025\text{ см}^{-1}$ .

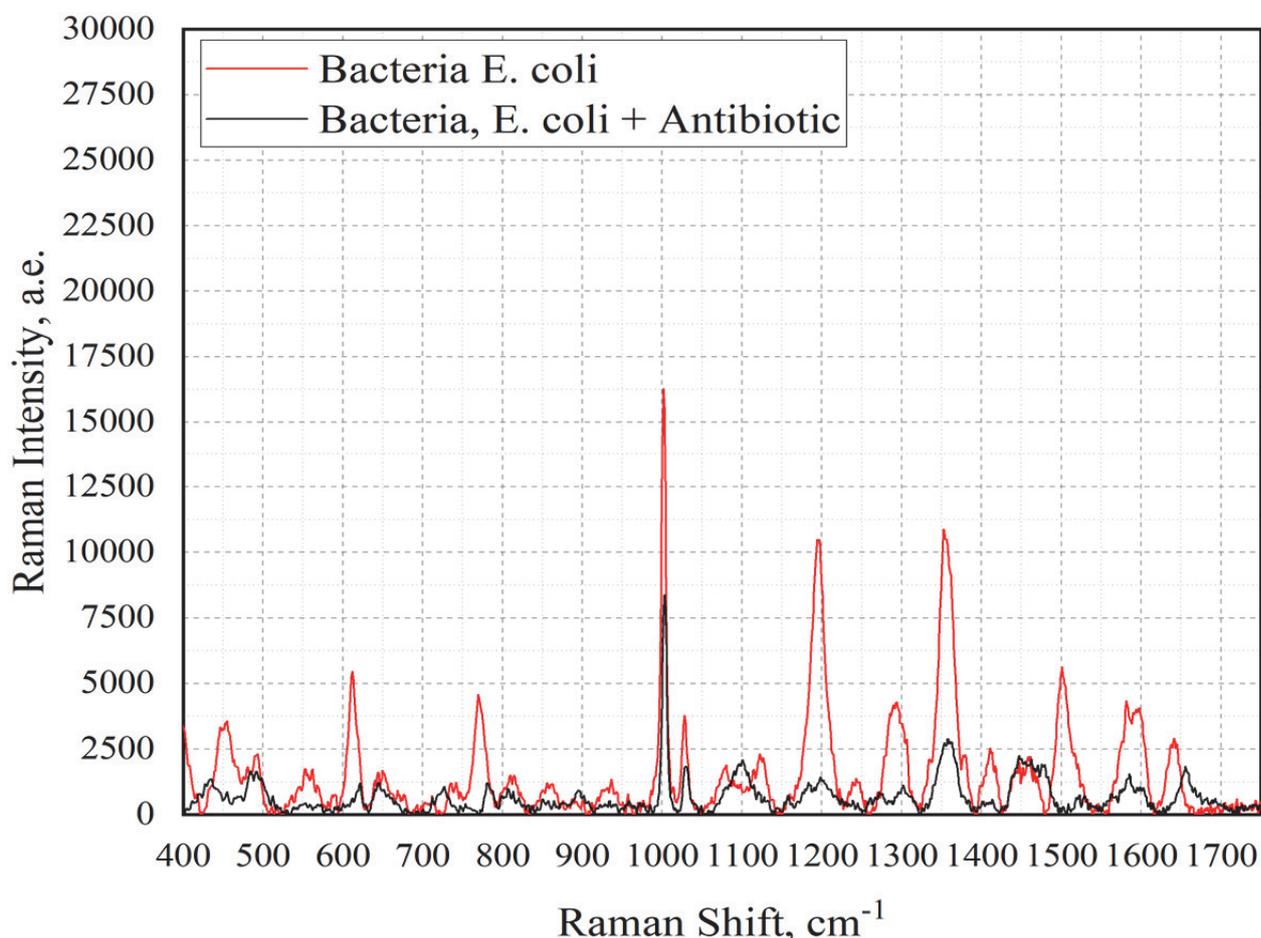


Рис. 92. ГРПС спектры бактерий *E.Coli* и антибиотика рифампицин. Красный спектр - экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий. Черный спектр - экспериментальный спектр антибиотика рабочей концентрации  $0,015\text{ мг/мл}$ .

Воздействие рифампицина на чувствительный штамм *E. coli* приводит к изменениям в спектрах органических соединений, составляющих бактериальную стенку. Для нуклеиновых кислот отмечены сдвиги спектральных максимумов: пик при  $785\text{ см}^{-1}$  смещается до  $791\text{ см}^{-1}$  с одновременным уменьшением интенсивности и красным сдвигом, а интенсивность пика при  $1295\text{ см}^{-1}$  снижается, сопровождаясь его смещением до  $1310\text{ см}^{-1}$ . Таким образом, были выделены изменяющиеся колебательные моды, характеризующие изменения при действии антибиотика (см. Таблица 47). Спектральные максимумы, изменения в которых были зарегистрированы в процессе спектральной съемки

Таблица 47. Спектральный профиль *E.coli* под воздействием антибиотика. Жирным шрифтом выделены те данные, где зарегистрированы изменения

<b>Е.Coli, спектральный сдвиг, см<sup>-1</sup></b>	<b>Интерпретация колебательной моды</b>
520-540	S-S валентные колебания
540	СОС гликозидное кольцо деформационные колебания
<b>620</b>	<b>Фенилаланин</b>
640	Тирозин
665	Гуанин
<b>720</b>	<b>Аденин</b>
<b>785</b>	<b>Цитозин, урацил (колебания ароматического кольца)</b>
<b>829</b>	<b>Тирозин на поверхности клеточной стенки</b>
<b>852</b>	<b>Тирозин внутри клетки</b>
858	С-С скелетные, С=О=C 1,4 гликозидная связь
897	СОС ваде
<b>1004</b>	<b>Фенилаланин</b>
1061	С-N and С-С валентные
1085	С-О валентные
1098	СС скелетные и СОС валентные от гликозидной связи
1102	>РО <sub>2</sub> - валентные (симметричные)
1129	С-N и С-С валентные
1230-1295	Амид III
<b>1295</b>	<b>СН<sub>2</sub> деформационные</b>
<b>1440-1460</b>	<b>С-Н<sub>2</sub> деформационные</b>
1575	гуанин, аденин (растяжение аром. кольца)
1606	Фенилаланин
1614	Тирозин
1650-1680	Амид I
1735	>С=О валентные
2870-2890	СН <sub>2</sub> валентные
2935	СН <sub>3</sub> and СН <sub>2</sub> валентные
2975	СН <sub>3</sub> валентные
3059	(С=C-H) (ароматич) валентные

## 4.2 Исследования внутриштаммовых различий клеток микобактерий туберкулеза различной резистентности штамма *Beijing*

Спектральный анализ микобактерий для каждого элемента структуры был проведен следующим образом. Поскольку клеточная стенка микобактерии имеет комплексное строение и сама микобактерия может быть спектрально отличима от других видов бактерий, для выявления внутриштаммовых различий микобактерий различной резистентности [352], таким образом, в работе были анализированы основные составляющие клетки с помощью спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света. [Рис. 94] [353]. Анализ возможных изменений проводился последовательно для каждого элемента клеточной стенки, который может претерпевать изменения в процессе приобретения антибиотикорезистентности.

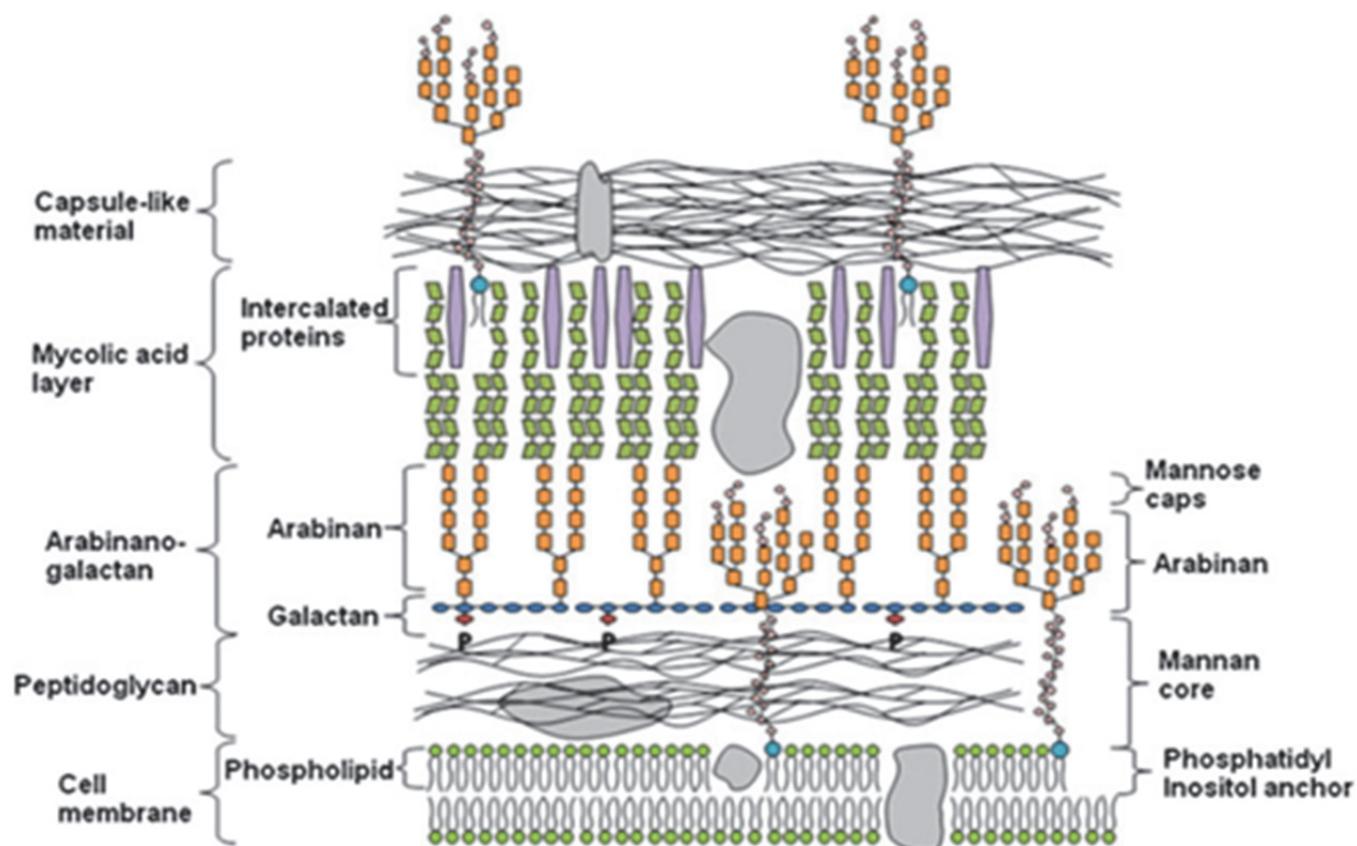
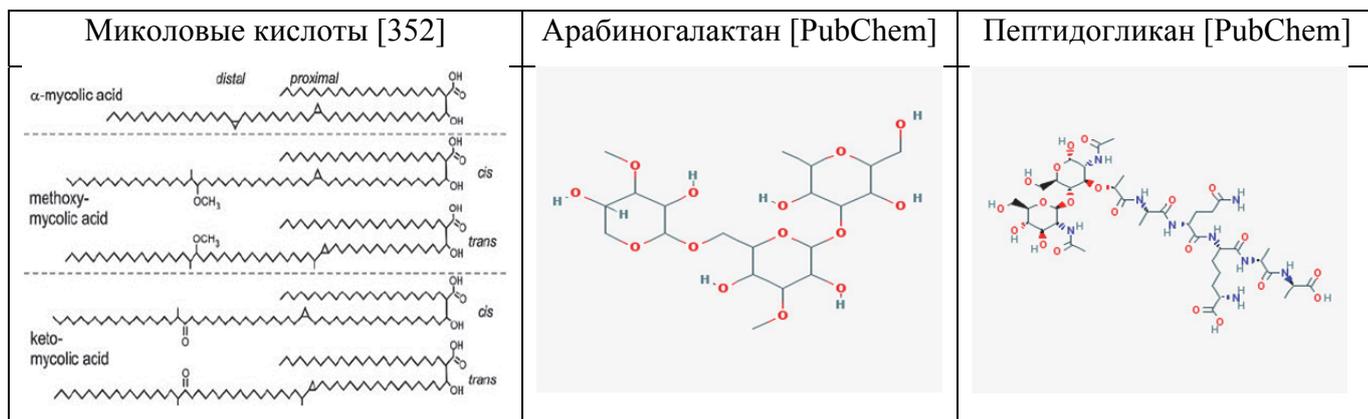


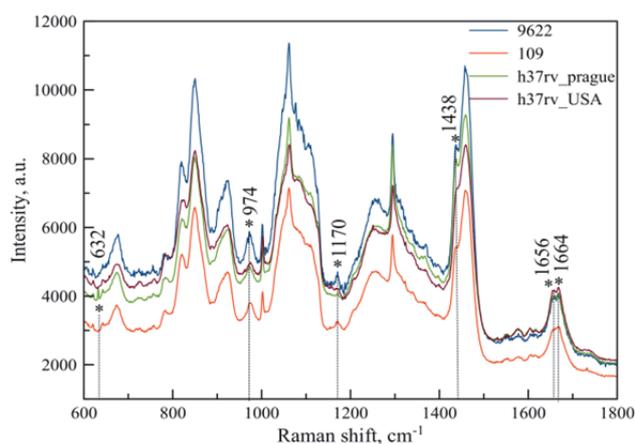
Рис. 93. Схематическое представление клеточной стенки микобактерии в соответствии с [353].

Полученные спектральные картины были анализированы в среднечастотном ( $600-1800\text{ см}^{-1}$ ) и высокочастотном ( $2500-3100\text{ см}^{-1}$ ) диапазоне на возможные изменения в составе миколовых кислот, арабиногалактана, пептидогликана, белков и липидов, входящих в клеточную стенку микобактерии. В Таблице 48 изображены структуры миколовых кислот, арабиногалактана и пептидогликана. Поскольку миколовые кислоты входят в состав клеточной стенки микобактерии, а формы миколовых кислот могут быть идентифицированы посредством спектроскопии КР и ГКР [354], то данный слой-потенциальный маркер антибиотикорезистентности интенсивно изучался авторами в рамках данной работы.

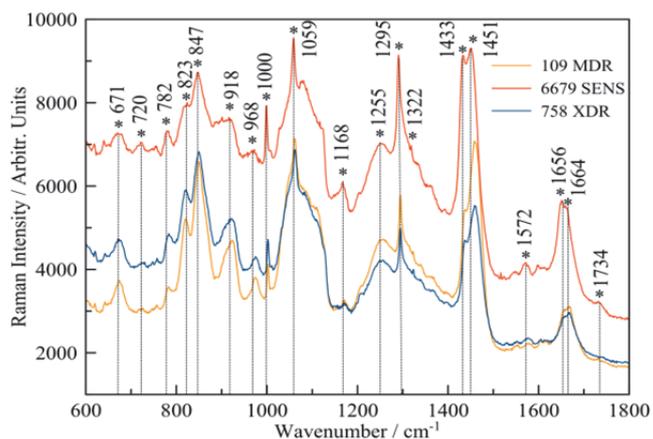
Таблица 48. Структура основных составляющих клеточной стенки микобактерии



В результате проведения экспериментов спектроскопии комбинационного рассеяния света была получена характерная спектральная картина для референтных и клинических штаммов микобактерий туберкулеза. На Рисунке 94а изображена в сравнении спектральная картина для референтных и легочных штаммов микобактерий туберкулеза. Успешно зарегистрированы спектры клинических штаммов чувствительных к туберкулезу (ТБ-ЧВ), полирезистентных штаммов множественной лекарственной устойчивости ПолиЛУ (МЛУ), штаммов с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), а также референтных H37Rv Пражский и H37Rv\_США. Для внелегочных штаммов были зарегистрированы спектры комбинационного рассеяния для внелегочных ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ штаммов выявлены и отмечены характеристические максимумы бактериальных клеток (Рис. 94б). Для анализа для всех спектров была выполнена фильтрация шумов, коррекция базовой линии, произведена нормировка на максимум интенсивности (Рис 94).



а)



б)

Рис. 94. Спектры комбинационного рассеяния света для легочных и референтных штаммов (А) и внелегочных штаммов различной антибиотикорезистентности (Б).

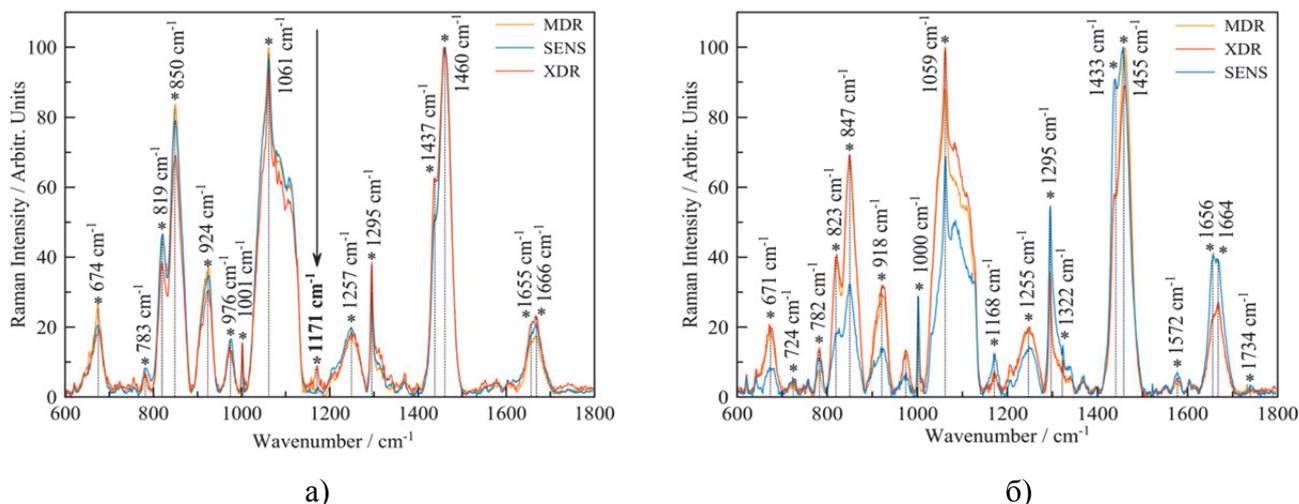


Рис. 95. Нормированные, подвергнутые фильтрации и коррекции базовой линии спектры комбинационного рассеяния света для легочных и референтных штаммов (А) и внелегочных штаммов различной антибиотикорезистентности (Б).

Для более точного анализа полученные спектры комбинационного рассеяния света были нормированы на максимум интенсивности и откорректированы. Полученные в результате анализа колебательные частоты были сведены в Таблицу 49. В таблице отражены колебательные максимумы для низкочастотной и среднечастотной областей спектра. Были идентифицированы спектральные колебания для липидов, пептидов, ДНК, аминокислот и других спектральных элементов входящих в состав микобактерии.

Таблица 49. Колебательные частоты для легочных штаммов ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ [364]. Жирным шрифтом выделены предполагаемые сигнатуры искомым частей клеточной стенки микобактерии

ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	Колебательные моды
640 w	640 w	640 w	Скелетные (С-С) ( <b>пептидогликан</b> )
671 w	674 mw	674 w	Тирозин
724 vw	724 vw	724 vw	ДНК
783 w	783 w	783 w	Цитозин, урацил
821 wsh	819 wsh	819 wsh	Ring-breathing колебания тирозина с CaDPA carboxylate stretching колебаниями
849 sbr	850 sbr	850 msbr	$\nu$ (CC) ring breathing ( <b>пептидогликан</b> )
924 mbr	924 mbr	924 mbr	$\nu$ (CHR <sub>2</sub> ) C-C скелетн. str. где R $\neq$ CH <sub>3</sub> ( <b>фосфолипиды</b> )
976 mwbr	972 mwbr	972 mwbr	L-Гистидин
1002 m	1002 mw	1002 m	$\nu$ (CC) Фенилаланин
1061 s	1061 s	1061 s	C-C,C-N ( <b>Возможный профиль миколовых кислот</b> )
1171 ww	1171 ww	1171 w	Глутатион
1257 mwbr	1256 wbr	1263 mwbr	Амид III
1295 s	1295 m	1295 vs	CH <sub>2</sub> twist колебания (липиды) (профиль миколовых кислот)
1437 s	1437 vs	1436 vs	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) (насыщенные липиды) ( <b>профиль миколовых кислот</b> )
1460 vs	1461 vs	1457 vs	CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> деформации протеинов и липидов
1656 mbr	1656 mbr	1656 mbr	Амид I
1664 msh	1667 msh	1667 msh	Амид I

Где w-слабые колебания, m-средние колебания, s – интенсивные колебания, vs – очень интенсивные колебания, vw-очень слабые колебания, br – широкий максимум, sh-плечо.

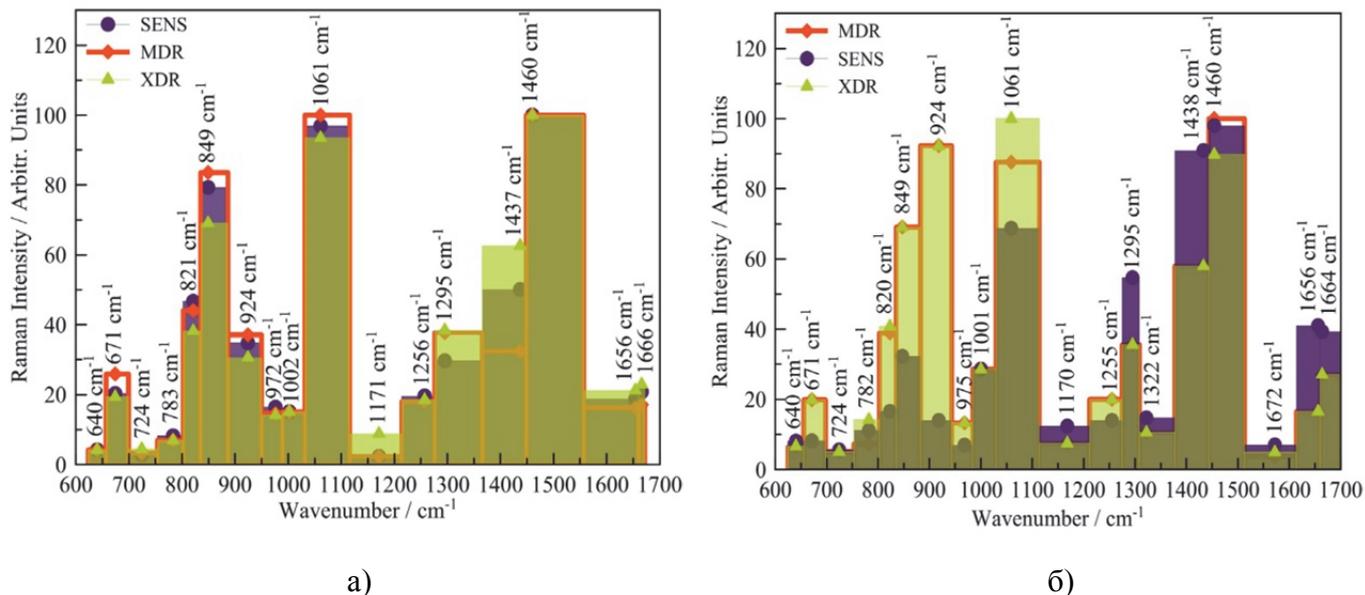


Рис. 96. Интенсивность основных характеристических максимумов для легочных штаммов (А) и внелегочных штаммов микобактерий (Б).

Было отмечено явное отличие интенсивности основных колебательных мод для микобактерий легочного и внелегочного туберкулеза. Например, интенсивность максимума глутатиона резко снижается в штаммах ШЛУ для внелегочного туберкулеза, но увеличивается для штаммов МЛУ и ТБ-ЧВ по сравнению с туберкулез легких. Это удивительный факт, поскольку глутатион вырабатывается не МбТ, а его окисленной формой (токсичной для клеток МбТ) генерируется макрофагом для борьбы с патогеном. Специальная система МбТ детоксифицирует его для производства глутатиона в клетках, который не так токсичен, как его окисленная форма. [355]. Такие различия в интенсивности между двумя формами туберкулеза можно объяснить сильной вирулентностью внелегочных штаммов, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения. Лимонная кислота, выявленная во всех исследованных штаммах, не входит в состав клеточной стенки, однако её присутствие может свидетельствовать об активном росте бактерий. Это указывает на то, что спектральный анализ комбинационного рассеяния позволяет не только идентифицировать структуры клеточной стенки, но и оценивать энергетическое состояние метаболических путей, участвующих во взаимодействии «хозяин-патоген» [356].

По результатам спектрального анализа легочных штаммов были выделены максимумы, характеризующие профили пептидогликана, фосфолипидов, миколовых кислот. Основными результатами спектрального анализа явилась регистрация увеличения интенсивности рассеяния для колебания на частоте  $1437\text{ см}^{-1}$  для штамма ШЛУ, характерного для профиля миколовых кислот, а также регистрация увеличения интенсивности рассеяния для колебания на частоте  $1171\text{ см}^{-1}$ , спектральный максимум которого, характерен для глутатиона. Предполагалось увеличение плотности слоя миколовых кислот, что в свою очередь коррелирует с интенсивность детектируемого сигнала и антибиотикорезистентностью бактерии (от ТБ-ЧВ к ШЛУ). Данные выводы в полной мере коррелируют исследованиями, с использованием ВЭЖХ в [357].

Таблица 50. Колебательные частоты для внелегочных штаммов ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ [364]. Жирным шрифтом выделены предполагаемые сигнатуры искомым частей клеточной стенки микобактерии

(ТБ-ЧВ)	(МЛУ)	(ШЛУ)	Колебательные моды
640 vw	640 w	640 w	Скелетные (С-С) ( <b>пептидогликан</b> )
671 w	674 mw	674 mw	Тирозин
724 vw	724 vw	724 vw	ДНК
782 mw	782 mw	783 mw	Цитозин, урацил
823 msh	820 mssh	820 msh	колебания ароматического кольца тирозина
847 m	850 s	850 s	$\nu$ (СС) валентные колебания ( <b>пептидогликан</b> )
918 mbr	924 msbr	922 msbr	$\nu$ (CHR <sub>2</sub> ) С-С скелетн. str. где R $\neq$ CH <sub>3</sub> ( <b>фосфолипиды</b> )
975 wbr	975 mbr	974 mbr	L-Гистидин
1000 s	1001 m	1002 m	$\nu$ (СС) Фенилаланин
1059 s	1061 vs	1062 vs	С-С,С-N ( <b>Возможный профиль миколовых кислот</b> )
1168 w	1170 w	1170 vw	Глутатион
1255 wbr	1255 mbr	1255 mbr	Амид III
1295 vsbr	1295 sbr	1295 sbr	CH <sub>2</sub> крутильные колебания (липиды) (профиль миколовых кислот)
1322 ms	1323 ms	1322 m	A+G+Тур
1433 ssh	1438 msh	1438 msh	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) (насыщенные липиды) ( <b>профиль миколовых кислот</b> )
1455 vs	1460 s	1460 s	CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> деформации протеинов и липидов
1656 mbr	1656 wbr	1656 wbr	Амид I
1664 msh	1667 wsh	1667 wsh	Амид I

Где w-слабые колебания, m-средние колебания, s – интенсивные колебания, vs – очень интенсивные колебания, vw-очень слабые колебания, br – широкий максимум, sh-плечо.

По результатам анализа внелегочных штаммов микобактерий туберкулеза (Таблица 50) наблюдалась другая спектральная картина. Интенсивность максимума на частоте 1437 см<sup>-1</sup> от ТБ-ЧВ к ШЛУ уменьшалась, тогда, как максимум на 1061 см<sup>-1</sup> увеличивался. Интенсивность спектрального максимума на 1171 см<sup>-1</sup>, характерного для глутатиона, уменьшалась от ТБ-ЧВ к ШЛУ. Для МЛУ и ШЛУ штаммов было отмечено увеличение интенсивности спектральных максимумов для сдвигов волн 621 см<sup>-1</sup>, 823 см<sup>-1</sup>, 847 см<sup>-1</sup>, 918 см<sup>-1</sup> 1059 см<sup>-1</sup> и 1255 см<sup>-1</sup>. Поскольку легочные и внелегочные штаммы внутри одного вида микробиологически отличны [358], возможно различие характеристических мод для искомым в проекте спектральных биомаркеров антибиотикорезистентности. Спектральные максимумы, характеризующие слой миколовых кислот и глутатиона, проявляют различия у лёгочных и внелёгочных штаммов. Предполагается увеличение плотности слоя миколовых кислот, что характеризуется увеличением интенсивности колебаний при 1062 см<sup>-1</sup>, что в свою очередь коррелирует с интенсивностью детектируемого сигнала и антибиотикорезистентностью бактерии (от ТБ-ЧВ к ШЛУ).

Следующим шагом был проведен анализ липидного состава спектров микобактерий в высокочастотной области. Были детально проанализированы спектральные максимумы белков и

липидов в соответствии с [358, 359]. Были выявлены различия в спектральных картинах для легочных и внелегочных штаммов, а также штаммов с различной антибиотикорезистентностью внутри образцов одного штамма.

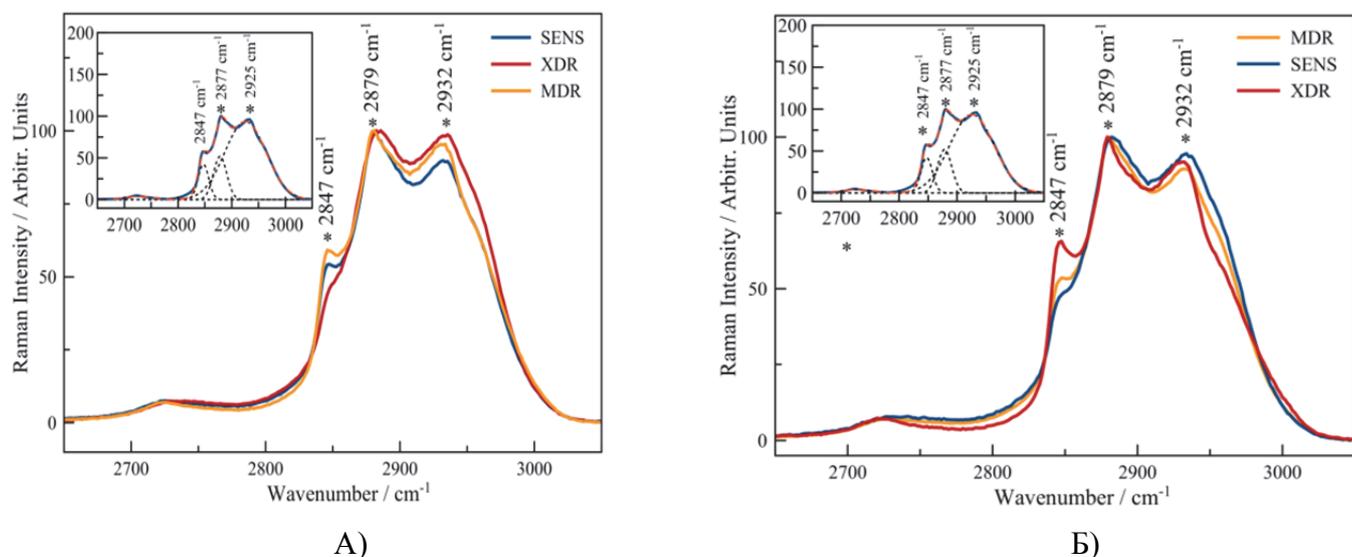


Рис. 97. Спектры комбинационного рассеяния света для легочных (А) и внелегочных штаммов (Б) для ТБ-ЧВ (синяя линия), МЛУ (желтая линия), ШЛУ (красная линия) микобактерий. Дополнительно, для анализа проводилось разложение каждого спектра с использованием гауссиан (вставки).

Для легочных штаммов были идентифицированы колебательные группы, отраженные в Таблице 49, Таблице 50, Таблице 51. Были выявлены колебания групп:  $\text{CH}_2$  симметричные валентные колебания в липидах,  $\text{CH}_3$  ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах,  $\text{CH}_2$  ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах, относящиеся к внутриядерному содержимому. Интенсивность колебательных максимумов также менялась в зависимости от анализируемого штамма. В направлении уменьшения антибиотикорезистентности от ШЛУ к МЛУ интенсивность росла на 25% для колебания  $\text{CH}_2$  с частотой  $2847 \text{ cm}^{-1}$  и на 7% для колебания  $\text{CH}_2$  с частотой  $2932 \text{ cm}^{-1}$ . Для колебания  $\text{CH}_3$  на частоте  $2879 \text{ cm}^{-1}$  не было детектировано явных колебаний спектральной интенсивности.

Для внелегочных штаммов полученные спектры изображены на Рисунке 129б. Для них также были определены колебания групп:  $\text{CH}_2$  симметричные валентные колебания в липидах,  $\text{CH}_3$  ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах –  $2847 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2$  ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах  $2879 \text{ cm}^{-1}$ , относящиеся к внутриядерному содержимому –  $2932 \text{ cm}^{-1}$ . Были задетектированы изменения интенсивности колебательных мод. В направлении увеличения антибиотикорезистентности от ТБ-ЧВ к ШЛУ интенсивность колебания  $\text{CH}_2$   $2847 \text{ cm}^{-1}$  увеличивается на 18% и колебания  $\text{CH}_2$  на  $2847 \text{ cm}^{-1}$  увеличивалась на 3%. С другой стороны, от ТБ-ЧВ к МЛУ интенсивность колебаний уменьшается на 10% для  $\text{CH}_2$  колебаний липидов на  $2847 \text{ cm}^{-1}$ . Для колебания  $2879 \text{ cm}^{-1}$  изменений интенсивности спектров не наблюдалось.

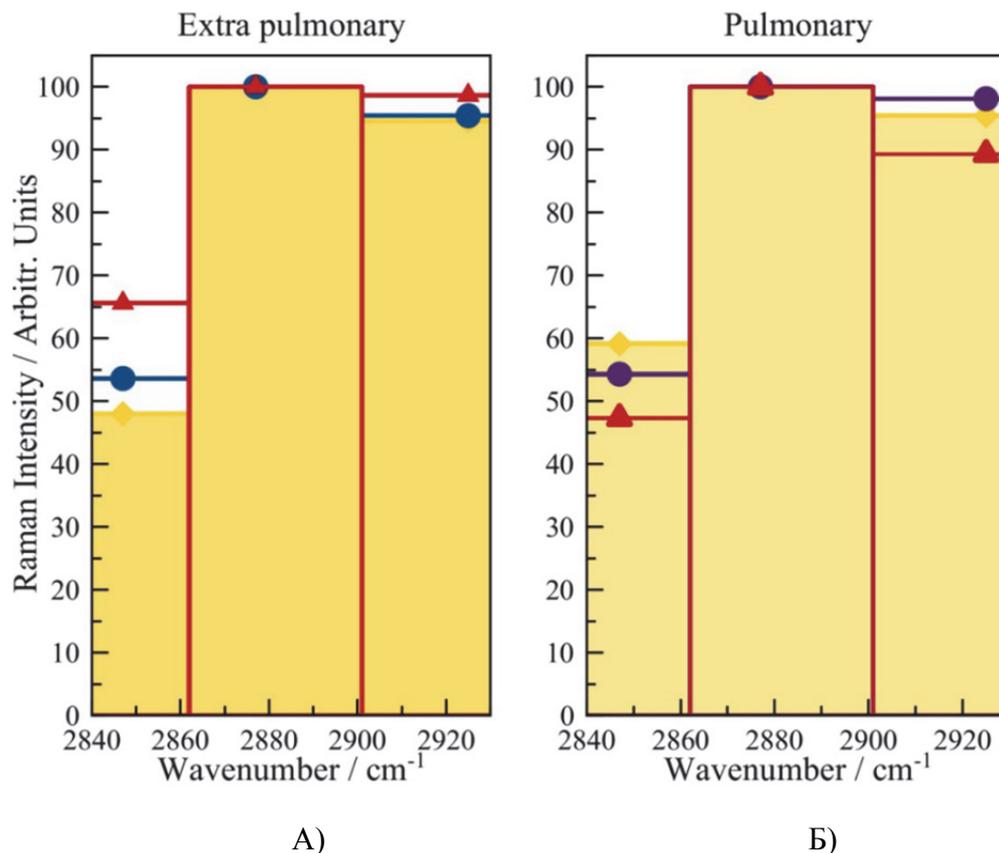


Рис. 98. Картина распределения интенсивностей основных колебательных максимумов ТБ-ЧВ (синие линии), МЛУ (желтые линии), ШЛУ (красные линии) в высокочастотной области для внелегочных штаммов (А) и легочных штаммов (Б).

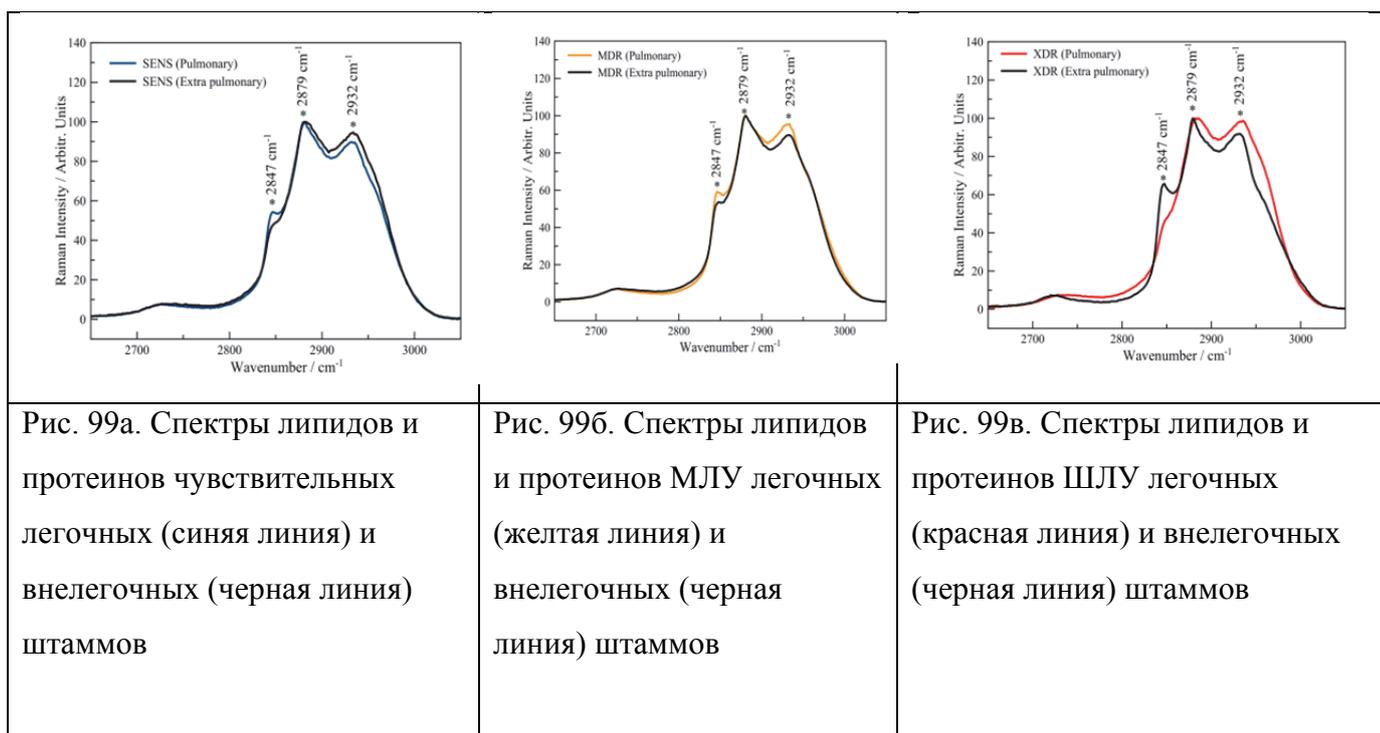
Методом спектроскопии комбинационного рассеяния света зарегистрированы и идентифицированы колебательные полосы, соответствующие компонентам микобактериальных клеток, в спектральной области высоких волновых чисел, в частности липидов и белков. Установлены различия в составе и структуре клеточной стенки между чувствительными и резистентными штаммами. Для асимметричных колебаний липидов и белков значительных изменений не выявлено, однако отмечено незначительное снижение интенсивности колебаний  $\text{CH}_2$ -групп белков, связанных с содержимым клеточного ядра. Штаммы лёгочных МЛУ демонстрируют максимальную интенсивность липидных полос, тогда как внелёгочные штаммы ШЛУ характеризуются высокой интенсивностью полос, отражающих состав ядерных структур клетки. Также, как и в вышеописанных данных для легочных штаммов в целом наблюдалось увеличение интенсивности спектральных компонент в сравнении ТБ-ЧВ и ШЛУ (где изменение было зарегистрировано), а во внелегочных штаммах наблюдалась противоположная картина. Данная информация может быть использована в качестве характерных маркеров для различения лекарственно-чувствительных, МЛУ и ШЛУ легочных и внелегочных штаммов МБТ. Для определения основных различий между различными штаммами туберкулеза легких и внелегочного туберкулеза следует отметить, что основное различие между штаммами туберкулеза легких и внелегочного туберкулеза заключается в интенсивности липидных спектральных максимумов при  $2847 \text{ cm}^{-1}$  и  $2932 \text{ cm}^{-1}$ . Данные результаты были опубликованы в работе [413].

Таблица 51. Колебательные частоты для легочных и внелегочных штаммов ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ в высокочастотной области

Легочные штаммы			Внелегочные штаммы			Колебательные моды
ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	
2847 m	2847 m	2847 mw	2847 m	2847 m	2847 ms	CH <sub>2</sub> симметричные валентные колебания в липидах
2879 s	2879 s	2879 s	2879 s	2879 s	2879 s	CH <sub>3</sub> ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах
2932 s	2932 s	2932 ms	2932 ms	2932 m	2932 ms	CH <sub>2</sub> ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах, относящиеся к внутриядерному содержанию

Где w-слабые колебания, m-средние колебания, s – интенсивные колебания, vs – очень интенсивные колебания, vw-очень слабые колебания, br – широкий максимум, sh-плечо.

В рамках выполнения данной работы были также анализированы спектры микобактерий в высокочастотной области для штаммов ТБ-ЧВ, ШЛУ, МЛУ в разрезе легочные/внелегочные для каждого вида антибиотикорезистентности. Рис. 99 отражает характерные максимумы для чувствительных штаммов микобактерий легочной



и внелегочной локализации. Интенсивность спектрального максимума  $2847\text{ см}^{-1}$  от легочного к внелегочному штамму уменьшается для чувствительных штаммов на 11% и увеличивается для штаммов МЛУ и ШЛУ на 11% и 28% соответственно. Для частоты колебаний  $2879\text{ см}^{-1}$  изменений интенсивности не наблюдалось. Для частоты спектрального сдвига  $2932\text{ см}^{-1}$  для ТБ-ЧВ и МЛУ штаммов наблюдался рост интенсивности от внелегочных к легочным образцам на 5% и 6% соответственно. В случае ШЛУ штамма отмечалось падение интенсивности от легочных к внелегочным штаммам на 5%.

Поскольку одной из потенциальных полос, характеризующих изменение антибиотикорезистентности был максимум на  $1171\text{ см}^{-1}$ , характерный для колебаний глутатиона, с применением КР-спектроскопии были проведены дополнительные исследования с использованием He-Ne лазера с длиной волны  $\lambda=632.8\text{ нм}$  для более детального изучения поведения спектральной картины в области  $1000\text{-}1500\text{ см}^{-1}$ . С применением КР и ГКР спектроскопии были анализированы полученные спектры бактериальных конгломератов размером  $5\times 5$  микрон, была определена спектральная картина для каждого штамма исследуемых микобактерий. Бактериальный конгломерат состоял из одного «монослоя» бактерий. Было отмечено изменение интенсивности колебания на  $1171\text{ см}^{-1}$ , характерного для колебательных групп глутатиона (GSH). Был проведен детальный анализ спектральной картины в области  $1000\text{-}1500\text{ см}^{-1}$  и сравнение с референтными штаммами.

Для легочных штаммов: ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ наблюдались характеристические колебания на величине спектральных сдвигов  $1076\text{ см}^{-1}$ ,  $1171\text{ см}^{-1}$ ,  $1255\text{ см}^{-1}$ ,  $1309\text{ см}^{-1}$ ,  $1369\text{ см}^{-1}$ , и  $1457\text{ см}^{-1}$ .

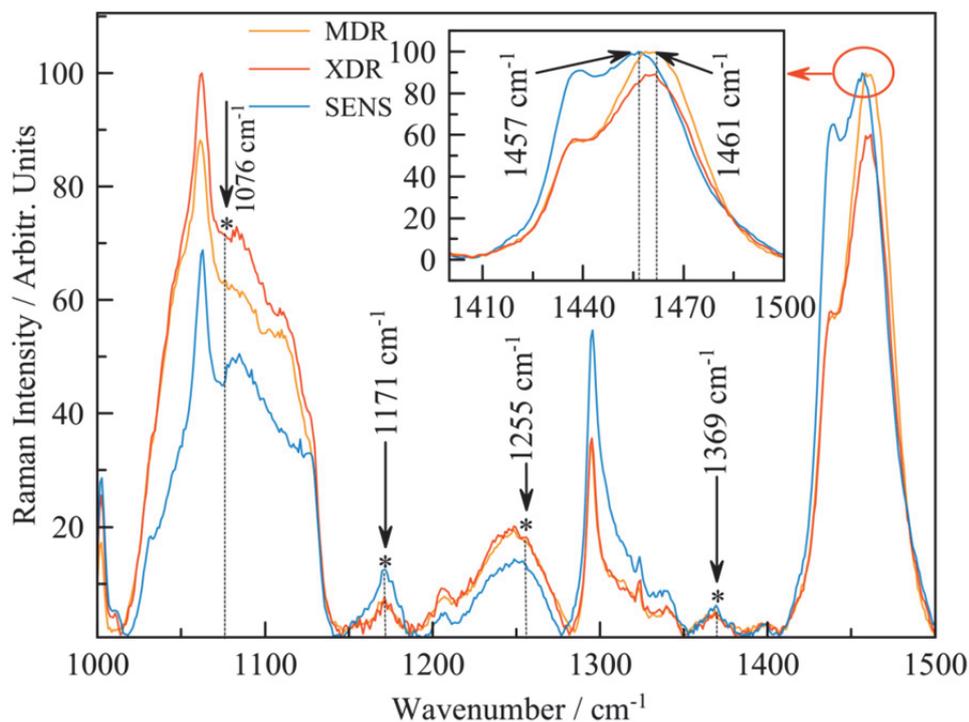


Рис. 100. спектры комбинационного рассеяния света для легочных штаммов с различной лекарственной резистентностью: голубая линия – ТБ-ЧВ, желтая линия – МЛУ, красная линия – ШЛУ.

Результаты анализа спектральных данных легочных штаммов были сведены в Таблицу 52. В ней были отражены положения спектральных максимумов для легочных штаммов микобактерий различной лекарственной устойчивости. Данные максимумы сравнивались с результатами теоретических расчетов структуры глутатиона в соответствии с [1]. Было показано изменение интенсивности анализируемых максимумов. Интенсивность увеличивалась для всех спектральных мод от ТБ-ЧВ к ХДР с положением максимума  $1076\text{ см}^{-1}$ ,  $1171\text{ см}^{-1}$ ,  $1255\text{ см}^{-1}$ ,  $1309\text{ см}^{-1}$ ,  $1369\text{ см}^{-1}$ ,  $1457\text{ см}^{-1}$ . Для ТБ-ЧВ штаммов изменения на спектральных максимумах  $1309\text{ см}^{-1}$  и  $1457\text{ см}^{-1}$  не детектировалась. Был отмечен рост интенсивности сигнала для всех штаммов в целом, однако для МЛУ штаммов спектральные максимумы проявлялись на величинах спектрального сдвига  $1076\text{ см}^{-1}$  и  $1369\text{ см}^{-1}$ .

Таблица 52. Спектральные характеристики легочных штаммов микобактерий туберкулеза. Жирным шрифтом выделены предполагаемые сигнатуры искомых частей клеточной стенки микобактерии

<b>ТБ-ЧВ</b>	<b>МЛУ</b>	<b>ШЛУ</b>	<b>Колебательные моды</b>
1076 w	1076 w	1076	$\nu(\text{N14-C15})(13)+\nu(\text{C10-C9})(21)+(\text{C10-H2})(13)+\sigma(\text{C10-S11-H31})(13)$
1171 w	-	1171 mw	$\nu(\text{O18-C8})(16)+\sigma(\text{H25-N7-C6})(10)+\gamma(\text{C6-H24})(11)$
1255 w	-	1255	$\nu(\text{O17-C16})(25) + (\text{C15-H2})(44)$
-	-	1309 w	$(\text{C5-H2})(36)+(\text{C10-H2})(13)$
1369 vw	1369 w	1369 mw	$(\text{C4-H2})(18)+(\text{C5-H2})(57)$
-	-	1457	$(\text{C4-H2})(24)+(\text{C5-H2})(66)$

Где w-слабые колебания, m-средние колебания, s – интенсивные колебания, vs – очень интенсивные колебания, vw-очень слабые колебания, br – широкий максимум, sh-плечо.

Для внелегочных штаммов микобактерий (Таблица 53) наблюдалась более сложная картина. Для ТБ-ЧВ и ШЛУ штаммов интенсивность уменьшалась для максимумов:  $1171\text{ см}^{-1}$ ,  $1255\text{ см}^{-1}$  и увеличивалась для  $1076\text{ см}^{-1}$ . Был отмечен незначительный синий сдвиг спектра на величину порядка  $3\text{ см}^{-1}$ , соответствующей предполагаемой конформации структуры молекулы глутатиона [360].

Таким образом, с помощью КР-спектроскопии был анализированы моды трипептида глутатиона, состоящего из L-цистеина, глицина и L-глутамата, который (или его составляющие) может являться потенциальным маркером антибиотикорезистентности к кислородосодержащим производным азота. Такие производные широко используются в составе широко распространенных противотуберкулезных препаратов, таких как индозилин и изониазид. Глутатион также может обеспечивать сопротивление клетки активным формам кислорода [361]. Основываясь на результатах теоретического моделирования для связей глутатиона полученные экспериментальные спектры были соотнесены с теоретическими расчетами. Основными критериями оценки были: положение спектрального максимума и его интенсивность. Поскольку известно, что глутатион играет важную роль в активации НК-клеток, это может приводить к смерти микобактерии. С другой стороны, микобактерия не синтезирует глутатион [362], но синтезирует субстанцию микотиол, структура которой сходна по строению к глутатиону. Также стоит отметить, что глутатион может встраиваться в состав клеточной стенки или быть прикрепленным к ней. С другой стороны глутатион может формировать соединение S-нитрозоглутатион, образующееся в процессе взаимодействия с NO (при терапии) на поверхности клеточной стенки. Как таковой S-нитрозоглутатион не может транспортироваться внутрь клетки, однако соединение S-nitroso-L-cysteinylglycine может проникать внутрь клетки через транспортные каналы, высвобождая затем NO, что приводит к смерти микобактерии [5] туберкулеза.

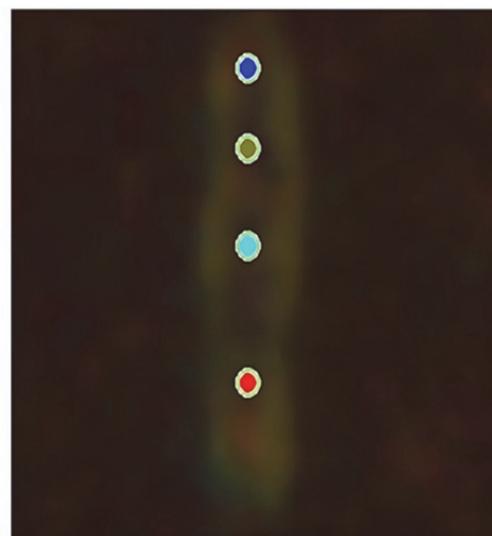
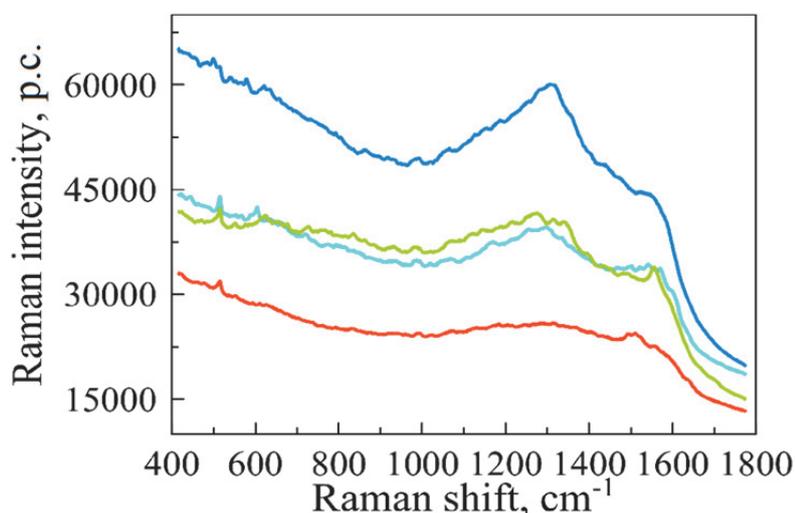
Таблица 53. Спектральные характеристики внелегочных штаммов микобактерий туберкулеза

<b>ТБ-ЧВ</b>	<b>МЛУ</b>	<b>ШЛУ</b>	<b>Колебательные моды</b>
1076 w	1076 w	1076	$\nu(\text{N14-C15})(13)+\nu(\text{C10-C9})(21)+(\text{C10-H2})(13)+\sigma(\text{C10-S11-H31})(13)$
1171 w	-	1171 mw	$\nu(\text{O18-C8})(16)+\sigma(\text{H25-N7-C6})(10)+\gamma(\text{C6-H24})(11)$
1255 w	-	1255	$\nu(\text{O17-C16})(25) + (\text{C15-H2})(44)$
-	-	1309 w	$(\text{C5-H2})(36)+(\text{C10-H2})(13)$
1369 vw	1369 w	1369 mw	$(\text{C4-H2})(18)+(\text{C5-H2})(57)$
-	-	1457	$(\text{C4-H2})(24)+(\text{C5-H2})(66)$

Интенсивность внелёгочных спектральных максимумов (Таблица 53) уже обсуждались выше и могут быть обусловлены содержанием миколовых кислот в микобактериях. В то же время различия в интенсивностях спектральных максимумов указывают на отличие спектральных характеристик лёгочных и внелёгочных штаммов, что может служить основой для распознавания внутривидовых бактериальных различий. Результаты исследований опубликованы в статье [363].

#### 4.3 Исследования внутриштаммовых различий одиночных клеток микобактерий туберкулеза различной резистентности штамма *Beijing*

Отдельным этапом работ являлось исследование с применением методик ГКРС единичных клеток микобактерий туберкулеза и проведение их спектрального картирования в разных точках клетки. Протокол пробоподготовки бактерий для проведения этих работ был модифицирован. С целью увеличения количества одиночных бактерий в субстрате, итоговая бактериальная масса ресуспендировалась 400 мкл воды вместо 100 мкл, а также итоговое центрифугирование проводилось в течение 5 минут вместо 10 минут. В процессе реализации работ было обнаружено, что единичный объект (клетка), помещенный на кварц не дает спектрального отклика, поэтому для производства работ была использована ГКРС-спектроскопия на кварцевых стеклах с нанесенными наностержнями, а также на коммерческих ГКР-активных структурах Silmесо (Дания), адаптированными под длину волны возбуждения  $\lambda=785$  нм. Все референтные и клинические штаммы были спектрально картированы. На рисунке 101 изображен пример необработанных спектров, получаемых с прибора.



(A)

(B)

Рисунок 101. Пример необработанных SERS-спектров клетки Mtb (A), снятых на подложках Silmесо («р.с.» означает количество фотонов, зарегистрированное прибором) и изображения бактерии при 100-кратном оптическом увеличении, на которое наложены точки, указывающие на местоположение спектральных измерений (B). Цвета спектральных кривых в (A) соответствуют цветам точек, обозначающих местоположение лазера (B).

На Рисунке 102 отображены картируемые бактериальные клетки на структуре Silmесо. Точками обозначены места позиционирования лазера в процессе съемки спектра, выбранные в процессе картирования на спектрометре Centerra. Время экспозиции для каждой точки составляло 70 секунд, мощность излучения составляла 50 мвт.

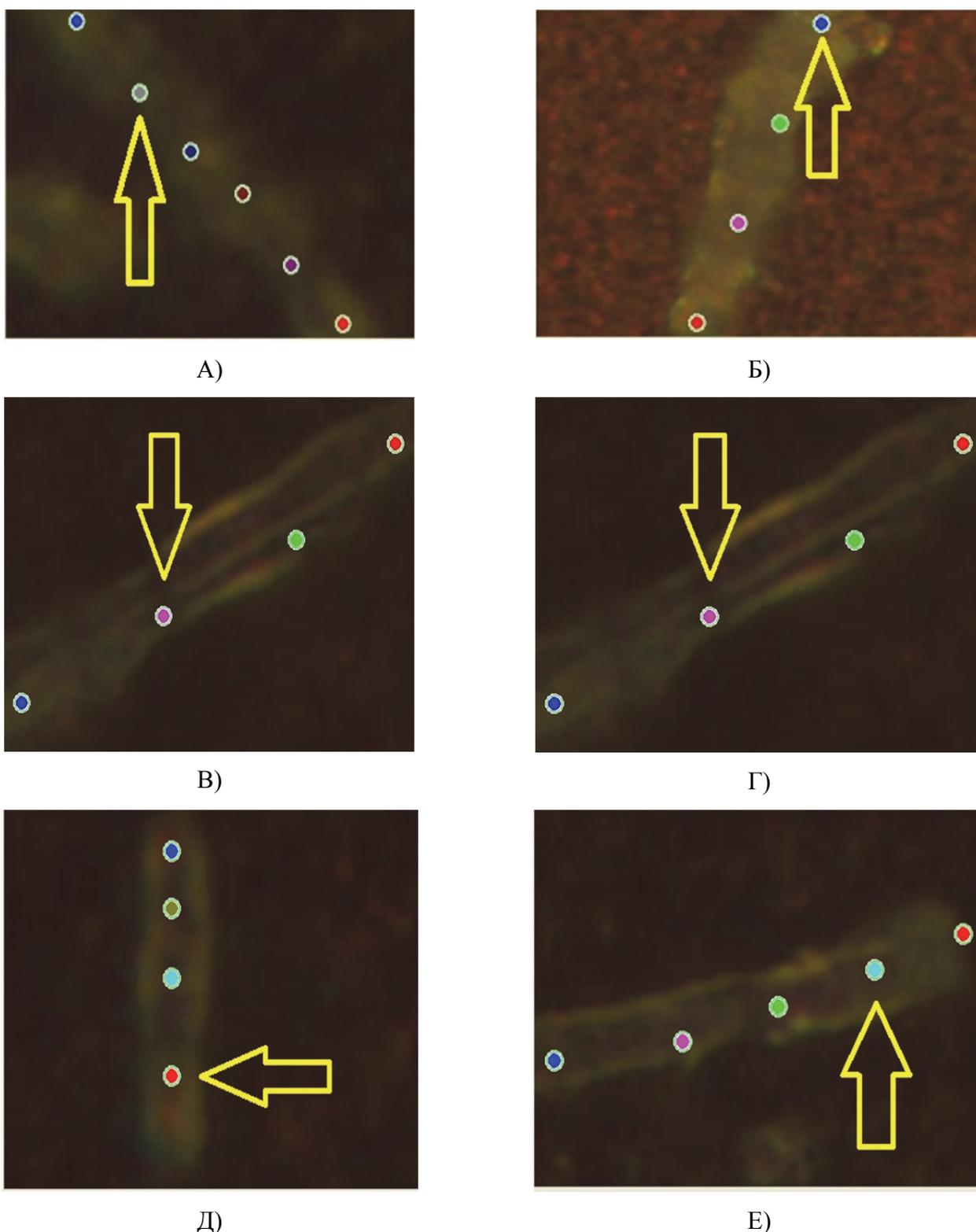


Рис. 102 100x оптические изображения единичных бактериальных клеток при реализации ГКР-картирования легочных и внелегочных ТБ-ЧВ (А,Б), МЛУ (В,Г) и ШЛУ (Д,Е) штаммов микобактерий туберкулеза. Стрелкой обозначено место позиционирования лазерного луча.

Спектры собирали от 3 до 6 точек от одной бактерии в диапазоне  $400 - 1800 \text{ см}^{-1}$ . Сначала все бактериальные спектры были проанализированы внутри одной клетки, затем, на следующем этапе было проведено их сравнение. Были зарегистрированы спектры от шести штаммов легочных и внелегочных микобактерий. В нашем анализе мы проанализировали три области спектров:  $400-1000 \text{ см}^{-1}$ ,  $1000-1400 \text{ см}^{-1}$ ,  $1400-1800 \text{ см}^{-1}$ . Рис. 103 (а,б) отражает обе области для легочных и внелегочных штаммов. На основании нашей предыдущей работы [364] стоит отметить, что среди областей, представляющих интерес, наиболее важным является спектральный диапазон  $720-1200 \text{ см}^{-1}$  в котором находятся, в том числе полосы, указывающие на сигнатуры метилирования ДНК. Ранее было отмечено [377], что метилирование ДНК играет роль в формировании устойчивости бактерий к антибиотикам. В частности, интенсивность спектральных полос при  $747 \text{ см}^{-1}$  и  $775 \text{ см}^{-1}$  соответствуют полосам тиминовых оснований в метилированной ДНК [378]. Второй пик тимина ( $747 \text{ см}^{-1}$ ) смещен в область  $775 \text{ см}^{-1}$  для штаммов ТБ-ЧВ (SENS). Что касается пиков, связанных с процессом метилирования, то стоит отметить, что максимум  $722 \text{ см}^{-1}$  соответствует межмолекулярным колебаниям ДНК/РНК и его интенсивность была выше у штаммов ШЛУ (XDR) по сравнению со штаммами МЛУ (MDR) и ТБ-ЧВ (рис. 135 (А)), что согласуется с предыдущими результатами [378]. Важно подчеркнуть, что пики в спектральном диапазоне  $742-747 \text{ см}^{-1}$ , наблюдаемые у штаммов МЛУ и ШЛУ, могут быть отнесены к тимину [378], но не были обнаружены у штаммов ТБ-ЧВ.

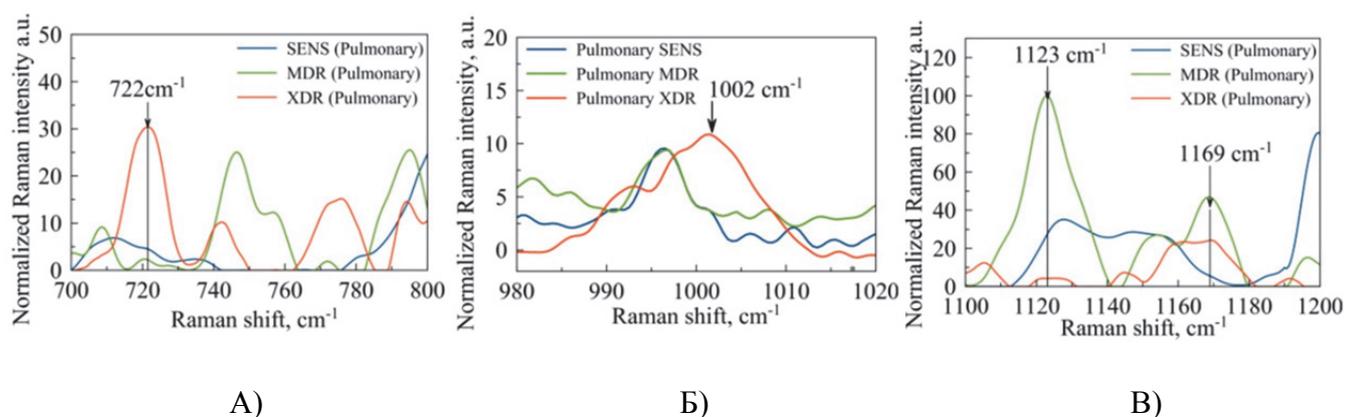


Рис. 103. Легочные штаммы микобактерий с различной антибиотикорезистентностью: ТБ-ЧВ (синяя линия), МЛУ (оранжевая линия), ШЛУ (красная линия). (А) идентифицированные максимумы в области  $700-800 \text{ см}^{-1}$ :  $722 \text{ см}^{-1}$  - пурин/пиримидин;  $747 \text{ см}^{-1}$  - тимин;  $772/776 \text{ см}^{-1}$  - цитозин/урацил; (Б) идентифицированный максимум  $1002 \text{ см}^{-1}$  - фенилаланин (В) идентифицированные максимумы в диапазоне  $1100-1200 \text{ см}^{-1}$  диапазон:  $1123 \text{ см}^{-1}$  - ДНК/РНК-основа;  $1169 \text{ см}^{-1}$  - глутатион.

В случае внелегочных образцов (Рис. 136 (А-В)), пик, соответствующий аденину [366] в штаммах МЛУ и ШЛУ может быть идентифицирован на частоте спектрального сдвига  $733 \text{ см}^{-1}$ , который незначительно сдвинут относительно пикового значения  $730 \text{ см}^{-1}$ , полученного в работе [366]. Для штаммов ТБ-ЧВ он может быть потенциально смещен к  $720 \text{ см}^{-1}$  или быть ближе к  $742 - 740 \text{ см}^{-1}$

(Рис. 104а). Второй диапазон 980-1020  $\text{cm}^{-1}$  представленный на Рис. 104б также представляет интерес с точки зрения как маркеров метилирования ДНК [366] в резистентности, так и фенилаланина, который является аминокислотой, играющей важную роль в метаболизме патогенов [379]. Кроме того, фенилаланин также участвует в регуляции экспрессии генов и факторов вирулентности у микобактерий туберкулеза. Поскольку пики фенилаланина, расположенные при 1002  $\text{cm}^{-1}$  [364] и 5-метилцистеина при 1005  $\text{cm}^{-1}$  [379] расположены довольно близко друг к другу, Как видно на рис. 103 (б), они могут перекрываться для штаммов с ШЛУ. Интересно, что для штаммов с МЛУ как и для чувствительных штаммов, эти пики имеют меньшую интенсивность и значительно смещены в синюю область. Что касается внелегочных штаммов, то, как показано на рис. 104 (б), характеристики пика фенилаланина идентичны для всех внелегочных штаммов.

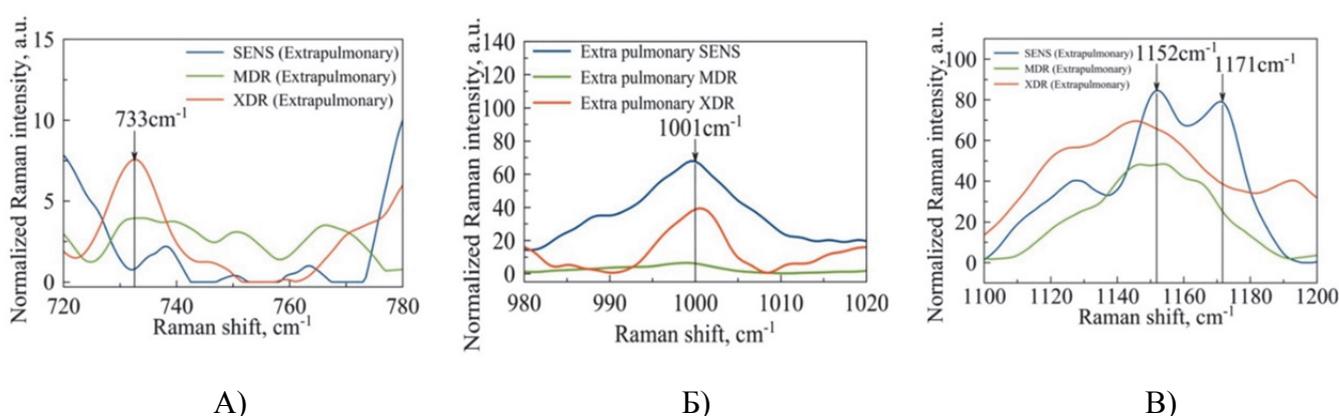


Рисунок 104. Внелегочные штаммы микобактерий с различной антибиотикорезистентностью: ТБ-ЧВ (SENS) (синяя линия), МЛУ (MDR) (оранжевая линия), ШЛУ (XDR) (красная линия). (А) идентифицированные максимумы в области 720-780  $\text{cm}^{-1}$ : 733  $\text{cm}^{-1}$  - аденин; (Б) идентифицированный максимум 1001  $\text{cm}^{-1}$  - фенилаланин (В) идентифицированные максимумы в 1100 -1200  $\text{cm}^{-1}$  диапазон: 1152  $\text{cm}^{-1}$  - N-H и C-H группы; 1171  $\text{cm}^{-1}$  - глутатион;

Другой заметной спектральной особенностью является линия рамановского спектра, расположенная в районе частоты 1170  $\text{cm}^{-1}$ . На рис. 104 (в) хорошо видно, что интенсивность этой полосы, расположенной на частоте 1169  $\text{cm}^{-1}$  близка к нулю для чувствительного штамма, но заметна для штаммов с устойчивостью к антибиотикам. Если рассматривать наши предыдущие результаты [363], то можно отметить, что эта полоса была связана с глутатионом (GSH), как соответствующая одной из основных спектральных линий [380] этой биомолекулы, участвующей в иммунном ответе хозяина на внешнее воздействие микобактерии [381]. Хотя микобактерии сами не синтезируют глутатион, его присутствие в клинических штаммах, полученных от может иметь экзогенную природу, поскольку микобактерия, в принципе, способна импортировать GSH в свой цитозоль, см. соответствующее обсуждение в работе [382]. Кроме того, в работе указывается, что GSH токсичен для микобактерий, но можно ожидать, что штаммы ШЛУ могут не испытывать его токсическое действия при высоких концентрациях GSH. Регистрация спектра ГКРС в настоящей

работе, позволяет обнаружить метилирование ДНК, и позволяет утверждать, что и другие внутриклеточные компоненты могут влиять на спектр комбинационного рассеяния света. Стоит также отметить, что микобактерия может синтезировать собственный функциональный аналог GSH, микотиол (MSH), защищающий бактерию от стрессового воздействия, в том числе лекарственного. Исследование ГКРС [383] N-ацетил-цистеина, который является одним из компонентов микотиола и показывает наличие полосы моды  $\delta C_{\alpha}H$  на частоте  $1179 \text{ cm}^{-1}$ , расположенной не так далеко от обсуждаемой полосы GSH's. Таким образом, не следует не учитывать и возможность альтернативного или комбинированного происхождения резистентно-индикаторного поведения рассматриваемой спектральной полосы. Стоит отметить, что в случае внелегочных штаммах наблюдается более сложная картина, чем в штаммах легочной локализации. Плечо метильной группы ДНК ( $733 \text{ cm}^{-1}$ ) экспрессируется и снижается от ШЛУ к ТБ-ЧВ, тогда как максимум глутатиона при  $1171 \text{ cm}^{-1}$  снижается от ТБ-ЧВ к ШЛУ. Основываясь на [366] ШЛУ штаммы могут быть зарегистрированы с помощью ГКРС методик. Кроме того, множество молекулярной информации о геномной ДНК позволило получить две спектральные характеристики ГКРС (полосы ГКРС при  $730 \text{ cm}^{-1}$ ,  $747 \text{ cm}^{-1}$  и  $1171 \text{ cm}^{-1}$ ). Мы идентифицировали спектральные биомаркеры и  $730 \text{ cm}^{-1}$ ,  $747 \text{ cm}^{-1}$  и биомаркер GSH при  $1170 \text{ cm}^{-1}$ . По результатам спектрального картирования были получены спектральные картины для микобактерий всей штаммов. Эффективный коэффициент усиления КРС был увеличен благодаря дальнейшему совершенствованию сред ГКРС и составил  $10^3 - 10^5$  раз. Основываясь на уже полученных данных для бактериальных конгломераций, спектры были анализированы в области частотных сдвигов, характеризующих основные спектральные биомаркеры изменений. Стоит отметить, что, несмотря на то, что повторяемость спектральных данных для единичных клеток была хуже, чем для бактериальных конгломераций, удалось зарегистрировать вышеописанные колебательные полосы и провести их спектральный анализ.

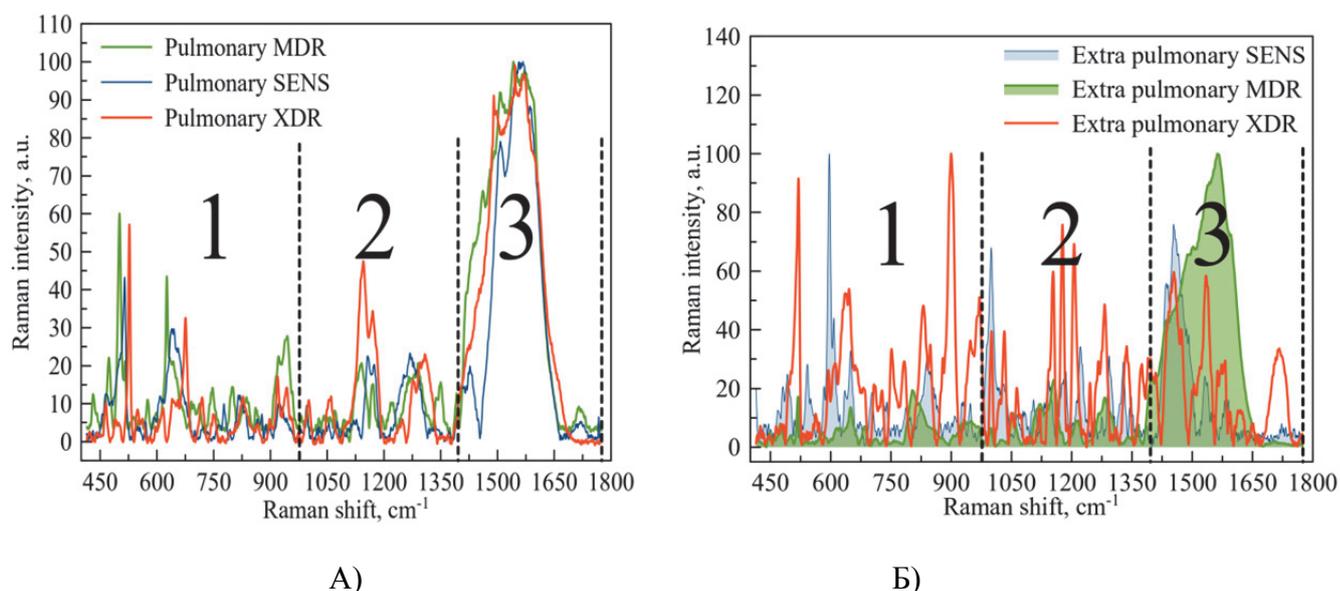


Рис. 105. Пример легочных (а) и внелегочных (б) штаммов МбТ с разной антибиотикорезистентностью: ТБ-ЧВ – синяя линия, МЛУ – зеленая линия, ШЛУ – красная линия.

Рисунок 105 отражает спектры комбинационного рассеяния света для легочных штаммов одиночных микобактерий с различной лекарственной резистентностью: голубая линия – ТБ-ЧВ, желтая линия – МЛУ, красная линия – ШЛУ. Были анализированы колебательные полосы на частотах  $640\text{ см}^{-1}$ ,  $676\text{ см}^{-1}$ ,  $922\text{ см}^{-1}$ ,  $1062\text{ см}^{-1}$ ,  $1171\text{ см}^{-1}$ . Для колебательной моды, характерной для GSH с частотой  $1171\text{ см}^{-1}$  было отмечено что интенсивность данной моды для ШЛУ и МЛУ штаммов всегда были выше, чем для референтных штаммов и штаммов ТБ-ЧВ. Однако, детектируемая интенсивность колебательных максимумов варьировалась в зависимости от места локализации лазерного луча на бактерии, но интенсивность для МЛУ и ШЛУ штаммов была выше, чем для ТБ-ЧВ. Для образцов МЛУ была детектирована максимальная интенсивность. Отдельно стоит отметить, что для ШЛУ штамма был детектирован отчетливый максимум тирозина (Tyr) ( $676\text{ см}^{-1}$ ), тогда как для одиночных клеток ШЛУ и ТБ-ЧВ он не детектировался. Колебательный максимум, соответствующий частоте колебаний фосфолипидов на частоте  $920\text{--}922\text{ см}^{-1}$  детектировался максимальным для МЛУ штамма, тогда как максимум для миколовых кислот

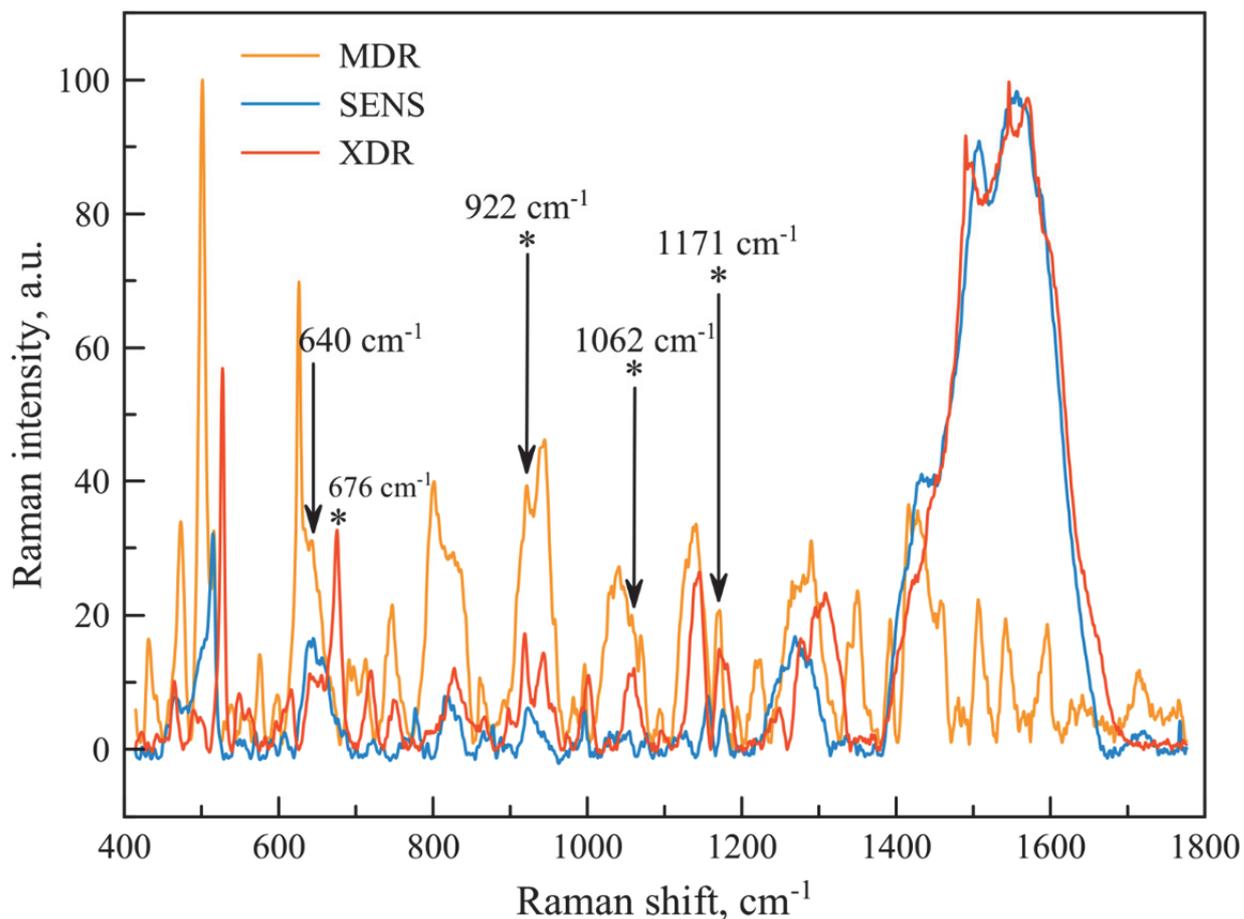


Рис. 106. Спектры комбинационного рассеяния света для легочных штаммов одиночных микобактерий с различной лекарственной резистентностью: голубая линия – ТБ-ЧВ, желтая линия – МЛУ, красная линия – ШЛУ.

детектировался максимальным для ШЛУ (Рис. 106, Таблица 54). Стоит отметить, для единичных клеток наблюдались отличия в спектрах, полученных от различных частей микобактерии.

Таблица 54. Колебательные частоты для легочных штаммов единичных микобактерий для ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ. Жирным шрифтом выделены предполагаемые сигнатуры искомым частей клеточной стенки микобактерии

(ТБ-ЧВ)	(МЛУ)	(ШЛУ)	Колебательные моды	Литературная ссылка
640 v	640 v	640 m	Скелетные (C-C) ( <b>пептидогликан</b> )	367
-	-	676 m	Тирозин	368
921 w	921 mw	922 m	$\nu$ (CHR <sub>2</sub> ) C-C скелетн. str. где R $\neq$ CH <sub>3</sub> ( <b>фосфолипиды</b> )	369
1059 w	1061 mw	1062 mw	C-C,C-N ( <b>Возможный профиль миколовых кислот</b> )	370
1170 w	1171 mw	1171 mw	Глутатион	371

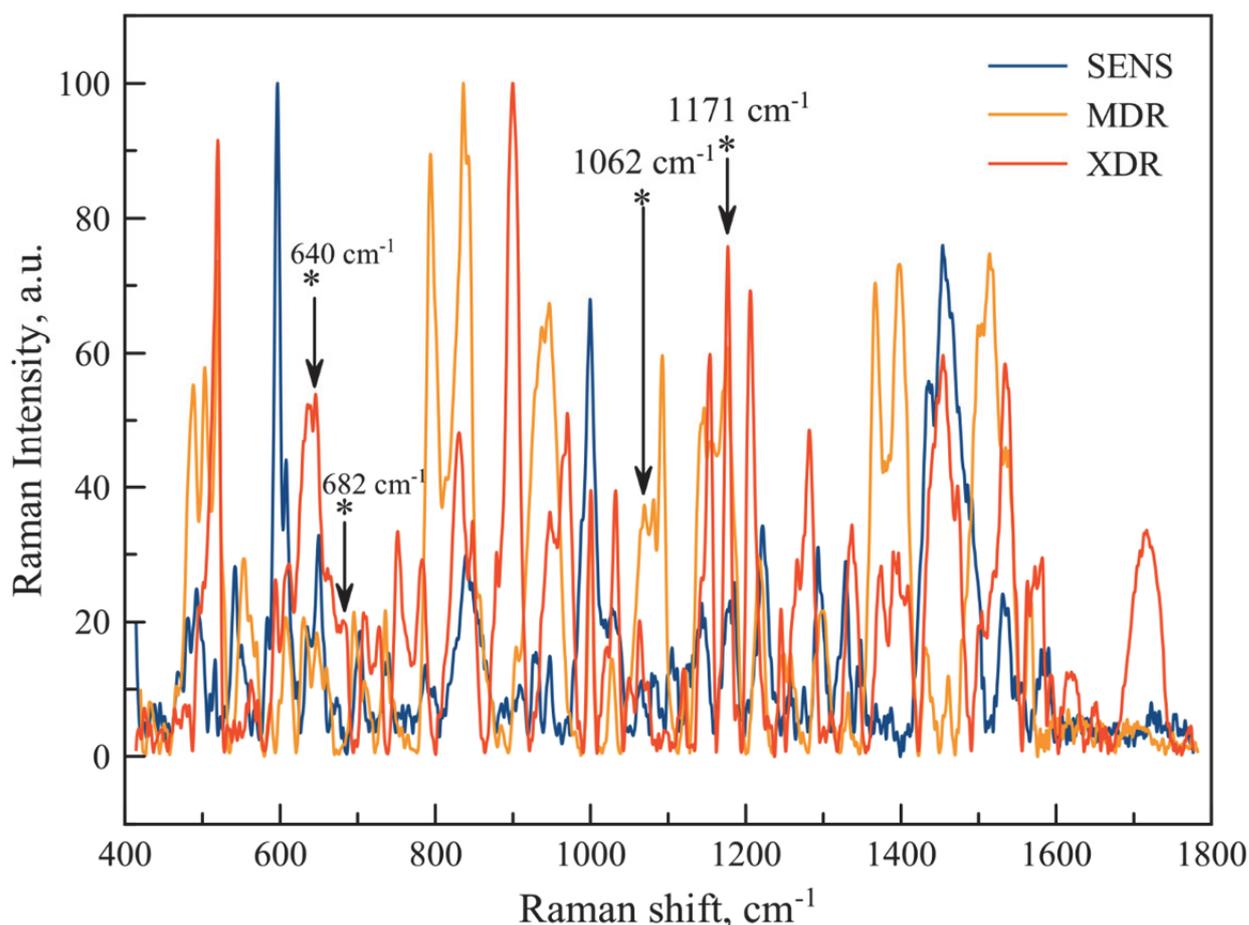


Рис. 107. Спектры комбинационного рассеяния света для внелегочных штаммов одиночных микобактерий с различной лекарственной резистентностью: голубая линия – ТБ-ЧВ, желтая линия – МЛУ, красная линия – ШЛУ.

Для внелегочных штаммов (Рис. 107, Таблица 55) наблюдалась более комплексная картина с большим количеством колебательных максимумов. Как и в случае с единичными бактериями легочных штаммов, анализ проводился по выявленным ранее потенциальным биомаркерам антибиотикорезистентности. Для колебательной моды GSH было детектировано увеличение интенсивности колебательной моды от ТБ-ЧВ к ШЛУ, что соответствует поведению данной моды

для случая легочных бактериальных конгломераций. Такое поведение может быть связано с различием содержания GSH или производных в различных частях бактерии. Колебательные моды с частотой  $1060 \text{ см}^{-1}$ , относящиеся к профилю миколовых кислот имеют наименьшую интенсивность для ТБ-ЧВ штаммов. В целом, для единичных микобактерий было выявлено большее количество колебательных мод, но при этом высокие достигнутые достаточно высокие коэффициенты ГКРС понизили повторяемость спектральных получаемых спектральных данных. Несмотря на это, наблюдается корреляция результатов со спектральной съемкой бактериальных конгломераций.

Таблица 55. Колебательные частоты для внелегочных штаммов единичных микобактерий для ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ. Жирным шрифтом выделены предполагаемые сигнатуры искомым частей клеточной стенки микобактерии

(ТБ-ЧВ)	(МЛУ)	(ШЛУ)	Колебательные моды	Литературная ссылка
640 w	640 m	640 s	Скелетные (С-С) ( <b>пептидогликан</b> )	367
1060 w	1061 w	1062 m	С-С,С-N ( <b>Возможный профиль миколовых кислот</b> )	370
1168 w	1170 ms	1170 s	Глутатион	372

В бактериальных популяциях или конгломератах были ранее обнаружены колебательные моды, связанные с основой ДНК и РНК, при частотном сдвиге  $1123 \text{ см}^{-1}$ , которые были также идентифицированы в [384] для МЛУ легочных штаммов. Пики КРС, расположенные в позиции сдвига  $1152 \text{ см}^{-1}$  колебания, характерные для клеточной стенки, плоскостные N-H, C-N также были идентифицированы [385] для чувствительных внелегочных штаммов. Отдельно стоит отметить, что колебания, соответствующие пуринам и пиримидинам ДНК при  $722 \text{ см}^{-1}$  были успешно идентифицированы в [364] для легочных штаммов ШЛУ. Полосы цитозина и урацила при  $772/776 \text{ см}^{-1}$  были обнаружены ранее в работе [364] для легочных штаммов ШЛУ. Следует отметить, что пики пиримидиновых и пуриновых оснований, а также отдельных оснований, связанных с ДНК, проявляются в основном у штаммов с МЛУ и ШЛУ и полностью отсутствуют у чувствительных штаммов. Этот факт требует дальнейшего и более детального рассмотрения, например, выявления особенностей метаболизма таких микобактерий.

Однако другой маркер тимина в ДНК был обнаружен для отдельных бактерий при длине волны  $747 \text{ см}^{-1}$  что характерно для легочных штаммов с МЛУ. Тем не менее, подробная информация о специфических маркерных пиках может быть получена и на отдельных бактериях, в нашем случае, более подробная спектральная информация о различиях между штаммами была получена на конгломератах. В принципе, различия между конгломератами и отдельными бактериями основаны на гетерогенности изучаемой культуры. При изучении конгломератов определяются средние значения пиков молекулярной структуры в то время как в отдельных бактериях отдельные пики могут быть не обнаружены или быть сильно смещены в зависимости от

состояния культуры. в зависимости от состояния самой клетки, в частности от ее «возраста» (стадии роста). Тем не менее, перекрывающиеся пики фенилаланина и 5-метилцитозина, обнаруженные у штаммов XDR легких, которые совпадают с конгломератами [364] и могут служить маркерами для штаммов с высокой лекарственной устойчивостью. Следует отметить, что внимание к возможной взаимосвязи между 5-метилцитозином и лекарственной устойчивостью как вовлеченного в процесс метилирования определенных остатков цитозина, было обращено уже давно [386], и в настоящее время рассматривается как один из перспективных маркеров метилирования которые могут быть обнаружены с помощью рамановской спектроскопии [387, 388]. Что касается случая микобактерий туберкулеза, эпигенетический механизм, который играет важную роль в метилировании ДНК, опосредованном 5-метилцитозин был недавно проанализирован с помощью анализа мотивов метилирования, проведенного [389] и с помощью метаболомного отслеживания [390]. Таким образом, наши результаты подтверждают эту интерпретацию с результатами, которые могут быть получены с помощью более простых приборов.

Основные результаты данной работы заключаются в демонстрации возможности применения спектроскопии КРС и ГКРС для различения лекарственно-чувствительных и лекарственно-устойчивых, путем настройки пространственной регистрации сигнала поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния соответственно клетке бактерии . Количество пробных мест, как показано на примере диодного лазера с длиной волны 785 нм и деактивированных штаммов *M. tuberculosis* штаммов, принадлежащих к семейству Beijing, может достигать шести отдельных точек. Исследование области «отпечатка пальца» 400 - 1800  $\text{см}^{-1}$  позволило идентифицировать спектральные полосы 730  $\text{см}^{-1}$ , 747  $\text{см}^{-1}$ , и 1170 $\pm$ 2  $\text{см}^{-1}$  как наиболее перспективные для использования в качестве биомаркеров лекарственной устойчивости. Первые две связаны с паттернами метилирования ДНК, включающими 5-метилцитозин и метилированную тиминовой группы. Последняя полоса, как считается, соответствует типичной КРС полосе, известной для глутатиона, который участвует в иммунном ответе на микобактерии и известен как привлекательная мишень для SERS-анализа, как показано в работе Ma и Huang (2015). Соответствующие спектральные максимумы были выявлены при 1169  $\pm$  2  $\text{см}^{-1}$  или при 1171  $\pm$  2  $\text{см}^{-1}$  чрезвычайно хорошо выражены в случаях легочных и внелегочных штаммов XDR. В то же время этот очевидный биомаркер может быть также связан с микобактериальным аналогом глутатиона, микотиолом, и этот факт открывает перспективы для будущих SERS-исследований этого специфического для микобактерий соединения.

#### 4.4 Создание спектральной библиотеки штаммов микобактерий туберкулеза референсных и клинических штаммов

В рамках подготовки диссертации была создана спектральная библиотека штаммов микобактерий МоноЛУ, ПолиЛУ, МЛУ, ШЛУ, а также были отсняты референтные штаммы H37Rv (USA, Prague), H37Ra, Erdman (Рис. 140). Полученные спектральные картины для всех штаммов приведены ниже. Каждый спектр представляет собой усредненный по 100 спектрам, полученный в результате спектральной съемки. Спектральные спектры библиотеки приведены без коррекции и фильтрации, в таком виде, в каком они были получены с приборов.

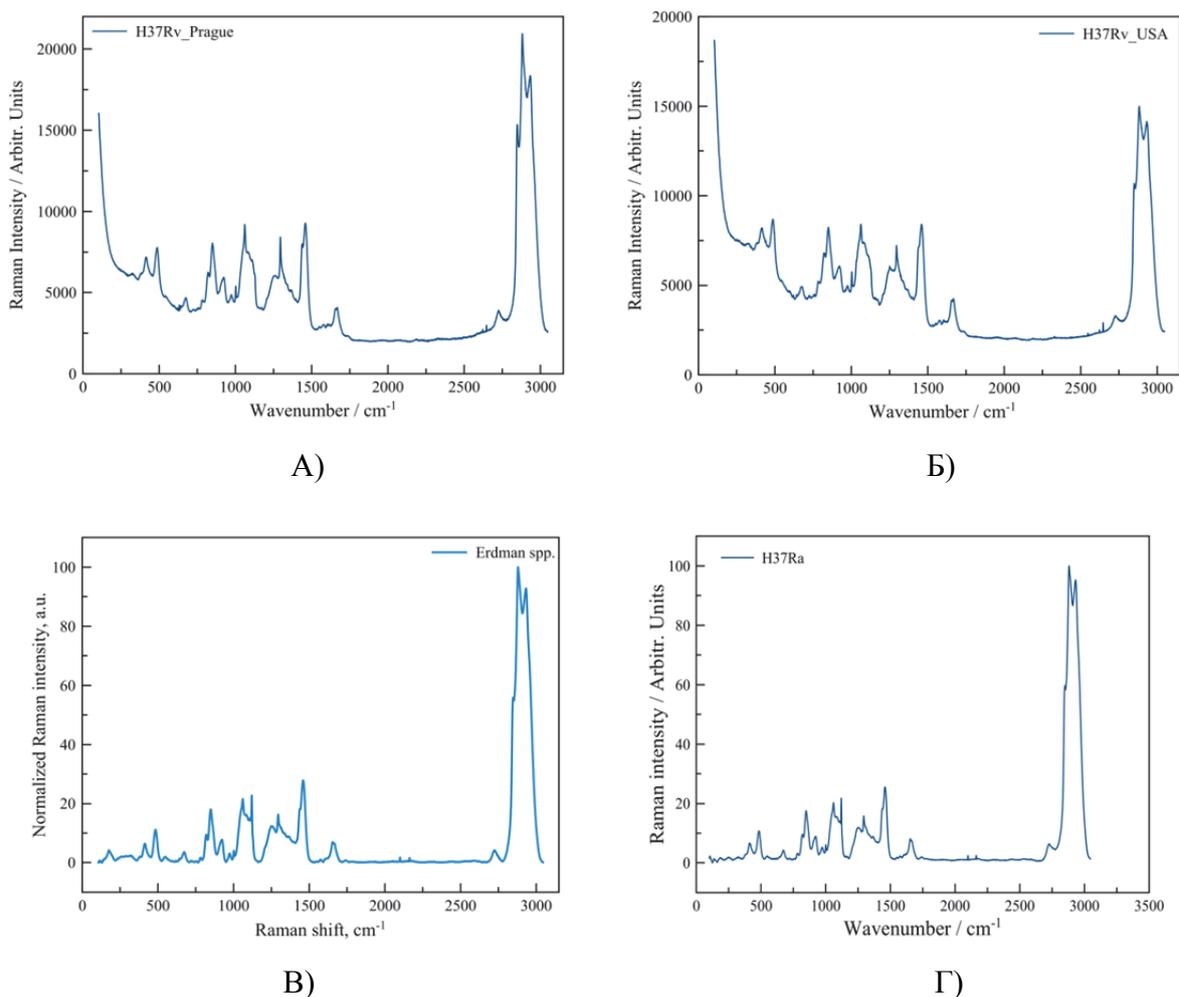
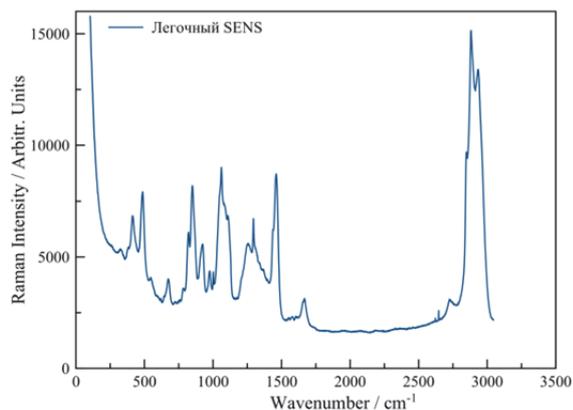
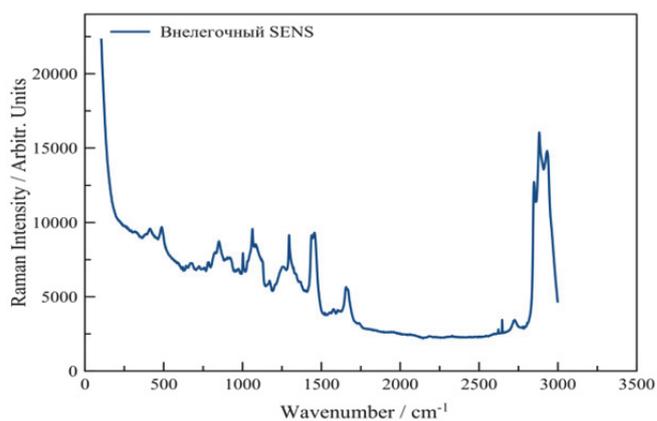


Рис. 108. Спектральные картины референсных штаммов H37Rv\_Prague (А), H37Rv\_USA (Б), Erdmann (В), H37Ra (Г).

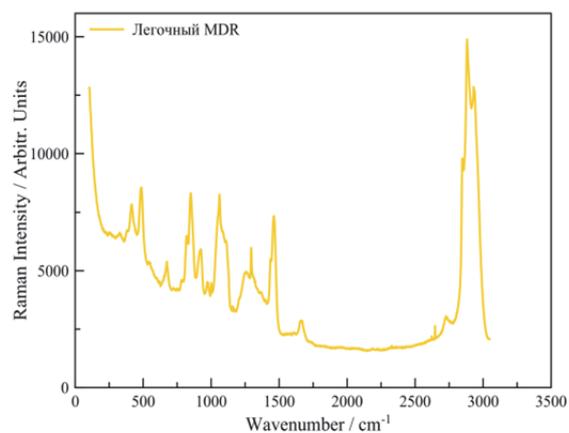
Также были зарегистрированы библиотеки штаммов с различной антибиотикорезистентностью, для образцов легочной и внелегочной локализации. (Рис. 109).



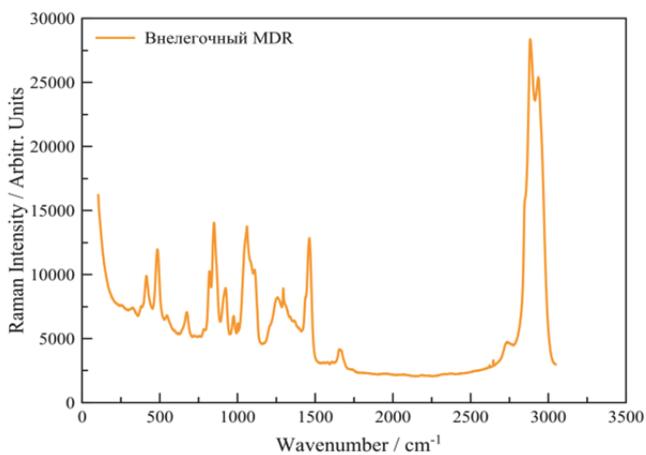
А)



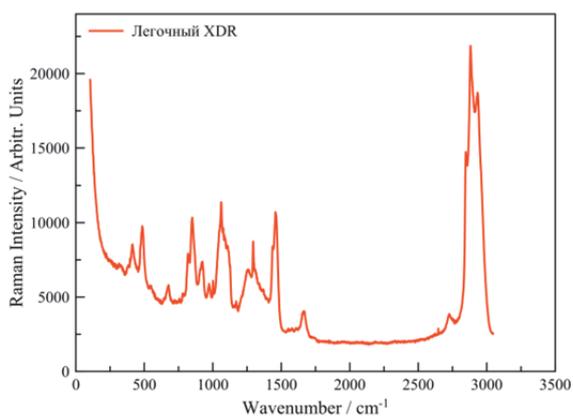
Б)



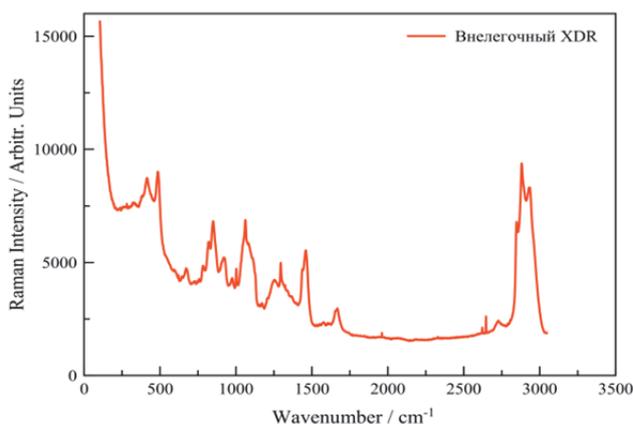
В)



Г)



Д)



Е)

Рис. 109. Спектральные картины референсных штаммов для легочных штаммов микобактерий ТБ-ЧВ (А), МЛУ (В), ШЛУ (Д) и внелегочных ТБ-ЧВ (Б), МЛУ (Г), ШЛУ (Е).

Таким образом, по результатам выполненной работы были выявлены характерные спектральные особенности воздействия антибиотиков на чувствительный штамм *E. coli* для ароматических соединений, формирующих бактериальную стенку. Бактерии *E. coli* широко используются для производства L-фенилаланина и других ароматических соединений, являясь

простым и изученным организмом с преимуществами четкого генетического фона и возможностью простых генетических манипуляций, а также быстрого роста в дешевых средах. По этой причине на них и были успешно отработаны подходы ГКРС для регистрации и интерпретации изменений в клеточной стенке. Было установлено, что для нуклеиновых кислот наблюдался сдвиг максимумов в низкочастном диапазоне спектрального сдвига, а также уменьшение интенсивности максимумов нуклеиновых кислот, белковых полос. По результатам исследований основным маркером клеточной гибели была выделена и являлась полоса фенилаланина на частоте обратного сдвига  $1003\text{ см}^{-1}$ , связанного с жизненным циклом клетки. Проведена идентификация спектральных мод, наблюдаемых в усредненном спектре. Также показано уменьшение интенсивности спектральных полос, относящихся к концентрации пуриновых метаболитов и аминокислот (фенилаланин), что указывает на инактивацию жизнедеятельности бактерий и свидетельствует об эффективной антибактериальной активности антибиотика. По результатам исследования установлено, что маркером клеточной гибели может являться полоса фенилаланина на частоте обратного сдвига  $1003\text{ см}^{-1}$ . Данные опубликованы в статье [450].

Касательно микобактерий, стоит подчеркнуть, что предложенный метод ГКРС имеет определенные преимущества перед традиционными подходами, используемыми для установления соответствия между статусом лекарственной устойчивости и фенотипом *M. tuberculosis*. В частности, он открывает перспективы для изучения фундаментального вопроса о том, какие особенности молекулярной архитектуры клетки могут быть выбраны в качестве потенциальных мишеней для разработки новых лекарств, направленных на борьбу с возникающей лекарственной устойчивостью. Подводя итог, можно сделать вывод, что SERS-измерения, которые характеризуются высокой скоростью и точностью, могут быть очень эффективным инструментом для фундаментальных биофизических исследований молекулярной биофизики микобактериальных клеток. Кроме того, поскольку соответствующая экспериментальная процедура занимает менее один час, он также может найти клиническое применение, когда требуется быстрое определение характеристик образца, поскольку традиционные процедуры, как правило, требуют нескольких дней. Такие молекулярные методы, как различные типы количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени, см., например, обзоры [384-385], направлены, прежде всего, на выяснение генетического происхождения устойчивости к конкретным препаратам с известным механизмом действия. Одновременно появляются данные о том, что одним из критических факторов, препятствующих эффективности лекарств, является утолщение клеточной стенки бактерий, сопровождающееся изменениями в ее молекулярном составе. Эти изменения могут возникать в ответ на взаимодействие с окружающей средой: подробный обзор последних данных можно найти в современных публикациях [386, 387]. В этом случае необходимы методы физической химии, которые напрямую оперируют особенностями молекулярной реологии [388].

ГКРС единичных клеток является естественным выбором для достижения этой цели, поскольку он изначально работает с конкретными колебаниями молекулярных связей и позволяет охарактеризовать эффекты молекулярной упаковки и пространственной локализации специфических маркеров. Помимо фундаментального значения, этот подход позволит охарактеризовать конкретные бактерии, выделенные из образцов пациентов в клинических условиях. В то же время представленные результаты, представляющие собой пилотное исследование, имеют некоторые ограничения. Хотя мы получили выборку данных из разных мест на поверхности одной клетки, сравнительный анализ спектральных характеристик ГКРС, относящихся к каждому конкретному месту, остается задачей будущих работ, в которых будет использована, например, стратегии, рассмотренной для других типов зондов в работе [389]. Кроме того, необходимо учитывать, что одна молекула демонстрирует несколько спектральных линий комбинационного рассеяния на разных частотах. На данный момент мы оперировали в основном наиболее выраженными линиями для каждого маркерного соединения. Поэтому в будущих исследованиях интересно усовершенствовать анализ, оперируя наборами характерных линий соединения одновременно. характерных линий одновременно. Наконец, такие идентификации могут быть в дальнейшем сопоставлены с результатами молекулярного моделирования. Результаты по исследованию единичных клеток опубликованы в статьях [415, 416].

## ГЛАВА 5. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СПЕКТРОВ КОМБИНАЦИОННОГО И ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА ЭЛЕМЕНТОВ РЕЦЕПТОРОВ ТРОМБОЦИТОВ И КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК МИКОБАКТЕРИЙ

### 5.1. Расчет спектров комбинационного рассеяния света элементов рецепторов тромбоцитов при связывании их с лекарственными препаратами.

Последним этапом работы была осуществлена проверка гипотезы об использовании подходов квантово-механического моделирования биомаркеров ответа на антиагрегантную терапию. Для этого была выбрана часть рецептора циклооксигеназы COX-1, а также часть рецептора ЦОГ-1 тромбоцитов. Проверялась гипотеза выделения биомаркеров образования связей между частью фермента/рецептора и аспирином/клопидогрелем и расчет соответствующих колебательных полос. Для этого, первым этапом был осуществлена молекулярная стыковка, которую осуществляли с использованием программной платформы Molecular Operating Environment (МОЕ) 2014. В данной среде были определены сайты связывания лиганда и рецептор для дальнейшего моделирования. Для дальнейших расчетов использовался пакет программ Gaussian. Стыковку осуществляли на рецепторах P2Y12 и ЦОГ-1 тромбоцитов. Его структуры были получены из банка данных белков Protein Data Bank (PDB). Мишенью для ЦОГ-1 был выбран аспирин, мишенью P2Y12 был выбран активный тиольный метаболит клопидогреля. Структуры лигандов получены из онлайн-библиотек DrugBank и PubChem. Перед проведением процедур молекулярного докинга были подготовлены рецепторы тромбоцитов. Аминокислотную последовательность рецептора тромбоцитов человека P2Y12 (PDB: 4NTJ) использовали в качестве последовательности запроса для поиска моделей гомологов с известными структурами из банка данных белков (PDB), а сходство белков оценивали с помощью NCBI-BLAST14. Для гомологического моделирования был выбран аналогичный человеческий белок P2Y12 (PDB: 4PZX), чтобы восполнить артефакты и пробелы в кристаллической структуре белка. Трехмерная модель рецептора человека была создана с помощью программы MODELER (версия 10.2). Для ЦОГ-1 (PDB: 6Y3C) гомологическое моделирование не проводилось. Далее белки минимизировали сначала в газовой фазе, а затем с помощью растворителя, используя силовое поле MMFF94x, для получения наиболее стабильной конформации. После этого был проведен молекулярный докинг белка/фермента и препарата. Далее, для расчета теоретических спектров использовался программный пакет Gaussian 16 (номер лицензии: G64284555249899W-6922N) использовался для расчета теоретических спектров комбинационного рассеяния света. Спектры комбинационного рассеяния были получены методом DFT с использованием выбранного функционала (B3LYP)16 на основе оптимизированных молекулярных структур. В качестве базисного набора был выбран бивалентный базовый набор с расщепленной валентностью 6-31G(d). Перед теоретическими расчетами анализируемые структуры подвергались энергетической минимизации в программном

комплексе МОЕ. По результатам молекулярного докинга математически были получены колебательные спектры областей взаимодействия рецепторов тромбоцитов P2Y12 и циклооксигеназы-1 (цвиттер-ионные формы аминокислот) и метаболитов препаратов, ингибирующих рецепторы (тиоловый метаболит клопидогреля H4 и аспирин соответственно). рассчитано. Для получения более точных теоретических результатов было проведено линейное масштабирование волновых чисел. В качестве критерия оценки качества расчета частот колебаний проводилось линейное масштабирование волновых чисел по методике, описанной в статье [375]. На рисунках 110 и 111 представлены данные теоретического расчета спектров КРС для связывания аргинина и тиоловый метаболит клопидогреля H4 и аспирина соответственно.

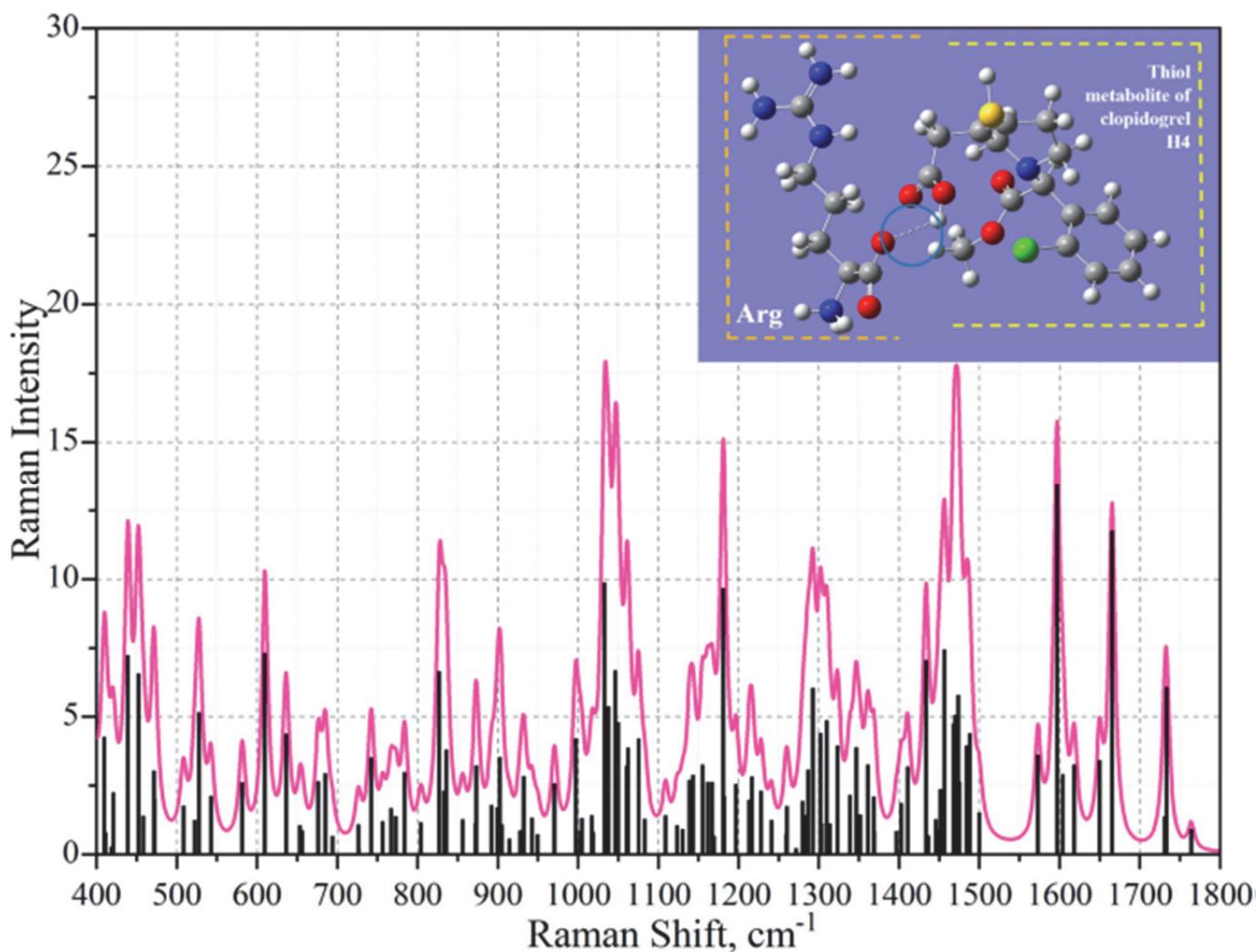


Рис 110. Теоретические спектры комбинационного рассеяния света для тиолового метаболита клопидогреля и аргинина после регулировки частоты. Результаты сопоставления теоретических данных с экспериментальными данными.

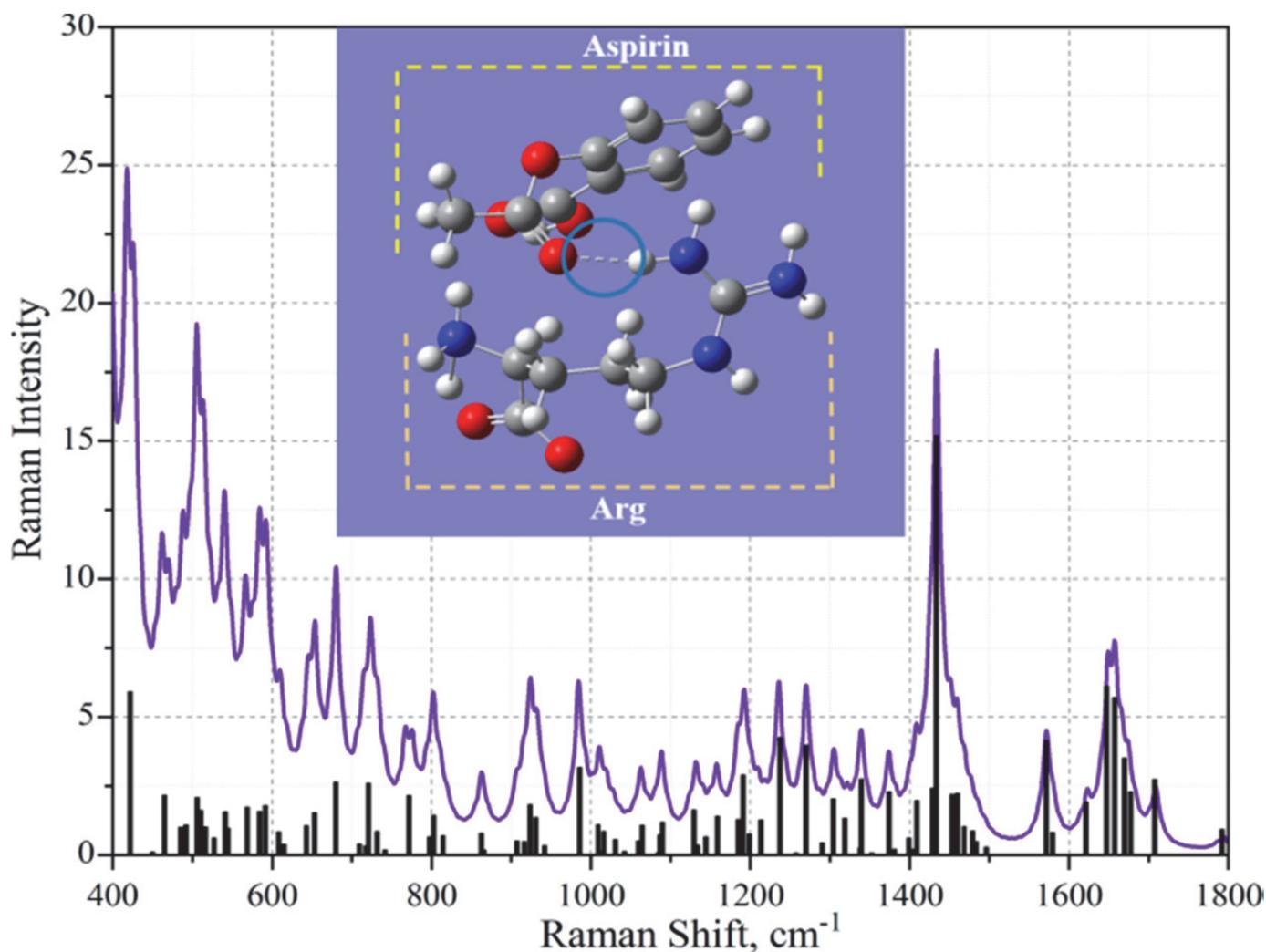


Рис 111. Теоретические спектры комбинационного рассеяния аспирина и аргинина после регулировки частоты. Результаты сопоставления теоретических данных с экспериментальными данными.

Далее проводилось сравнение результатов теоретического анализа данных и ранее полученных спектров ГКРС. Экспериментальные спектры ГКРС были получены от тромбоцитов здоровых добровольцев, здорового добровольца во время терапии клопидогрелом и здоровых добровольцев во время терапии аспирином. Для корректного сравнения полученных результатов был проведен анализ трех групп тромбоцитов от одного пациента. Рассчитанные колебательные полосы использовались для корреляции полученных экспериментальных данных с теоретическими. На Рис. 112 представлены спектры комбинационного рассеяния света для трех групп здоровых пациентов: на терапии аспирином, на терапии клопидогрелом и без терапии.

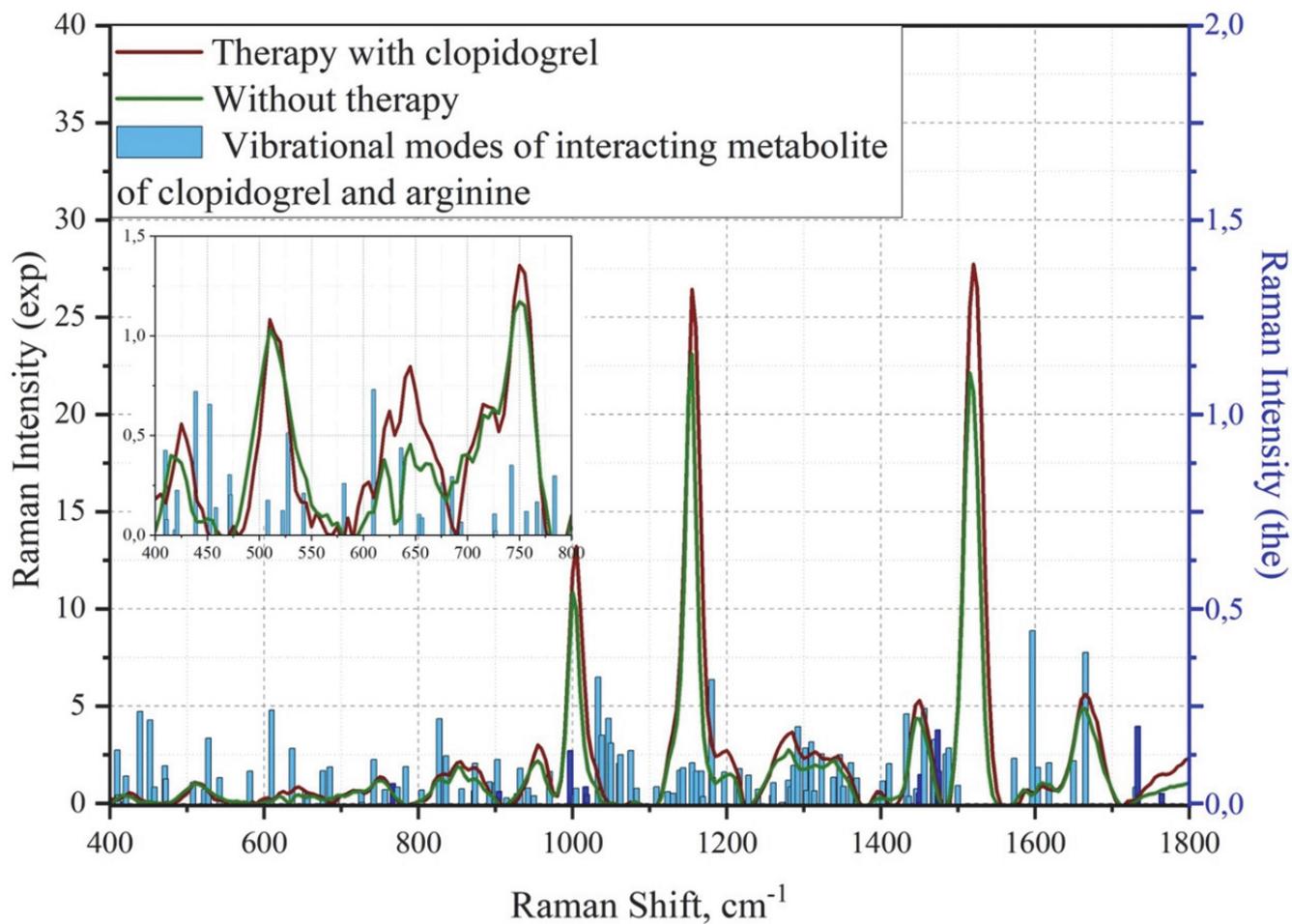


Рисунок 112. Наложение мод метаболита клопидогреля и аргинина на экспериментально полученные спектры тромбоцитов из разных групп. Левая шкала показывает интенсивность колебательных мод экспериментальных данных, шкала справа - теоретически рассчитанные колебательные моды. Колебательные моды, представленные в Таблице 56, выделены синим цветом.

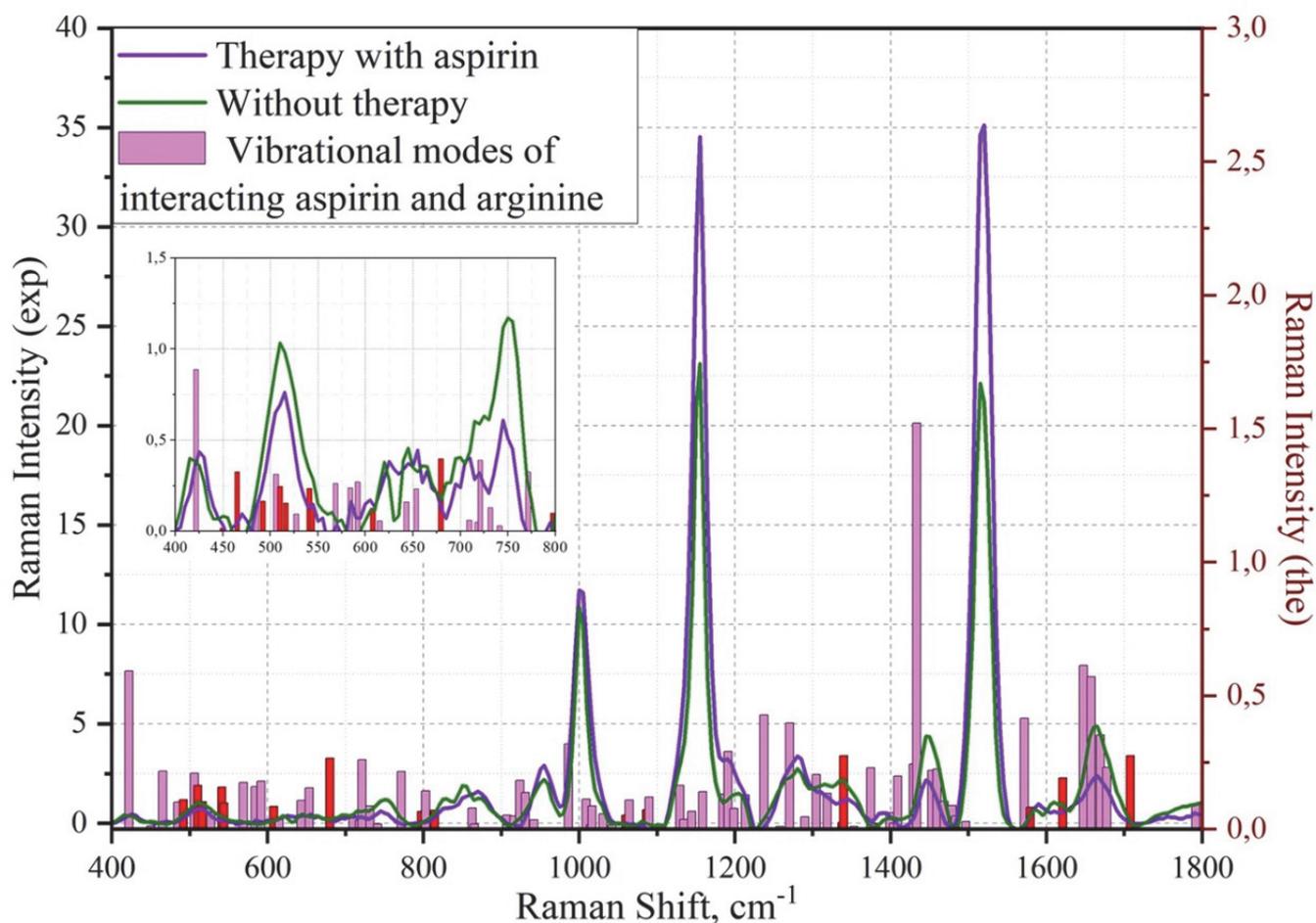


Рисунок 113. Наложение мод аспирина и аргинина на экспериментально полученные спектры тромбоцитов из разных групп. Шкала слева показывает интенсивность колебательных мод экспериментальных данных, шкала справа - теоретически рассчитанных колебательных мод. Красным цветом выделены колебательные моды, представленные в Таблице 56.

При анализе полученных данных были определены поверхностные контактные взаимодействия белка и лиганда, однако эти виды взаимодействий не образовывали связей и поэтому не использовались в дальнейшем анализе. Также полученные данные свидетельствуют о том, что связывание метаболита происходит с аргинином в положении 137 за счет донорно-акцепторного взаимодействия, где донором является кислород метаболита, акцептором – аминокислота. Систем рецептор циклооксигеназы-1+аспирин были использованы для реализации молекулярного докинга в качестве следующего шага. В ходе молекулярного докинга были получены диаграммы лиганд-белкового взаимодействия. Программное обеспечение выполнило 1000 итераций присоединения лиганда к белку и отсортировало их по энтальпии взаимодействия. Однако в дальнейшем рассматривались варианты стыковки метаболита и рецептора с минимальной энергией, поскольку этот вариант взаимодействия является наиболее вероятным. Показано, что аспирин связывается с аргинином в положении 376 через донорно-акцепторную связь, где метаболит является донором, а аминокислота – акцептором. На третьем этапе с помощью программы Gaussian рассчитывались спектры комбинационного рассеяния света

выбранных химических соединений в диапазоне 0–4000  $\text{см}^{-1}$ . После этого проводилось линейное масштабирование волновых чисел в области отпечатка 400–1800  $\text{см}^{-1}$ . Результаты расчета спектров комбинационного рассеяния света представлены Таблице 56 (активный метаболит клопидогреля и аргинин) и (аспирин и аргинин). С помощью пакета программ Gaussian 16 расшифрованы колебательные моды теоретического спектра метаболита клопидогреля и аргинина. Поскольку полученные расчетные данные коррелируют с экспериментальными данными, учитывалась площадь отпечатка пальца. Результаты были занесены в Таблицу 56.

Таблица 56. Расчетные волновые числа и назначение колебательных мод для места взаимодействия аспирина и аргинина в рецепторе ЦОГ-1

Номер колебательной моды	Рамановский сдвиг, $\text{см}^{-1}$	Интенсивность колебаний	Тип колебания
72	767	0.07	Маятниковые Н-С <sub>2</sub> -Н, Н-С <sub>3</sub> -Н, Н-С <sub>2</sub> -Н, Н-С <sub>4</sub> -Н (аргинин) и ножничные С <sub>7</sub> -С <sub>8</sub> -С <sub>9</sub> , колебания атомов водорода вне плоскости ароматического кольца (метаболит)
85	905	0.15	крутильные Н-С <sub>2</sub> -Н, Н-С <sub>3</sub> -Н, Н-С <sub>4</sub> -Н, валентные С <sub>5</sub> -N <sub>3</sub> , С <sub>5</sub> -N <sub>4</sub> (аргинин) и веерные Н-О <sub>3</sub> -С <sub>9</sub> (метаболит)
93	997	0.07	валентные of 1-azacyclohexene-3 и ножничные Н-S-С <sub>6</sub> (метаболит) и веерные N <sub>1</sub> -Н(аргинин)
96	1017	0.09	валентные С <sub>2</sub> -С <sub>3</sub> -С <sub>4</sub> (аргинин) и валентные С <sub>1</sub> -О <sub>1</sub> -С <sub>2</sub> (метаболит)
97	1019	0.52	валентные С <sub>2</sub> -С <sub>3</sub> -С <sub>4</sub> (аргинин) и валентные С <sub>1</sub> -О <sub>1</sub> -С <sub>2</sub> (метаболит)
146	1450	0.13	ножничные Н-О <sub>2</sub> -С <sub>6</sub> (аргинин) и ножничные Н-С <sub>9</sub> -Н (метаболит)
147	1451	0.20	ножничные Н-О <sub>2</sub> -С <sub>6</sub> (аргинин) и ножничные Н-С <sub>9</sub> -Н (метаболит)
151	1474	0.03	ножничные Н-С <sub>2</sub> -Н, Н-С <sub>3</sub> -Н (аргинин) и ножничные Н-С <sub>1</sub> -Н (метаболит)
152	1475	0.00	Колебания атомов водорода в плоскости ароматического кольца (метаболит) и ножничные Н-С <sub>2</sub> -Н, Н-С <sub>3</sub> -Н (аргинин)
153	1475	0.12	ножничные Н-С <sub>1</sub> -Н (метаболит) and ножничные Н-С <sub>2</sub> -Н, Н-С <sub>3</sub> -Н (аргинин)
163	1731	0.53	валентные С <sub>2</sub> =О <sub>2</sub> (метаболит) и ножничные Н-N <sub>1</sub> -Н (аргинин)
164	1733	0.84	валентные С <sub>2</sub> =О <sub>2</sub> , ножничные С <sub>9</sub> -О <sub>3</sub> -Н (метаболит) and валентные С <sub>6</sub> =О <sub>1</sub> (аргинин)

Номер колебательной моды	Рамановский сдвиг, см <sup>-1</sup>	Интенсивность колебаний	Тип колебания
165	1764	0.37	валентные C2=O2 (метаболит) and валентные C6=O1, ножничные C9-O3-H (аргинин)

Далее, с помощью пакета программ Gaussian 16 были рассчитаны и расшифрованы колебательные моды теоретического спектра аспирина и аргинина. Поскольку полученные расчетные данные коррелируют с экспериментальными данными, учитывалась область отпечатка пальца. Результаты отражены в Таблице 57.

Таблица 57. Расчетные волновые числа и назначение колебательных мод для места взаимодействия аспирина и аргинина в рецепторе ЦОГ-1

Номер колебательной моды	Рамановский сдвиг, см <sup>-1</sup>	Интенсивность колебаний	Тип колебания
41	544	0.10	Ножничные O3=C9-C4 и валентные колебания ароматического кольца
56	797	0.07	Веерное H-N3-H (аргинин) и изменение в длине водородной связи
72	1060	0.05	Маятниковое H-N3-H и изменение в длине водородной связи
108	1579	0.08	Ножничные H-N3-H and C5-N2-H и изменение в длине водородной связи
109	1621	0.19	Ножничные H-N3-H, stretching N2-C5-N3, и изменение в длине водородной связи

Накладывая теоретически рассчитанные колебательные моды на экспериментально полученные спектры тромбоцитов человека, не проходившего терапию, и на спектры человека, проходившего терапию аспирином, можно определить, что изменения, происходящие в рецепторе ЦОГ-1, можно объясняется связыванием аспирина с аргинином в положении 376 рецептора. Отмечено, что изменение интенсивностей и спектральных сдвигов спектров в процессе терапии коррелирует с теоретически рассчитанными колебательными модами.

В результате полученные спектры были проанализированы на основе анализа научной литературы. Большинство из упомянутых частот получены экспериментально. Выявлены колебательные моды, соответствующие колебаниям CH<sub>2</sub>, расположенные при 1450 см<sup>-1</sup>, 1451 см<sup>-1</sup>, 1474 см<sup>-1</sup>, 1475 см<sup>-1</sup> и отражающие взаимодействие клопидогреля и аргинина для полос H-O-C и CH<sub>2</sub>. Колебание при 997 см<sup>-1</sup> коррелирует с растяжением 1-азациклогексена-3 и ножницами H-S-C (метаболит) и вилянием NH (аргинин), а также может коррелировать с 1001 см<sup>-1</sup>, характерной для

экспериментальной полосы ароматического кольца фенилаланина. Выявлен спектральный сдвиг на  $4 \text{ см}^{-1}$  при терапии клопидогрелом (мода обнаружена при  $997 \text{ см}^{-1}$ ). При рассмотрении области  $700\text{--}950 \text{ см}^{-1}$  выявлено несколько спектральных различий рассматриваемых групп. Максимумы  $767 \text{ см}^{-1}$ ,  $905 \text{ см}^{-1}$ , описывающие колебания ароматических групп, характерные для аминокислот тирозина, триптофана и фенилаланина, при воздействии различных антиагрегантных препаратов изменяются по-разному. Спектральные максимумы при  $1017 \text{ см}^{-1}$ ,  $1019 \text{ см}^{-1}$  не коррелируют с литературными данными. Максимумы в спектральных областях  $1450\text{--}1475 \text{ см}^{-1}$  и  $1731\text{--}1764 \text{ см}^{-1}$  коррелируют с колебаниями в липидах [376]. Таким образом, сопоставление теоретически рассчитанных колебательных мод с экспериментальными спектрами тромбоцитов человека, не получавшего терапию, и спектрами тромбоцитов пациента, принимавшего аспирин, позволяет установить, что изменения в рецепторе ЦОГ-1 обусловлены связыванием аспирина с аргинином в положении 376. Из графиков видно, что изменение интенсивностей и спектральных сдвигов спектров в процессе терапии коррелируют с теоретически рассчитанными модами колебаний. Представлены выбранные колебания сайтов связывания клопидогрела/аспирина с сайтом тромбоцитов, которые могут быть потенциальными биомаркерами взаимодействия этих соединений в спектре. Полученные результаты опубликованы в статье [375].

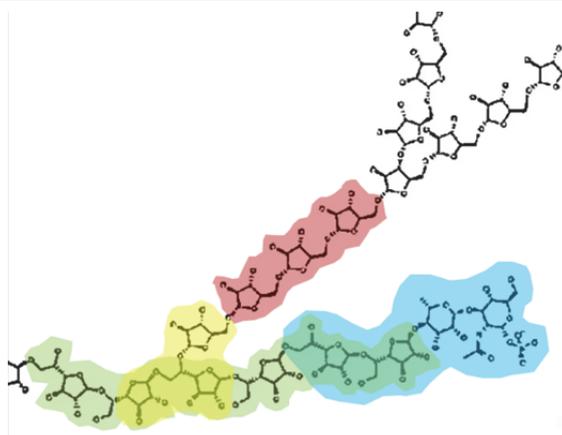
В результате, в ходе экспериментальной части были получены спектры тромбоцитов человека без терапии, на терапии аспирином и на терапии клопидогрелом. Были исследованы рецепторы тромбоцитов и препараты, которые их ингибируют. С помощью молекулярного докинга было определено, что метаболит клопидогреля связывается с аргинином в положении 137 рецептора P2Y<sub>12</sub>, а аспирин связывается с аргинином в положении 376 рецептора ЦОГ-1. Сопоставление теоретических и экспериментальных данных показало, что изменение спектров ГКР тромбоцитов человека на фоне терапии может быть связано с изменением конформации аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана). Также было установлено, что изменения, происходящие в рецепторе во время терапии, можно объяснить связыванием препарата с рецепторами через аргинин в разных положениях (137 для P2Y<sub>12</sub> и 376 для ЦОГ-1). Из полученных графиков видно, что изменение интенсивностей и спектральных сдвигов спектров в процессе терапии коррелируют с теоретически рассчитанными модами колебаний. Выявлен спектральный сдвиг при  $1339 \text{ см}^{-1}$ ,  $814 \text{ см}^{-1}$ ,  $608 \text{ см}^{-1}$ ,  $680 \text{ см}^{-1}$  коррелирует с ароматикой. Для  $1339 \text{ см}^{-1}$  и  $814 \text{ см}^{-1}$  выявлена корреляция с ароматикой тромбоцитов в Trp12. Полоса  $1708 \text{ см}^{-1}$  лежит вблизи экспериментальной полосы Амида I. При анализе низкочастотных полос  $450\text{--}531 \text{ см}^{-1}$ :  $465 \text{ см}^{-1}$ ,  $492 \text{ см}^{-1}$ ,  $510 \text{ см}^{-1}$ ,  $516 \text{ см}^{-1}$ ,  $541 \text{ см}^{-1}$ ,  $544 \text{ см}^{-1}$  выявлены полосы, соответствующие аспирину-аргинину и не показывает прямой корреляции с экспериментальными данными, тем не менее спектральные полосы  $510 \text{ см}^{-1}$  и  $516 \text{ см}^{-1}$  коррелируют с колебаниями  $\text{--S--S}$ ,  $\text{--C--S}$  и  $\text{--C--C24}$ . Спектральные полосы при  $544 \text{ см}^{-1}$ ,  $797 \text{ см}^{-1}$ ,  $1060 \text{ см}^{-1}$ ,  $1087 \text{ см}^{-1}$ ,  $1579 \text{ см}^{-1}$ ,  $1621 \text{ см}^{-1}$  характеризуют водородные связи в комплексе, а также могут быть потенциальными биомаркерами ответа на терапию аспирином. Аспирин может образовывать заданное взаимодействие Н-связей с

различными группами, включая рецептор ЦОГ-122,23. Этот факт, доказанный теоретически и экспериментально в нашей работе, подтверждает корректность моделирования DFT взаимодействия рецептора с лекарственным средством. Таким образом, был апробирован подход, направленный на математическое моделирование методом DFT для антитромбоцитарного препарата и взаимодействия целевого рецептора тромбоцитов с ферментом на ограниченной области. Выявлены полосы комбинационного рассеяния света, соответствующие препарату аспирин/клопидогрел и его взаимодействию в месте связывания. Колебательные моды, представленные в таблицах 56,57 могут быть потенциальными биомаркерами взаимодействия клопидогреля/аспирина с соответствующими рецепторами тромбоцитов (P2Y<sub>12</sub>/COX-1). В результате были получены теоретические рамановские спектры области взаимодействия лекарственного средства с рецептором. Уточнены полосы характеристик, соответствующие колебаниям метаболитов/ферментов и антиагрегантов. Показана перспективность получения результатов по патологиям, основанным на конформациях тромбоцитов при сердечно-сосудистых заболеваниях.

## **5.2. Расчет спектров комбинационного рассеяния света для элементов клеточных стенок микобактерий.**

В результате выполненной работы были произведены расчеты компонент клеточной стенки микобактерии методом DFT. Получены теоретические спектры КРС для разных типов миколовых кислот (альфа, кето, метокси), а также арабиногалактана. Теоретические данные были сопоставлены с полученными ранее экспериментальными результатами для КРС микобактерий [364] для штаммов, описанных в методологической главе работы. Для расчетов теоретических спектров КРС, как и в предыдущей подглаве, использовался программный пакет Gaussian 16 [390] (номер лицензии: G64284555249899W-6922N). Спектры КРС были получены методом DFT с использованием выбранного функционала B3LYP [391] на основе оптимизированных молекулярных структур. В качестве базисного набора был выбран двухвалентный базис с расщепленной валентностью 6-31G (d). Все структуры были построены вручную в GaussView 6.1 на основе информации из литературы [392]. Перед проведением расчетов система была энергетически минимизирована в программной платформе Molecular Operating Environment (MOE) 2014. В программе молекулярной визуализации GaussView 6 построена структура исследуемых веществ, входящих в состав клеточной стенки микобактерии туберкулеза: альфа-, метокси-, кетомиколовые кислоты и арабиногалактан. Структуры миколовых кислот были получены из онлайн-библиотеки PubChem. Структура арабиногалактана была взята из [392]. В целях сокращения времени на расчеты, а также минимизации ошибок при расчетах исходная структура была разделена на участки, представленные в Таблице 58.

Таблица 58. Рассчитанные элементы арабиногалактана



Фрагмент типичной молекулы арабиногалактана для клеточной стенки *M. tuberculosis* [392]

Описание структуры элемента арабиногалактана	Название структуры	2D изображение структуры
Регион линкера, присоединенный к двум кольцам галактана (выделен голубым)	Линкерная область и галактан	
Шесть галактановых колец (зеленые)	Галактан	
Два кольца галактана, соединенные кольцом арабинана (желтым)	Галактан и арабинан	
Область, состоящая из трех колец арабинана (красным)	Арабинан	

Теоретические исследования были направлены на выявление изменений в структуре клеточной стенки чувствительных штаммов и штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с лекарственной устойчивостью. С помощью метода DFT было проведено моделирование выбранных соединений и анализ колебаний, идентифицированных как маркеры структурных изменений. На рисунках 114-121 представлены результаты теоретических расчетов выбранных химических соединений, входящих в состав бактериальной стенки.

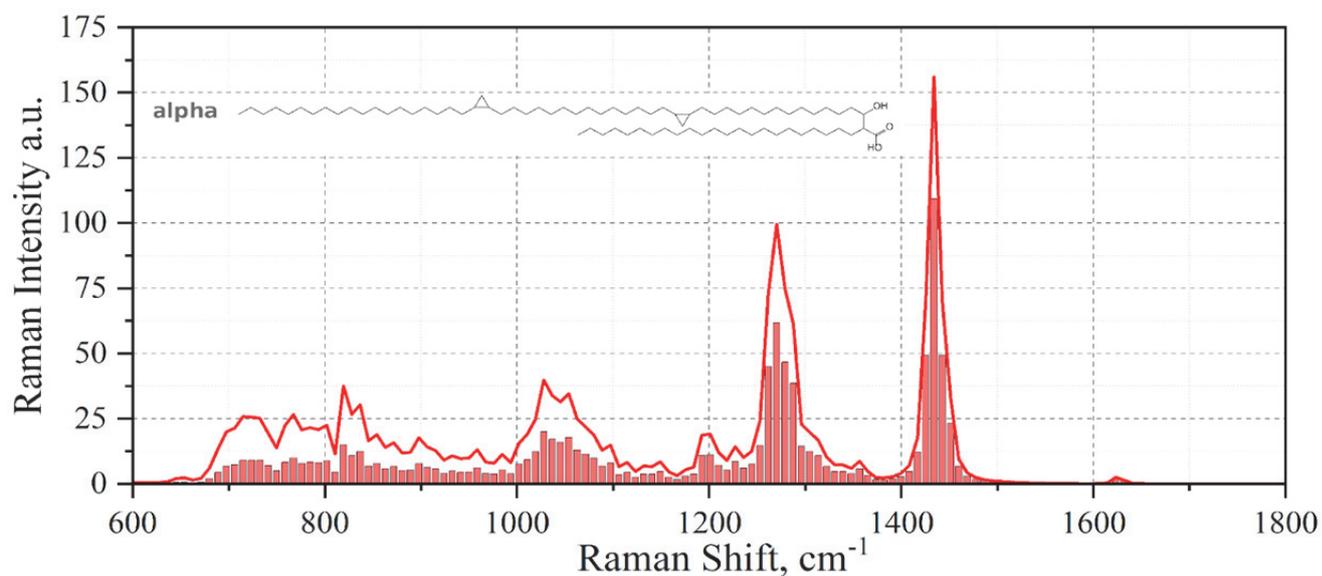


Рисунок 114. Теоретический рамановский спектр альфа-миколовой кислоты. На графике показана теоретическая огибающая и рассчитанные колебательные моды. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (красные вертикальные линии) и их теоретическая огибающая (красная кривая).

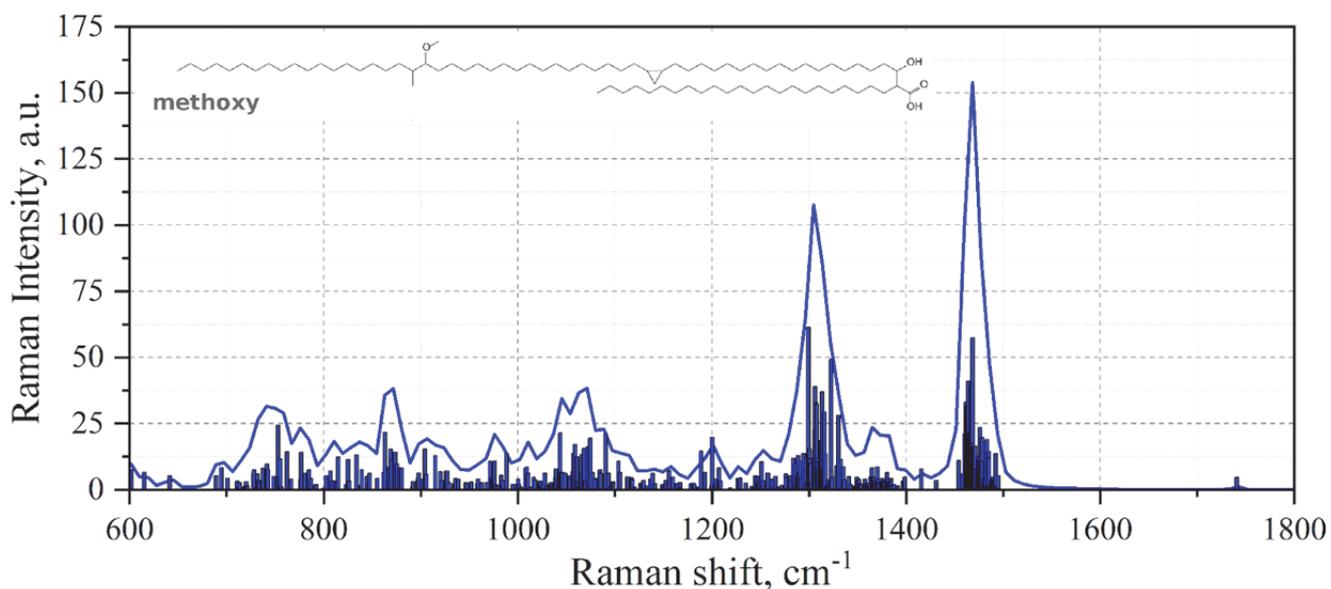


Рисунок 115. Теоретический рамановский спектр метокси-миколовой кислоты. На графике показана теоретическая огибающая и рассчитанные колебательные моды. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (синие вертикальные линии) и их теоретическая огибающая (синяя кривая)

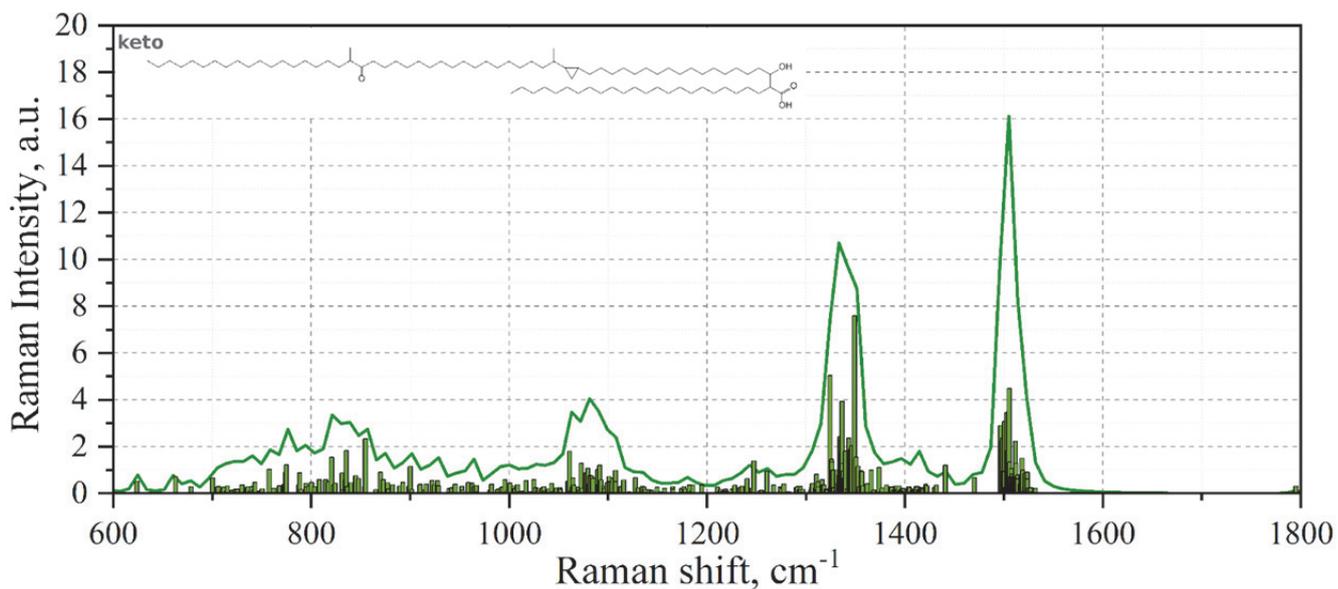


Рисунок 116. Теоретический рамановский спектр кето-миколовой кислоты. На графике показана теоретическая огибающая и рассчитанные колебательные моды. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (зеленые вертикальные линии) и их теоретическая огибающая (зеленая кривая)

Также, на основе исследования [392] были смоделированы участки арабиногалактана и пептидогликана. Представленные в статье пептидогликан и арабиногалактан были разделены на участки для моделирования, чтобы рассмотреть, какие колебания в общей структуре исследуемых соединений влияют на возникновение антибиотикорезистентности у бактерий. Ниже приведены теоретические спектры областей арабиногалактана.

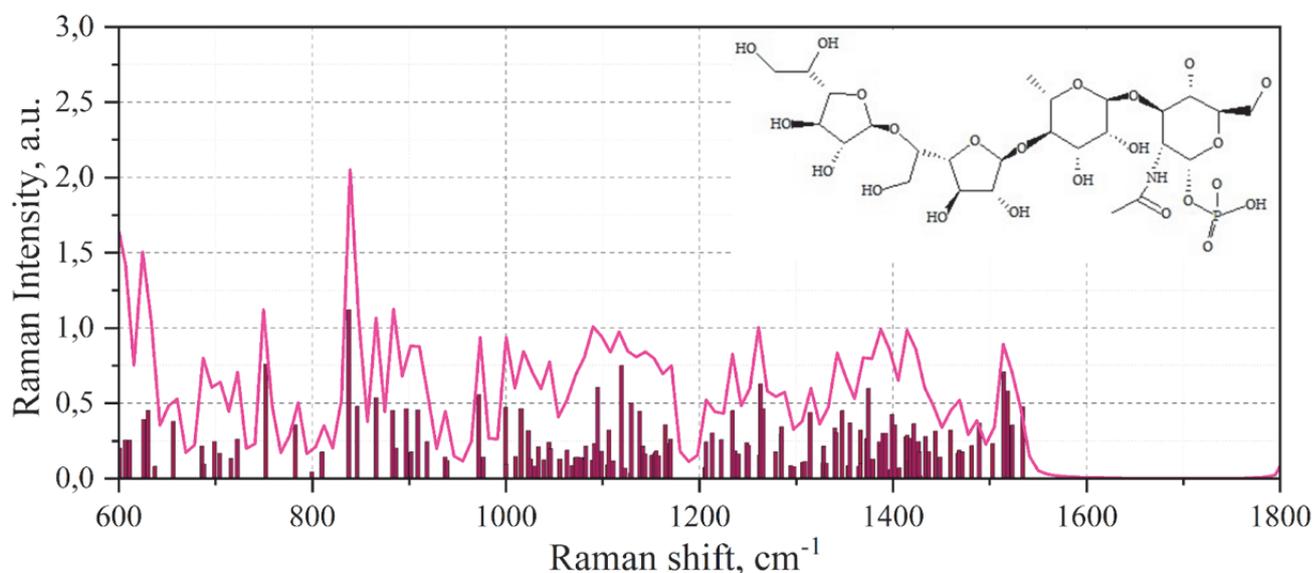


Рисунок 117. Теоретический рамановский спектр линкерной области и галактана. На графике показана теоретическая огибающая и рассчитанные колебательные моды. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (синие бордовые линии) и их теоретическая огибающая (бордовая кривая)

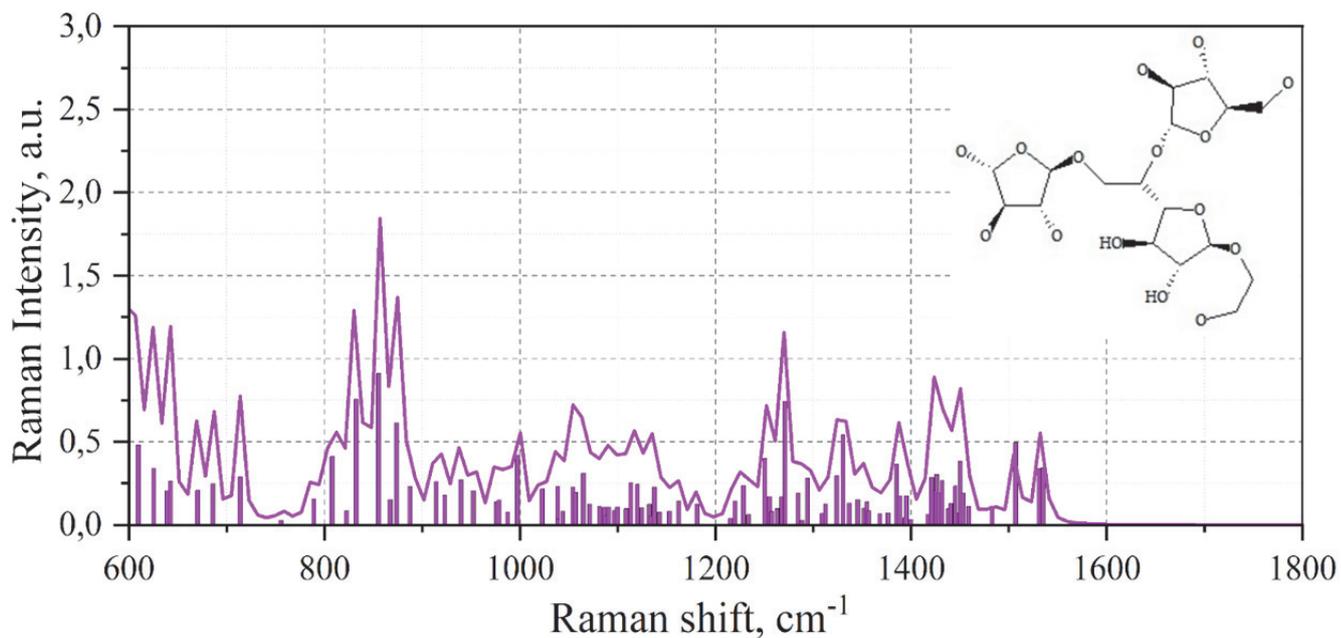


Рисунок 118. Теоретический рамановский спектр арабиногалактана. На графике показана теоретическая огибающая и рассчитанные колебательные моды. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (фиолетовые вертикальные линии) и их теоретическая огибающая (фиолетовая кривая)

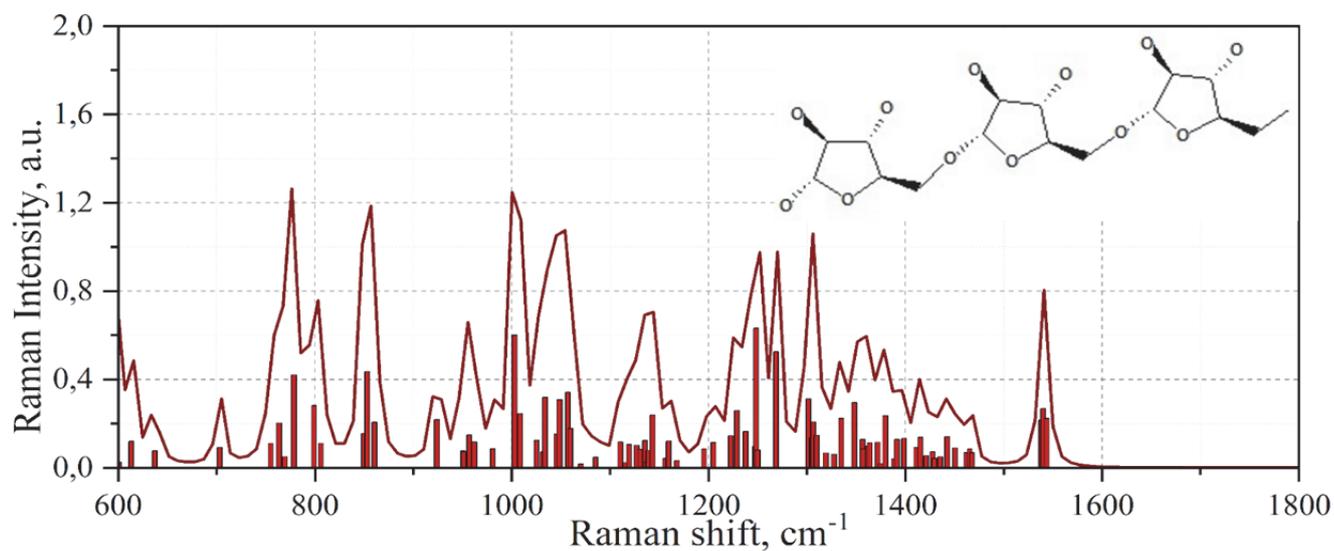


Рисунок 119. Теоретический рамановский спектр арабинана. На графике показана теоретическая огибающая и рассчитанные колебательные моды. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (красные вертикальные линии) и их теоретическая огибающая (красная кривая)

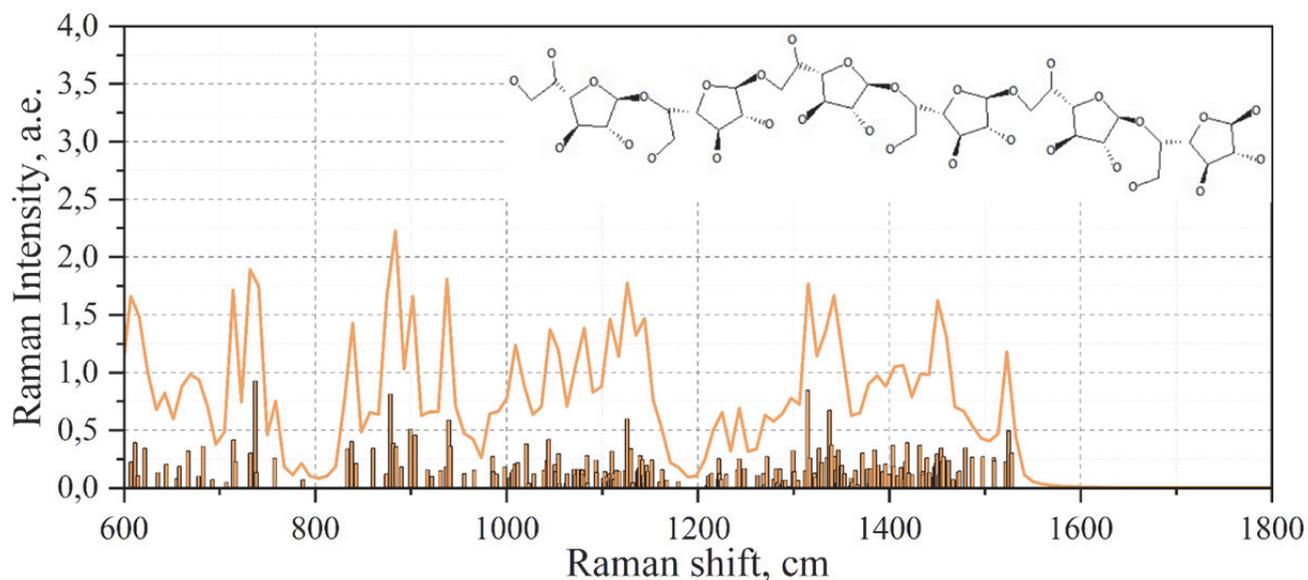


Рисунок 120. Теоретический рамановский спектр галактана. На графике показана теоретическая огибающая и рассчитанные колебательные моды. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (оранжевые вертикальные линии) и их теоретическая огибающая (оранжевая кривая)

Заключительным этапом являлось сравнение теоретических результатов с экспериментальными. На основании экспериментальной работы [364] были уточнены спектральные маркеры изменений при развитии антибиотикорезистентности у бактерий. Эти маркеры представлены на рисунке 121.

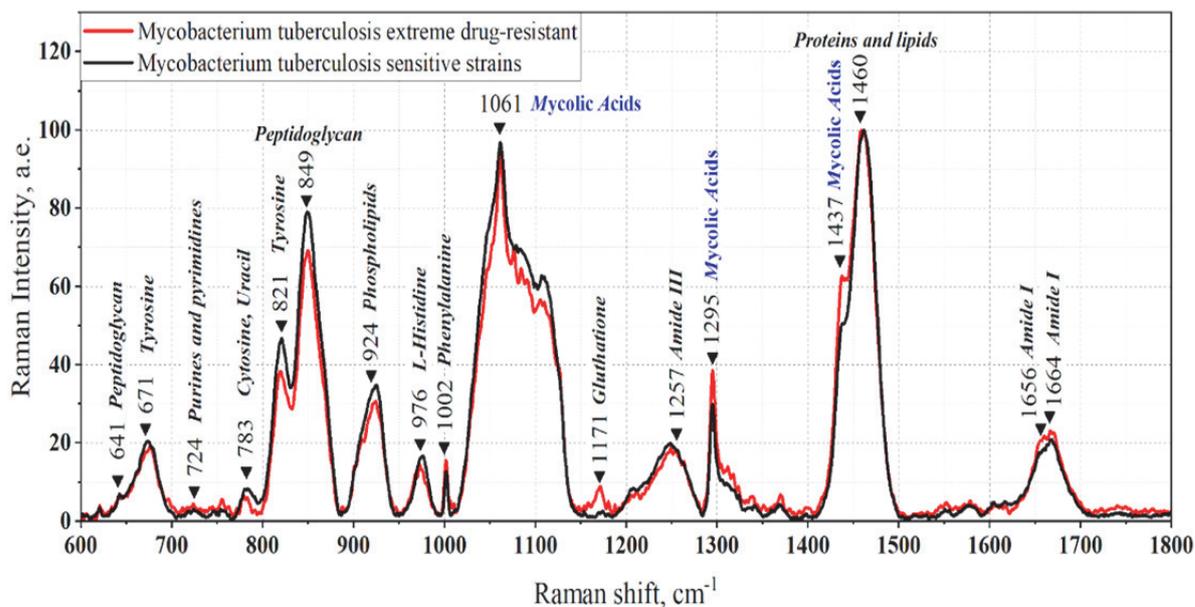


Рисунок 121. Рамановские спектры легочных штаммов *M. tuberculosis* для чувствительных к антибиотикам штаммов (черная линия) и штаммов ШЛУ (красная линия). Результаты сопоставления теоретических и экспериментальных данных приведены в Таблице 59.

Таблица 59. Характеристические полосы сдвигов для легочных клинических штаммов.

Положение полосы чувствительного штамма, см <sup>-1</sup>	Положение полосы штамма с ШЛУ, см <sup>-1</sup>	Колебательные моды
1061	1061	C–C, C–N <b>(Возможный профиль миколовых кислот)</b>
1295	1295	CH <sub>2</sub> крутильные колебания <b>(Возможный профиль миколовых кислот)</b>
1437	1437	Деформационные колебания CH <sub>2</sub> <b>(Возможный профиль миколовых кислот)</b>

Далее, на рисунках 122 - 124, представлено сравнение двух типов бактерий (чувствительный и устойчивый штамм) с теоретически рассчитанными колебательными модами выбранных соединений. На графиках выделены линии, которые будут рассмотрены далее. Поскольку прибор имеет разрешение 1,5 см<sup>-1</sup>, и теоретические расчеты имеют погрешность, которая не может быть полностью устранена пересчетом волновых чисел. Доверительный интервал для отнесения мод был определен в 3 см<sup>-1</sup>.

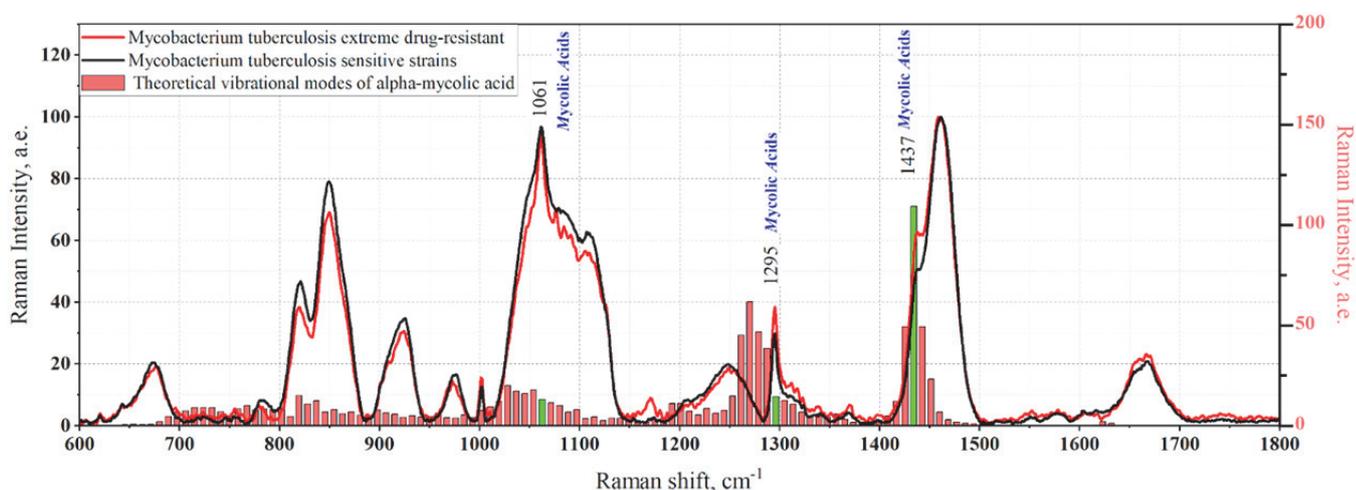


Рисунок 122. Рамановские спектры легочных штаммов *M. tuberculosis* с различной чувствительностью к антибиотикам и теоретические колебательные моды альфа-миколовой кислоты (красные линии) и полосы коррелирующие с проверяемыми экспериментальными данными Таблицы 60 (зеленые линии).

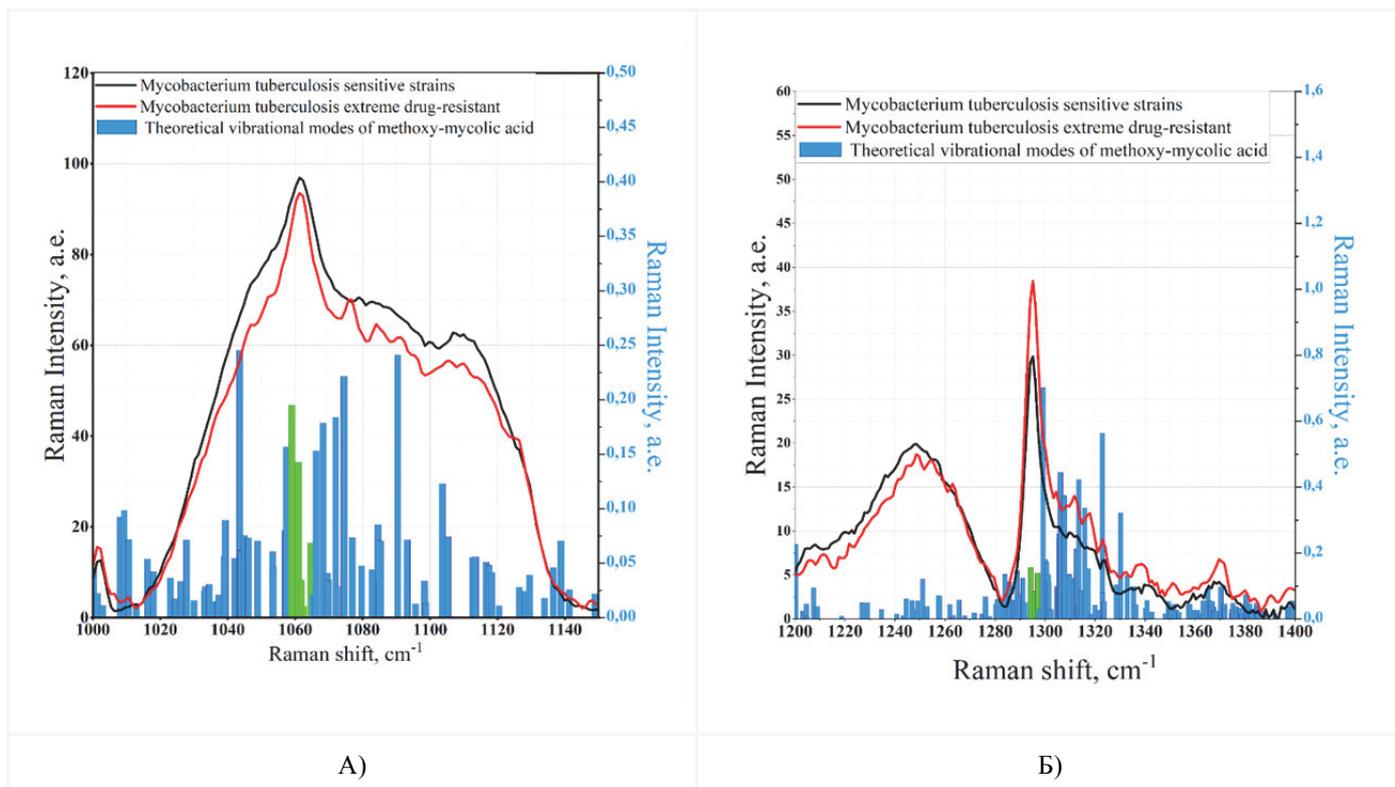


Рисунок 123. Рамановские спектры легочных штаммов *M. tuberculosis* с различной чувствительностью к антибиотикам и теоретические колебательные моды метокси-миколовой кислоты в диапазонах а) 1000 - 1145 см<sup>-1</sup>; б) 1200 - 1400 см<sup>-1</sup>. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (синие линии) и полосы коррелирующие с проверяемыми экспериментальными данными Таблицы 59 (зеленые линии).

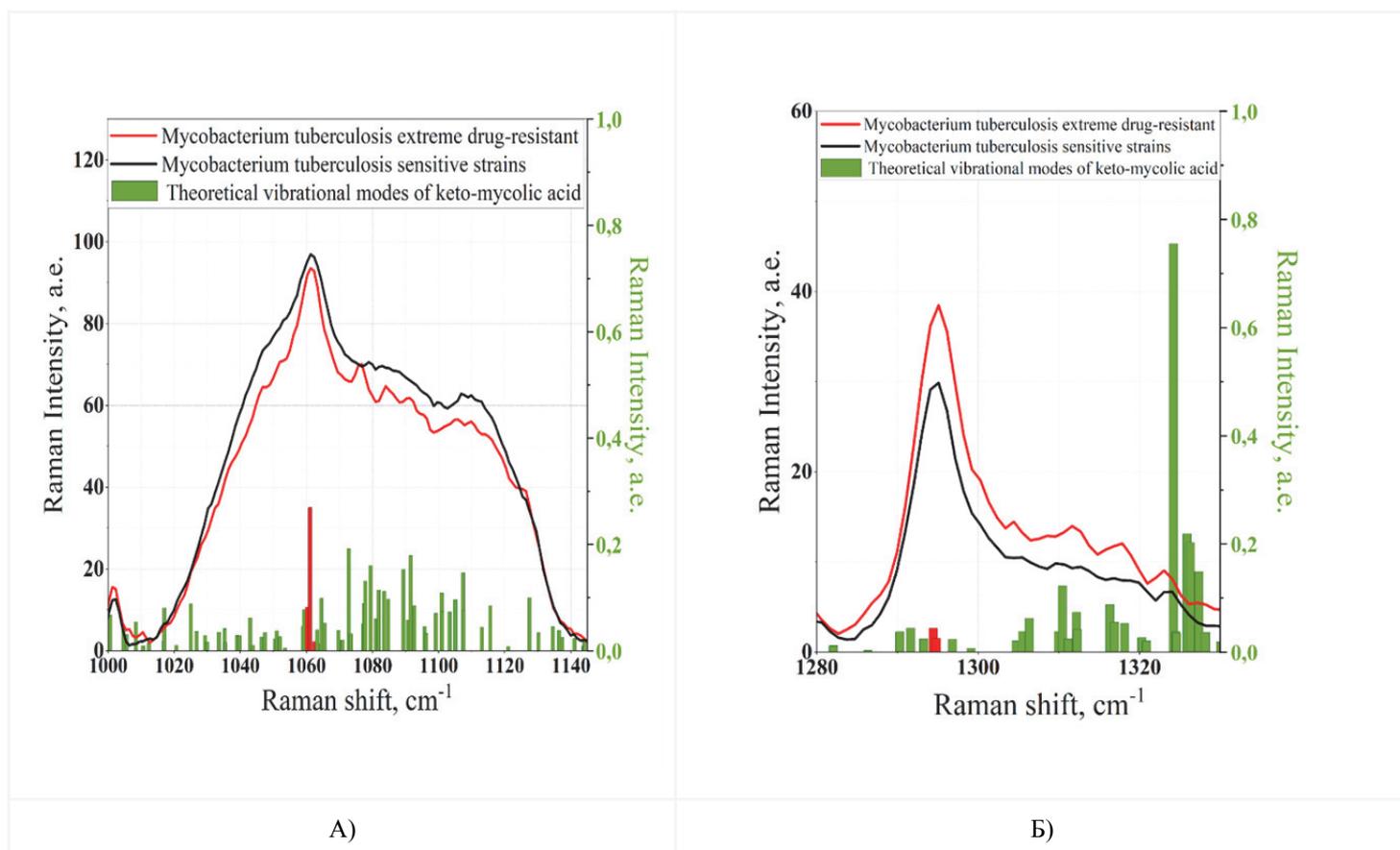


Рисунок 124. Рамановские спектры легочных штаммов *M. tuberculosis* с различной чувствительностью к антибиотикам и теоретические колебательные моды кето-миколовой

кислоты в диапазонах: а) 1000 - 1145 см<sup>-1</sup>; б) 1280 - 1330 см<sup>-1</sup>. Сравнение теоретических расчетов и экспериментальных данных приведено в Таблице 60. На рисунке отражены теоретические колебательные полосы (зеленые линии) и полосы коррелирующие с проверяемыми экспериментальными данными Таблицы 60 (красные линии).

Таблица 60. Сравнение экспериментальных данных с теоретическими расчетами для чувствительных и ШЛУ .

Чувствительный штамм, см <sup>-1</sup>	Штамм ШЛУ, см <sup>-1</sup>	Колебательные моды (экспериментальные), см <sup>-1</sup>	Положение колебательных мод (теоретические), см <sup>-1</sup>	Интерпретация колебательных мод (теоретические)
1061	1061	C-C, C-N	1060	антисимметричные колебания группы C-C <b>(альфа-миколовая кислота)</b>
			1059	антисимметричные колебания C-C-C группы <b>(метокси-миколовая кислота)</b>
			1061	антисимметричные колебания C-C-C группы <b>(метокси-миколовая кислота)</b>
			1062	антисимметричные колебания C-C-C группы <b>(метокси-миколовая кислота)</b>
			1059	антисимметричные колебания C-C-C группы <b>(кето-миколовая кислота)</b>
			1061	антисимметричные колебания C-C-C группы <b>(кето-миколовая кислота)</b>
			1062	антисимметричные колебания C-C-C группы <b>(кето-миколовая кислота)</b>

1295	1295	Крутильное колебание CH <sub>2</sub>	1294	Маятниковое колебание CH <sub>2</sub> (альфа-миколовая кислота)
			1296	Маятниковое колебание CH <sub>2</sub> (альфа-миколовая кислота)
			1295	Крутильное колебание CH <sub>2</sub> (метокси-миколовая кислота)
			1296	Крутильное колебание CH <sub>2</sub> (метокси-миколовая кислота)
			1294	Веерное колебание CH <sub>2</sub> (кето-миколовая кислота)
			1295	Веерное колебание CH <sub>2</sub> (кето-миколовая кислота)
			1296	Крутильное колебание CH <sub>2</sub> (кето-миколовая кислота)
1437	1436	Деформационное колебание CH <sub>2</sub>	1437	Ножничное колебание CH <sub>2</sub> (альфа-миколовая кислота)

В Таблице 60 приведены несколько теоретических колебательных мод каждой миколовой кислоты для каждого экспериментального маркера. Сравнение показывает, что ранее идентифицированные экспериментальные моды подтверждаются теоретическими расчетами. Мода при 1061 см<sup>-1</sup>, описанный экспериментом как колебания C-C, C-N групп миколовых кислот, в ходе теоретических расчетов был определен при 1059 - 1062 см<sup>-1</sup> как антисимметричные колебания C-C-C группы. Следует отметить, что экспериментально и первоначально группу C-C соотносили с боковыми цепями структуры миколовой кислоты [392], однако, согласно результатам DFT-расчетов, колебательная полоса на величину спектрального сдвига [393, 394] при 1067 см<sup>-1</sup> может соответствовать колебаниям скелета C-C-C миколовой кислоты. Экспериментально обнаруженная связь C-N нехарактерна для состава миколовой кислоты и не была подтверждена теоретически, однако ее наличие может быть связано с действием азотсодержащих препаратов на резистентный штамм.

Колебания при  $1295\text{ см}^{-1}$ , описанные в эксперименте как крутильные колебания групп  $\text{CH}_2$  в миколовых кислотах, в ходе теоретических расчетов были определены при  $1294 - 1296\text{ см}^{-1}$  как маятниковые (альфа-миколовая кислота), крутильные (метокси-миколовая кислота) и веерные (кето-миколовая кислота) колебания группы  $\text{CH}_2$ . Колебания при  $1437 (1436)\text{ см}^{-1}$ , описанные экспериментально как деформационные колебания групп  $\text{CH}_2$  в миколовых кислотах, при теоретических расчетах были определены только для альфа-миколовой кислоты при  $1437\text{ см}^{-1}$  как ножничные колебания  $\text{CH}_2$ . Экспериментальные данные показывают, что интенсивность максимума значительно выше для штамма ШЛУ, чем для чувствительного. Это можно объяснить большим количеством альфа-миколовой кислоты в клеточной стенке бактерии вследствие развития резистентности. Относительно клеточной структуры можно сделать вывод на основании [392], что это колебание соответствует метильной ветви комплекса Mma2 цис-альфа-миколовой кислоты.

Далее, на рисунках 125 - 128, будут рассмотрены колебания, коррелирующие со структурой арабиногалактана. Колебательные моды арабиногалактана были выделены на основе статей [34] и [395]. Голубые колебательные линии на спектрах коррелируют с экспериментальными данными таблицы 61.

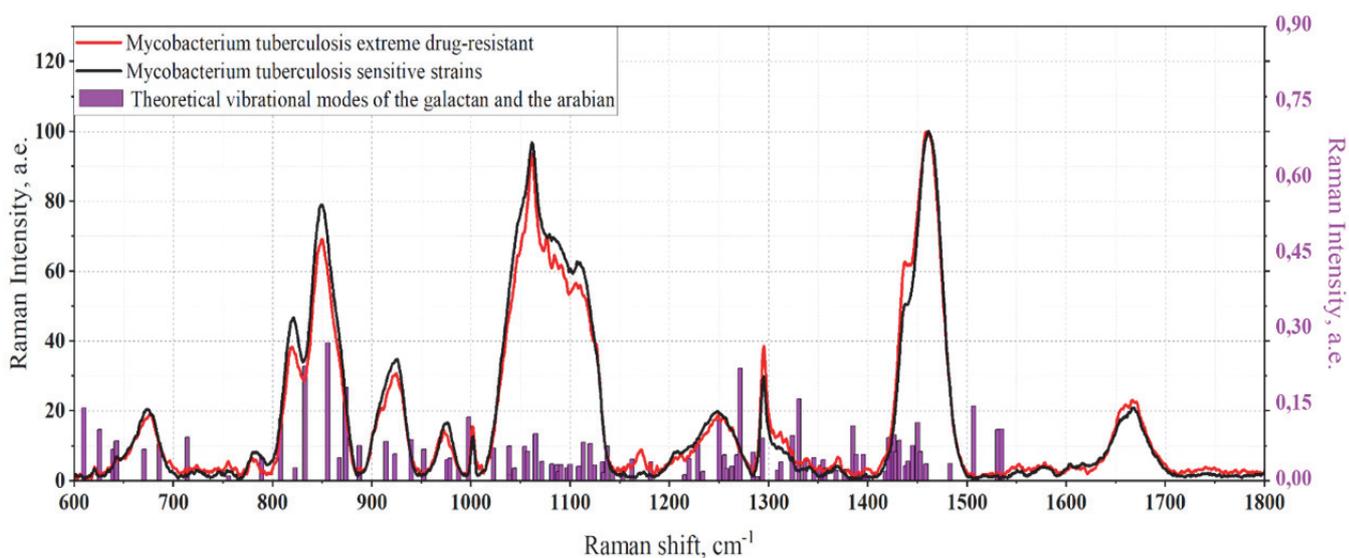


Рисунок 125. Рамановские спектры легочных штаммов *M. tuberculosis* с различной чувствительностью к антибиотикам и теоретические колебательные моды галактана и арабиана.

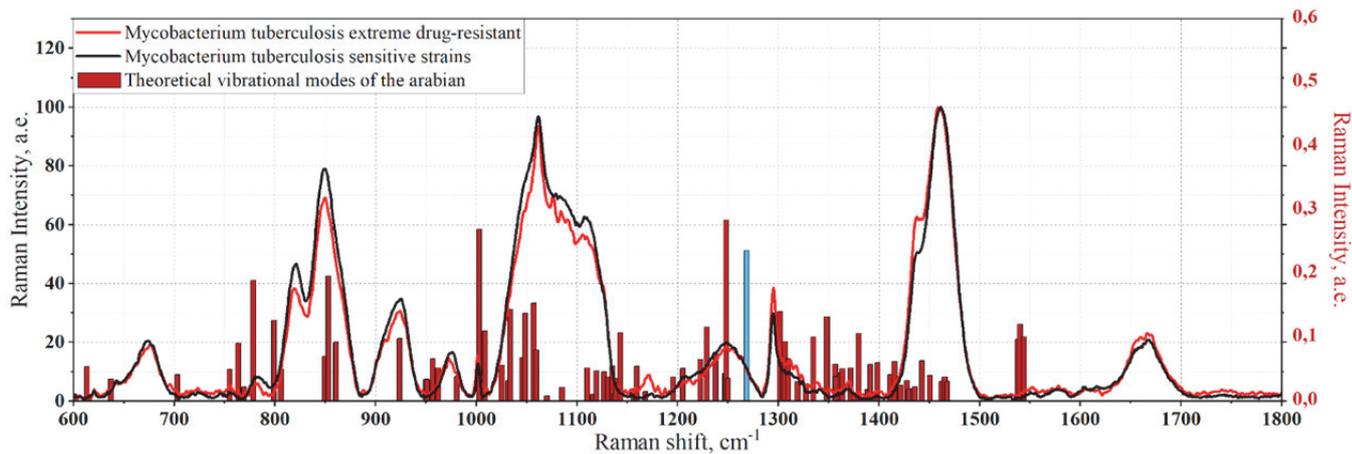


Рисунок 126. Рамановские спектры легочных штаммов *M. tuberculosis* с различной чувствительностью к антибиотикам и теоретические колебательные моды арабинана.

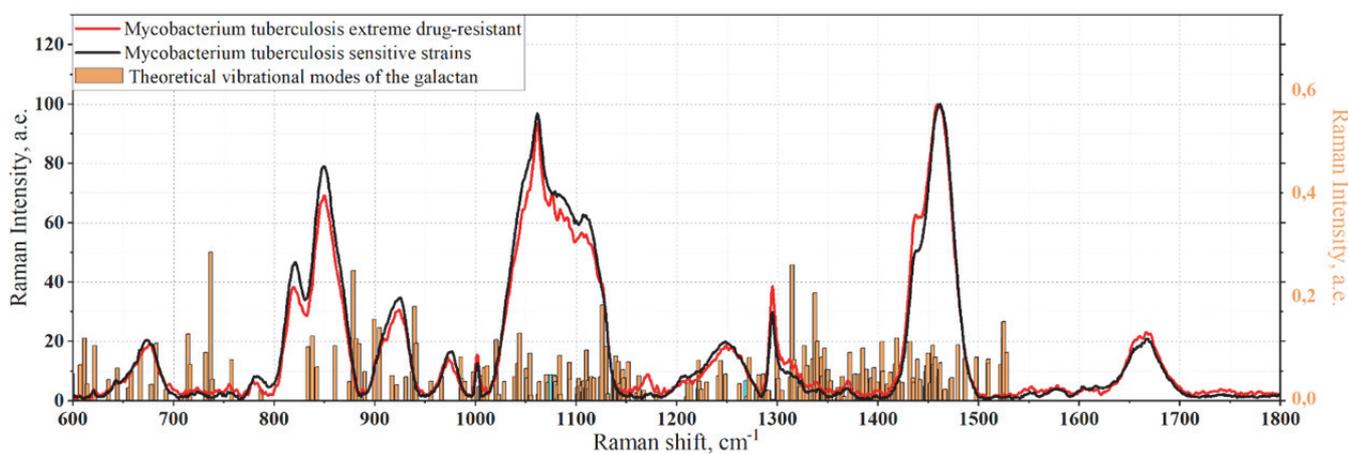


Рисунок 127. Рамановские спектры легочных штаммов *M. tuberculosis* с различной чувствительностью к антибиотикам и теоретические колебательные моды галактана.

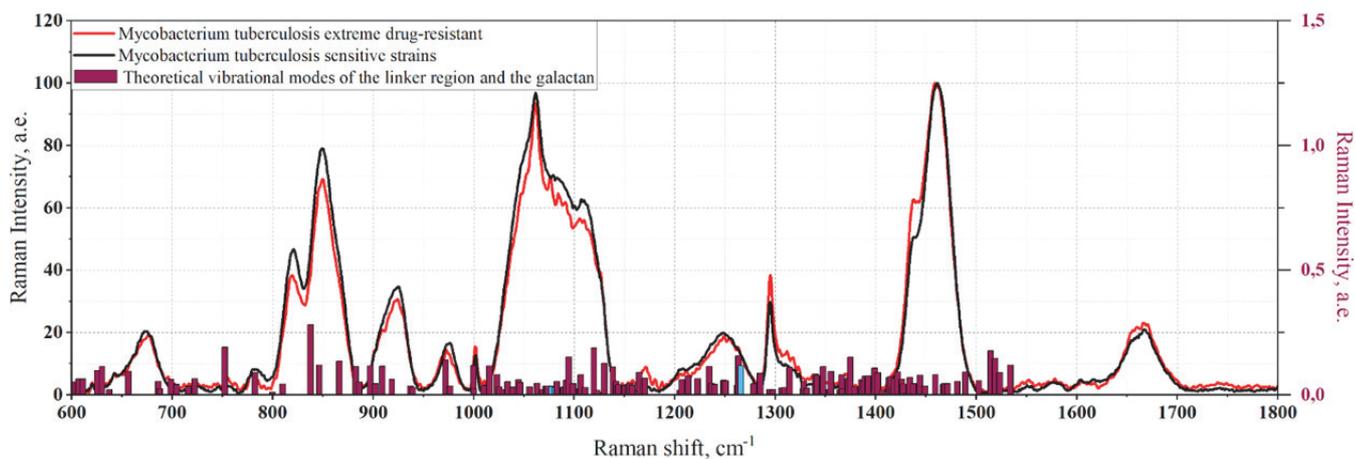


Рисунок 128. Рамановские спектры легочных штаммов *M. tuberculosis* с различной чувствительностью к антибиотикам и теоретические колебательные моды в области связывания и галактана. Сравнение теоретических расчетов и экспериментальных данных приведено в таблице 61.

Таблица 61. Сравнение экспериментальных данных с теоретическими расчетами.

Данные статьи, см <sup>-1</sup>	Колебательные полосы (экспериментальные [392]), см <sup>-1</sup>	Колебательные полосы (экспериментальные [395]), см <sup>-1</sup>	Положение рассчитанной полосы, см <sup>-1</sup>	Интерпретация рассчитанной колебательной полосы
822	Валентные колебания (C–O–S)	C-O-C $\alpha$ -likage/ $\gamma$ (C – OH) кольцо	823	Ножничные колебания Н-С-О (для галактана и арабинана)
1076	Симметричные валентные колебания (O=S=O)	Нет	1074	Валентные колебания С=О ( <b>линкер и галактан</b> )
			1075	Валентные колебания С=О ( <b>галактан</b> )
			1078	Валентные колебания С=О ( <b>линкер и галактан</b> )
1269	Ассиметричные валентные колебания (O=S=O)	$\nu$ (C-O)	1266	Ножничные колебания Н-С-О ( <b>линкер и галактан</b> )
			1268	Ножничные колебания Н-С-О ( <b>галактан</b> )
			1268	Крутильные колебания С-Н ( <b>галактан и арабинан</b> )
			1269	Ножничные колебания Н-С-О ( <b>арабинан</b> )
			1270	Ножничные колебания Н-С-О ( <b>галактан</b> )

В Таблице 61 приведены несколько рассчитанных мод для каждой моделируемой области арабиногалактана для найденных экспериментальных маркеров. Теоретические расчеты показали, что мода при 822 см<sup>-1</sup> [396] соответствует моде при 823 см<sup>-1</sup> (ножничные колебания Н-С-О). мода 1076 см<sup>-1</sup>, описываемая как колебания O=S=O групп арабиногалактана, была определена в ходе теоретических расчетов при 1074 - 1078 см<sup>-1</sup> как растягивающие колебания С=О группы. Мода при 1269 см<sup>-1</sup>, описана экспериментально как ассиметричные валентные колебания O=S=O группы. Сравнивая теоретические результаты с работой [395], следует отметить корреляцию групп С-О при 1269 см<sup>-1</sup>. Поскольку экспериментальные данные были взяты из органической

составляющей, этот результат может быть сравнен с источником [396]. На частоте  $822\text{ см}^{-1}$  также обнаружено соответствующее колебание, которое можно поставить в соответствие с экспериментальными результатами. Группа серы при  $822\text{ см}^{-1}$  и  $1076\text{ см}^{-1}$  может присутствовать в спектре и может быть соотнесена с [397]. В результате было проведено моделирование элементов клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis*. Обнаружены полосы комбинационного рассеяния света, соответствующие миколовым кислотам (альфа-, кето-, метокси) и арабиногалактану. Колебательные моды, представленные в таблицах 60 и 61, могут служить теоретическим подтверждением экспериментальных результатов и использоваться в качестве потенциальных биомаркеров для определения чувствительности бактерии, поскольку определенные маркеры коррелируют с изменениями в спектре комбинационного рассеяния чувствительных и устойчивых штаммов бактерий. В результате были получены теоретические рамановские спектры соединений, входящих в состав бактериальной стенки микобактерий. Уточнены и подтверждены полосы спектральных характеристик, соответствующие колебаниям альфа-, кето-, метокси-миколовых кислот и арабиногалактана. Было показано, что колебательные спектры могут быть рассчитаны с помощью DFT. Этот подход может быть применен для отдельных компонентов клеточной стенки, их составных частей, после чего они могут быть сопоставлены с экспериментальными результатами, подтверждающими спектральные маркеры. В рамках статьи экспериментальные данные были уточнены для миколовых кислот. Было установлено, что максимум при  $1437\text{ см}^{-1}$  принадлежит только альфа-миколовой кислоте. Благодаря разной интенсивности максимума этот факт может быть использован как для дифференциации чувствительных и резистентных клеток, так и для анализа места действия препарата на мишень. Для арабинана и галактана удалось подтвердить экспериментальные результаты в спектре и определить места связывания арабинана и галактана. Это позволило моды  $822\text{ см}^{-1}$ , отличающуюся по интенсивности для чувствительных и резистентных клеток, который в литературе экспериментально связывали с тирозином и C-O-S, C-O-C  $\alpha$ -linkage/ $\gamma$ (C - OH) кольцом. Данные результаты демонстрируют перспективы получения результатов для исследования изменений в клетках *MbT*, связанных с устойчивостью к антибиотикам. Полученные данные опубликованы в работе [417].

В заключение главы стоит отметить, что применение DFT методов для подтверждения экспериментальных результатов диссертации является адекватным и позволяет уточнять искомые биомаркеры резистентности/действия антитромбоцитарных препаратов или иных изменений. Такие подходы имеют существенную перспективу для разработки методов *in silico* решения связанных экспериментальных задач

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1) Для исследования морфологических и оптических свойств тромбоцитов, бактерий *E. coli*, микобактерий *M. tuberculosis* применены планарные и коллоидные оптические сенсоры на базе плазмонного резонанса и выработана оптимальная методология проведения соответствующих экспериментальных процедур.
- 2) Исследовано различие между состоянием нормы, отклонением от нее и воздействием лекарственных препаратов для микобактерий туберкулеза (в том числе единичных), обладающих различным статусом антибиотикорезистентности, кишечной палочки *E. coli*, тромбоцитов при наступлении патологии ССЗ, отражающееся на спектральных характеристиках данных биообъектов.
- 3) Проведен анализ биомолекулярно-релевантных особенностей, отражающихся в специфике спектральных характеристик рассеяния на клетках методом гигантского комбинационного рассеяния света при использовании возбуждающего излучения с длинами волн  $\lambda=532$  нм,  $\lambda=632.8$  нм,  $\lambda=785$  нм.
- 4) На основе проведенного комплекса исследований разработаны методы выделения наиболее информативных спектральных полос, служащих биомаркерами для определения степени антибиотикорезистентности бактерий и определения состояния тромбоцитов на основе существенных выборок спектральных данных и их групп; релевантность идентификации таких биомаркеров обоснована с применением многомерных методов статистического анализа (машинное обучение, корреляционный анализ и др.)
- 6) На основе анализа изменения значений совокупности выделенных биомаркеров при различных условиях аргументированы механизмы биофизических процессов, приводящих к изменениям в рецепторах P2Y<sub>12</sub> тромбоцитов под воздействием лекарственных средств, а также антибиотикорезистентности кишечной палочки *E. coli* и микобактерий туберкулеза.
- 7) Анализ натуральных экспериментальных данных позволил сформулировать положения о молекулярно-биологических механизмах, влияющих на изменения спектральных биомаркеров рецепторов P2Y<sub>12</sub> и компонентов клеточных стенок микобактерий туберкулёза. Дополнительное подтверждение этих положений получено на основе результатов, полученных с применением разработанного подхода к моделированию бимолекулярных спектров с использованием метода теории функционала плотности (DFT). Данный подход открывает перспективы для *in silico*-скрининга новых веществ-кандидатов в лекарственные препараты, направленных на структуры клеточной стенки, что может способствовать созданию более эффективных средств терапии туберкулёза и расширению методов поиска новых антибиотиков.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raether H. Surface plasmons on smooth surfaces //Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. – 2006. – С. 4-39.
2. Hutter E., Fendler J. H. Exploitation of localized surface plasmon resonance //Advanced materials. – 2004. – Т. 16. – №. 19. – С. 1685-1706.
3. Maier S. A., Atwater H. A. Plasmonics: Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures //Journal of applied physics. – 2005. – Т. 98. – №. 1. – С. 10.
4. Philip A., Kumar A. R. The performance enhancement of surface plasmon resonance optical TB-ЧBors using nanomaterials: A review //Coordination Chemistry Reviews. – 2022. – Т. 458. – С. 214424.
5. Petryayeva, E.; Krull, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and 717 bioTB-ЧBing–A review. Anal. Chim. Acta 2011, 706, 8–24.
6. Ozbay E. Plasmonics: merging photonics and electronics at nanoscale dimensions //science. – 2006. – Т. 311. – №. 5758. – С. 189-193.
7. Loh J. Y. Y. et al. Near-perfect absorbing copper metamaterial for solar fuel generation //Nano Letters. – 2021. – Т. 21. – №. 21. – С. 9124-9130.
8. Kim M. S. et al. Optical properties of nucleobase thin films as studied by attenuated total reflection and surface-enhanced Raman spectroscopy //Optical Materials. – 2018. – Т. 78. – С. 531-537.
9. Kim J. B. et al. Multiple surface plasmon waves in [prism/Ag/SiO<sub>2</sub> helical thin film] Kretschmann configuration //Thin solid films. – 2011. – Т. 520. – №. 5. – С. 1451-1453.
10. Kim J. B. et al. Surface plasmon resonances at a [Ag/SiO<sub>2</sub> helical thin-film] interface //Journal of the Korean Physical Society. – 2012. – Т. 60. – С. 1249-1252.
11. Koshizaki N., Sasaki T., Tsuchiya T. 3-2. Laser Processing for Nanomaterial Preparation //Photoreaction Control and Photofunctional Materials. – 2001. – Т. 1997. – С. 56.
12. Lee G. J. et al. Circular dichroism, surface-enhanced Raman scattering, and spectroscopic ellipsometry studies of chiral polyfluorene-phenylene films //Optical Materials Express. – 2016. – Т. 6. – №. 3. – С. 767-781.
13. Moskovits M. et al. FKPC and the single molecule //Optical properties of nanostructured random media. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2002. – С. 215-227.
14. Wang Z. et al. The structural basis for giant enhancement enabling single-molecule Raman scattering //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – Т. 100. – №. 15. – С. 8638-8643.
15. Lakowicz J. R. et al. Radiative decay engineering: the role of photonic mode density in biotechnology //Journal of physics D: Applied physics. – 2003. – Т. 36. – №. 14. – С. R240.

16. Guzatov D. V., Klimov V. V. Radiative decay engineering by triaxial nanoellipsoids //Chemical physics letters. – 2005. – T. 412. – №. 4-6. – C. 341-346.
17. Wang L., Hasanzadeh Kafshgari M., Meunier M. Optical properties and applications of plasmonic-metal nanoparticles //Advanced Functional Materials. – 2020. – T. 30. – №. 51. – C. 2005400.
18. de Aberasturi D. J., Serrano-Montes A. B., Liz-Marzán L. M. Modern applications of plasmonic nanoparticles: from energy to health //Advanced Optical Materials. – 2015. – T. 3. – №. 5. – C. 602-617.
19. Vo-Dinh T. et al. ГКPC nanoТБ-ЧBors and nanoreporters: golden opportunities in biomedical applications //Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2015. – T. 7. – №. 1. – C. 17-33.
20. Fan X., Zheng W., Singh D. J. Light scattering and surface plasmons on small spherical particles //Light: Science & Applications. – 2014. – T. 3. – №. 6. – C. e179-e179.
21. Stiles P. L. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy //Annu. Rev. Anal. Chem. – 2008. – T. 1. – C. 601-626.
22. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: 759 the influence of size, shape, and dielectric environment. J. Phys. Chem. B 2003, 107, 668–677
23. Qiu Y. et al. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy //ТБ-ЧBors. – 2022. – T. 22. – №. 13. – C. 4889.
24. Li Z. Y. Mesoscopic and microscopic strategies for engineering plasmon-enhanced raman scattering //Advanced Optical Materials. – 2018. – T. 6. – №. 16. – C. 1701097.
25. Jeong Y. et al. Metal enhanced fluorescence (MEF) for bioТБ-ЧBors: General approaches and a review of recent developments //BioТБ-ЧBors and Bioelectronics. – 2018. – T. 111. – C. 102-116.
26. Deng W. et al. Metal-enhanced fluorescence in the life sciences: here, now and beyond //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2013. – T. 15. – №. 38. – C. 15695-15708.
27. Lakowicz J. R. et al. Advances in surface-enhanced fluorescence //Journal of fluorescence. – 2004. – T. 14. – C. 425-441.
28. Aslan K. et al. Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology //Current opinion in biotechnology. – 2005. – T. 16. – №. 1. – C. 55-62.
29. Aslan K. et al. Metal-enhanced fluorescence solution-based ТБ-ЧBing platform //Journal of fluorescence. – 2004. – T. 14. – C. 677-679.
30. Taflove A., Hagness S. C., Picket-May M. Computational electromagnetics: the finite-difference time-domain method //The Electrical Engineering Handbook. – 2005. – T. 3. – C. 629-670.
31. Oubre C., Nordlander P. Optical properties of metallodielectric nanostructures calculated using the finite difference time domain method //The Journal of Physical Chemistry B. – 2004. – T. 108. – №. 46. – C. 17740-17747.

32. Kim J. et al. Finite-difference time-domain numerical simulation study on the optical properties of silver nanocomposites //Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2012. – T. 12. – №. 7. – C. 5527-5531.
33. Kim, J.; Lee, G. J.; Park, I.; Lee, Y. P. Influence of ZnO Nanorod Morphology on Optical Confinement–Finite-Difference Time-Domain Numerical Simulation Study. J. Nanosci. Nanotechno. 2011, 11, 7238–7241
35. Sosa I. O., Noguez C., Barrera R. G. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes //The Journal of Physical Chemistry B. – 2003. – T. 107. – №. 26. – C. 6269-6275.
36. Makkar P., Ghosh N. N. A review on the use of DFT for the prediction of the properties of nanomaterials //RSC advances. – 2021. – T. 11. – №. 45. – C. 27897-27924.
37. Jackson J. D. Classical electrodynamics 3rd ed john wiley & sons //Inc., NewYork, NY. – 1999.
38. Darienzo R. E. et al. Au nanoparticles for  $\Gamma$ KPC: Temperature-controlled nanoparticle morphologies and their Raman enhancing properties //Materials chemistry and physics. – 2020. – T. 240. – C. 122143.
39. Qayyum H. et al. Laser-based two-step synthesis of Au-Ag alloy nanoparticles and their application for surface-enhanced Raman spectroscopy ( $\Gamma$ KPC) based detection of rhodamine 6G and urea nitrate //Journal of Molecular Liquids. – 2022. – T. 365. – C. 120120.
40. Kim K., Lee H. S. Effect of Ag and Au nanoparticles on the  $\Gamma$ KPC of 4-aminobenzenethiol assembled on powdered copper //The Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – T. 109. – №. 40. – C. 18929-18934.
41. Aslan K., Malyn S. N., Geddes C. D. Angular-dependent metal-enhanced fluorescence from silver colloid-deposited films: opportunity for angular-ratiometric surface assays //Analyst. – 2007. – T. 132. – №. 11. – C. 1112-1121.
42. Aslan K., Malyn S. N., Geddes C. D. Metal-enhanced fluorescence from gold surfaces: angular dependent emission //Journal of fluorescence. – 2007. – T. 17. – C. 7-13.
43. Cabello G. et al. Cu@ Au self-assembled nanoparticles as  $\Gamma$ KPC-active substrates for (bio) molecular TB- $\Psi$ Bing //Journal of Alloys and Compounds. – 2019. – T. 791. – C. 184-192.
44. de Barros Santos E., Sigoli F. A., Mazali I. O. Metallic Cu nanoparticles dispersed into porous glass: A simple green chemistry approach to prepare  $\Gamma$ KPC substrates //Materials Letters. – 2013. – T. 108. – C. 172-175.
- 45 Zhang Y. et al. Metal-enhanced fluorescence from copper substrates //Applied Physics Letters. – 2007. – T. 90. – №. 17. – C. 173116.
46. Gutiérrez Y. et al. Plasmonics in the ultraviolet with aluminum, gallium, magnesium and rhodium //Applied Sciences. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 64.
47. McMahon J. M., Schatz G. C., Gray S. K. Plasmonics in the ultraviolet with the poor metals Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, and Bi //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2013. – T. 15. – №. 15. – C. 5415-5423.

48. Tanabe I. et al. Far-and deep-ultraviolet surface plasmon resonance using Al film for efficient ТБ-ЧBing of organic thin overlayer //ТБ-ЧBors and Actuators A: Physical. – 2020. – Т. 301. – С. 111661.
49. Knight M. W. et al. Aluminum for plasmonics //ACS nano. – 2014. – Т. 8. – №. 1. – С. 834-840.
50. Gutierrez Y. et al. How an oxide shell affects the ultraviolet plasmonic behavior of Ga, Mg, and Al nanostructures //Optics express. – 2016. – Т. 24. – №. 18. – С. 20621-20631.
- 51 Yang Y. et al. Gallium nanoparticle plasmonics //APS March Meeting Abstracts. – 2010. – Т. 2010. – С. Y14. 005.
52. Gutiérrez Y. et al. Metals and dielectrics for UV plasmonics //Nanophotonics VIII. – SPIE, 2020. – Т. 11345. – С. 26-34.
53. Voet D. et al. Absorption spectra of nucleotides, polynucleotides, and nucleic acids in the far ultraviolet //Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 1963. – Т. 1. – №. 3. – С. 193-208.
54. Cardinal M. F. et al. Expanding applications of ГKPC through versatile nanomaterials engineering //Chemical Society Reviews. – 2017. – Т. 46. – №. 13. – С. 3886-3903.
55. Lee H. K. et al. Designing surface-enhanced Raman scattering (ГKPC) platforms beyond hotspot engineering: emerging opportunities in analyte manipulations and hybrid materials //Chemical Society Reviews. – 2019. – Т. 48. – №. 3. – С. 731-756.
56. Laing S., Gracie K., Faulds K. Multiplex in vitro detection using ГKPC //Chemical Society Reviews. – 2016. – Т. 45. – №. 7. – С. 1901-1918.
57. Halas N. Playing with plasmons: tuning the optical resonant properties of metallic nanoshells //Mrs Bulletin. – 2005. – Т. 30. – №. 5. – С. 362-367.
58. Schlücker S. Surface-Enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications //Angewandte Chemie International Edition. – 2014. – Т. 53. – №. 19. – С. 4756-4795.
59. Kundu S. et al. Enhanced catalytic and ГKPC activities of size-selective Rh NPs on DNA scaffolds //Journal of Materials Chemistry C. – 2017. – Т. 5. – №. 10. – С. 2577-2590.
60. Zettsu N. et al. Synthesis, Stability, and Surface Plasmonic Properties of Rhodium Multipods, and Their Use as Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering //Angewandte Chemie. – 2006. – Т. 118. – №. 8. – С. 1310-1314.
61. Tian Z. Q., Ren B., Wu D. Y. Surface-enhanced Raman scattering: from noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures //The Journal of Physical Chemistry B. – 2002. – Т. 106. – №. 37. – С. 9463-9483.
62. Hunyadi Murph S. E., Coopersmith K. J. Fabrication of silver–rhodium nanomaterials for chemical ТБ-ЧBing applications //Nanocomposites VI: Nanoscience and Nanotechnology in Advanced Composites. – Springer International Publishing, 2019. – С. 95-104.
63. Sangeetha K. et al. Synthesis of ultra-small Rh nanoparticles congregated over DNA for catalysis and ГKPC applications //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2019. – Т. 173. – С. 249-257.

64. Kumaravel S. et al. Engineered Rh Nano-networks on DNA for  $\Gamma$ KPC Applications //Journal of Nanotechnology and Nanomaterials. – 2020. – T. 1. – №. 2. – C. 57-64.
65. Zhang Y., Geddes C. D. Metal-enhanced fluorescence from thermally stable rhodium nanodeposits //Journal of Materials Chemistry. – 2010. – T. 20. – №. 39. – C. 8600-8606.
66. Rodrigues M. P. S. et al. Gold–rhodium nanoflowers for the plasmon-enhanced hydrogen evolution reaction under visible light //ACS catalysis. – 2021. – T. 11. – №. 21. – C. 13543-13555.
67. Akbay N. et al. Metal-enhanced intrinsic fluorescence of nucleic acids using platinum nanostructured substrates //Chemical physics letters. – 2012. – T. 548. – C. 45-50.
68. Chu C. S., Sung T. W., Lo Y. L. Enhanced optical oxygen  $\Gamma$ B- $\Gamma$ Bing property based on Pt (II) complex and metal-coated silica nanoparticles embedded in sol–gel matrix //  $\Gamma$ B- $\Gamma$ Bors and Actuators B: Chemical. – 2013. – T. 185. – C. 287-292.
69. Bigall N. C. et al. Monodisperse platinum nanospheres with adjustable diameters from 10 to 100 nm: synthesis and distinct optical properties //Nano letters. – 2008. – T. 8. – №. 12. – C. 4588-4592.
70. Mafuné F. et al. Formation of stable platinum nanoparticles by laser ablation in water //The Journal of Physical Chemistry B. – 2003. – T. 107. – №. 18. – C. 4218-4223.
71. Cueto M. et al. Platinum nanoparticles as photoactive substrates for mass spectrometry and spectroscopy  $\Gamma$ B- $\Gamma$ Bors //The Journal of Physical Chemistry C. – 2014. – T. 118. – №. 21. – C. 11432-11439.
72. Kim K. et al. Surface-enhanced Raman scattering of 4-aminobenzenethiol in nanogaps between a planar Ag substrate and Pt nanoparticles //The Journal of Physical Chemistry C. – 2011. – T. 115. – №. 27. – C. 13223-13231.
73. Kim K. et al. Surface-enhanced Raman scattering on aggregates of platinum nanoparticles with definite size //The Journal of Physical Chemistry C. – 2010. – T. 114. – №. 43. – C. 18679-18685.
74. Yang, Y.; Huang, Z.; Li, D.; Nogami, M. Solvothermal synthesis of platinum nanoparticles and their  $\Gamma$ KPC properties. 5th International Symposium on Advanced Optical Manufacturing and Testing Technologies: Optoelectronic Materials and Devices for Detector, Imager, Display, and Energy Conversion Technology – SPIE 2010, 22, 116–120. 890
75. Cui L. et al. Shaping and shelling Pt and Pd nanoparticles for ultraviolet laser excited surface-enhanced Raman scattering //The Journal of Physical Chemistry C. – 2008. – T. 112. – №. 45. – C. 17618-17624.
76. Abdelsalam M. E. et al.  $\Gamma$ KPC at structured palladium and platinum surfaces //Journal of the American chemical society. – 2007. – T. 129. – №. 23. – C. 7399-7406.
77. Kämmer E. et al. Evaluation of colloids and activation agents for determination of melamine using UV- $\Gamma$ KPC //The Journal of Physical Chemistry C. – 2012. – T. 116. – №. 10. – C. 6083-6091.

78. Tran M., Whale A., Padalkar S. Exploring the efficacy of platinum and palladium nanostructures for organic molecule detection via Raman spectroscopy //ТБ-ЧBors. – 2018. – Т. 18. – №. 1. – С. 147.
79. Fan Y. et al. Ag@ Pt Core–Shell Nanoparticles for Plasmonic Catalysis //ACS Applied Nano Materials. – 2023.
80. Pang P. et al. UltraТБ-ЧBitive enzyme-free electrochemical immunoТБ-ЧBor for microcystin-LR using molybdenum disulfide/gold nanoclusters nanocomposites as platform and Au@ Pt core-shell nanoparticles as signal enhancer //ТБ-ЧBors and Actuators B: Chemical. – 2018. – Т. 266. – С. 400-407.
81. Proniewicz E., Gralec B., Ozaki Y. Homogeneous P t nanostructures surface functionalized with phenylboronic acid phosphonic acid derivatives as potential biochemical nanoТБ-ЧBors and drugs: ГKPC and TERS studies //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2023.
82. Zhang Y., Geddes C. D. Metal-enhanced fluorescence from thermally stable rhodium nanodeposits //Journal of Materials Chemistry. – 2010. – Т. 20. – №. 39. – С. 8600-8606.
83. Cascio M. G. et al. Lipid metabolism //Am J Clin Nutr. – 2004. – Т. 79. – С. 674-681.
84. Yoon I. et al. Single nanowire on a film as an efficient ГKPC-active platform //Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Т. 131. – №. 2. – С. 758-762.
85. Ranjan M., Facsco S. Anisotropic surface enhanced Raman scattering in nanoparticle and nanowire arrays //Nanotechnology. – 2012. – Т. 23. – №. 48. – С. 485307.
86. Lim D. K. et al. Highly uniform and reproducible surface-enhanced Raman scattering from DNA-tailorable nanoparticles with 1-nm interior gap //Nature nanotechnology. – 2011. – Т. 6. – №. 7. – С. 452-460.
87. Nie S., Emory S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering //science. – 1997. – Т. 275. – №. 5303. – С. 1102-1106.
88. Kneipp K. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles //Applied Spectroscopy. – 2002. – Т. 56. – №. 2. – С. 150-154.
89. Ansari Q. X. P. X. H., Shin Y. G. Q. C. G. Z., Wang D. M. Y. L. Y. A. N. MD Nie S //vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. Nat Biotechnol. – 2008. – Т. 26. – №. 1. – С. 83-90.
90. Rycenga M. et al. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications //Chemical reviews. – 2011. – Т. 111. – №. 6. – С. 3669-3712.
91. He R. X. et al. Effect of the size of silver nanoparticles on ГKPC signal enhancement //Journal of Nanoparticle Research. – 2017. – Т. 19. – №. 8. – С. 267.
92. Lee S. J., Morrill A. R., Moskovits M. Hot spots in silver nanowire bundles for surface-enhanced Raman spectroscopy //Journal of the American Chemical Society. – 2006. – Т. 128. – №. 7. – С. 2200-2201.

93. Fan M., Brolo A. G. Silver nanoparticles self assembly as  $\Gamma$ KPC substrates with near single molecule detection limit //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2009. – T. 11. – №. 34. – C. 7381-7389.
94. Gopal J. et al. Nondestructive detection of the freshness of fruits and vegetables using gold and silver nanoparticle mediated graphene enhanced Raman spectroscopy //ТБ-ЧBors and Actuators B: Chemical. – 2016. – T. 224. – C. 413-424.
95. Craig A. P., Franca A. S., Irudayaraj J. Surface-enhanced Raman spectroscopy applied to food safety //Annual review of food science and technology. – 2013. – T. 4. – C. 369-380.
96. Singh R. et al. Future of Nanotechnology in Food Industry: Challenges in Processing, Packaging, and Food Safety //Global Challenges. – 2023. – C. 2200209.
97. Terry L. R. et al. Applications of surface-enhanced Raman spectroscopy in environmental detection //Analytical Science Advances. – 2022. – T. 3. – №. 3-4. – C. 113-145.
98. Hail C. U. et al. Optical metasurfaces: evolving from passive to adaptive //Advanced Optical Materials. – 2019. – T. 7. – №. 14. – C. 1801786.
99. Meinzer N., Barnes W. L., Hooper I. R. Plasmonic meta-atoms and metasurfaces //Nature photonics. – 2014. – T. 8. – №. 12. – C. 889-898.
100. Gwo S. et al. Nanomanipulation and controlled self-assembly of metal nanoparticles and nanocrystals for plasmonics //Chemical Society Reviews. – 2016. – T. 45. – №. 20. – C. 5672-5716.
101. Gwo S. et al. Plasmonic metasurfaces for nonlinear optics and quantitative  $\Gamma$ KPC //Acs Photonics. – 2016. – T. 3. – №. 8. – C. 1371-1384.
102. Sheng S. Z. et al. Anisotropic Nanoparticle Arrays Guided by Ordered Nanowire Films Enhance Surface-Enhanced Raman Scattering //Advanced Optical Materials. – C. 2201682.
103. Wei H. et al. Polarization dependence of surface-enhanced Raman scattering in gold nanoparticle–nanowire systems //Nano letters. – 2008. – T. 8. – №. 8. – C. 2497-2502.
104. Anwar S. et al. Gold Nanocubes based Optical Detection of HIV-1 DNA via Surface Enhanced Raman Spectroscopy //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2023. – C. 115242.
105. Sadanandan S. et al. Biorecognition elements appended gold nanoparticle bioТБ-ЧBors for the detection of food-borne pathogens-A review //Food Control. – 2022. – C. 109510.
106. Wang Z. et al. Self-assembled monolayer silver nanoparticles: Fano resonance and  $\Gamma$ KPC application //Optics & Laser Technology. – 2023. – T. 157. – C. 108771.
107. Shariat M. Plasma jet printing of silver nanoparticles on polyester fabric as a surface-enhanced Raman scattering substrate //Optik. – 2023. – C. 170698.
108. Avci E. et al. Label-free surface enhanced raman spectroscopy for cancer detection //Cancers. – 2022. – T. 14. – №. 20. – C. 5021.

109. Biswas A. et al. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects //Advances in colloid and interface science. – 2012. – T. 170. – №. 1-2. – C. 2-27.
110. Dhand C. et al. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview //Rsc Advances. – 2015. – T. 5. – №. 127. – C. 105003-105037.
111. Xue X. et al. Review on nanomaterials synthesized by vapor transport method: growth and their related applications //RSC advances. – 2015. – T. 5. – №. 97. – C. 79249-79263.
112. Yang P. et al. Colloidal synthesis and applications of plasmonic metal nanoparticles //Advanced materials. – 2016. – T. 28. – №. 47. – C. 10508-10517.
113. Das R. K. et al. Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects //Nanotechnology for Environmental Engineering. – 2017. – T. 2. – C. 1-21.
114. Ghasemi A. et al. Optical assays based on colloidal inorganic nanoparticles //Analyst. – 2018. – T. 143. – №. 14. – C. 3249-3283.
115. Wu J., Yang H. Platinum-based oxygen reduction electrocatalysts //Accounts of chemical research. – 2013. – T. 46. – №. 8. – C. 1848-1857.
116. Xu L. et al. Size and shape controlled synthesis of rhodium nanoparticles //Heliyon. – 2019. – T. 5. – №. 1. – C. e01165.
117. Hirai H., Nakao Y., Toshima N. Preparation of colloidal rhodium in poly (vinyl alcohol) by reduction with methanol //Journal of Macromolecular Science—Chemistry. – 1978. – T. 12. – №. 8. – C. 1117-1141.
118. Lawal A. T. Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical TB-ЧBors //Talanta. – 2015. – T. 131. – C. 424-443.
119. Long N. V. et al. Highly monodisperse cubic and octahedral rhodium nanocrystals: Their evolutions from sharp polyhedrons into branched nanostructures and surface-enhanced Raman scattering //Journal of crystal growth. – 2011. – T. 320. – №. 1. – C. 78-89.
120. Park J. Y. et al. Tuning of catalytic CO oxidation by changing composition of Rh– Pt bimetallic nanoparticles //Nano letters. – 2008. – T. 8. – №. 2. – C. 673-677.
121. Lim B. et al. Shape-controlled synthesis of Pd nanocrystals in aqueous solutions //Advanced Functional Materials. – 2009. – T. 19. – №. 2. – C. 189-200.
122. Choi S. I. et al. Facile synthesis of rhodium icosahedra with controlled sizes up to 12 nm //ChemNanoMat. – 2016. – T. 2. – №. 1. – C. 61-66.
123. Zhang X. et al. Size-tunable rhodium nanostructures for wavelength-tunable ultraviolet plasmonics //Nanoscale Horizons. – 2016. – T. 1. – №. 1. – C. 75-80.
124. Watson A. M. et al. Rhodium nanoparticles for ultraviolet plasmonics //Nano letters. – 2015. – T. 15. – №. 2. – C. 1095-1100.

125. Lee S. R. et al. Rhodium decahedral nanocrystals: facile synthesis, mechanistic insights, and experimental controls //ChemNanoMat. – 2018. – T. 4. – №. 1. – C. 66-70.
126. Biacchi A. J., Schaak R. E. Ligand-induced fate of embryonic species in the shape-controlled synthesis of rhodium nanoparticles //ACS nano. – 2015. – T. 9. – №. 2. – C. 1707-1720.
127. Koebel M. M., Jones L. C., Somorjai G. A. Preparation of size-tunable, highly monodisperse PVP-protected Pt-nanoparticles by seed-mediated growth //Journal of Nanoparticle Research. – 2008. – T. 10. – C. 1063-1069.
128. Herricks T., Chen J., Xia Y. Polyol synthesis of platinum nanoparticles: control of morphology with sodium nitrate //Nano Letters. – 2004. – T. 4. – №. 12. – C. 2367-2371.
129. Long N. V. et al. The synthesis and characterization of platinum nanoparticles: a method of controlling the size and morphology //Nanotechnology. – 2009. – T. 21. – №. 3. – C. 035605.
130. Luo Y., Sun X. One-step preparation of poly (vinyl alcohol)-protected Pt nanoparticles through a heat-treatment method //Materials Letters. – 2007. – T. 61. – №. 10. – C. 2015-2017.
131. Maicu M. et al. Synthesis and deposition of metal nanoparticles by gas condensation process //Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films. – 2014. – T. 32. – №. 2. – C. 02B113.
132. Pedone D. et al. Platinum nanoparticles in nanobiomedicine //Chemical Society Reviews. – 2017. – T. 46. – №. 16. – C. 4951-4975.
133. Fazio E. et al. Nanoparticles engineering by pulsed laser ablation in liquids: concepts and applications //Nanomaterials. – 2020. – T. 10. – №. 11. – C. 2317.
134. Zhang D., Gokce B., Barcikowski S. Laser synthesis and processing of colloids: fundamentals and applications //Chemical reviews. – 2017. – T. 117. – №. 5. – C. 3990-4103.
135. Fazio E. et al. Optical limiting effects in linear carbon chains //Carbon. – 2011. – T. 49. – №. 1. – C. 306-310.
136. Volpato G. A. et al. Clean rhodium nanoparticles prepared by laser ablation in liquid for high performance electrocatalysis of the hydrogen evolution reaction //Nanoscale Advances. – 2019. – T. 1. – №. 11. – C. 4296-4300.
137. Zhang J., Chaker M., Ma D. Pulsed laser ablation based synthesis of colloidal metal nanoparticles for catalytic applications //Journal of colloid and interface science. – 2017. – T. 489. – C. 138-149.
138. Kishida M. et al. Preparation of silica-coated rhodium nanoparticles using water-in-oil microemulsion //Chemistry Letters. – 2000. – T. 29. – №. 9. – C. 1108-1109.
139. Gautam A., Guleria P., Kumar V. Platinum nanoparticles: Synthesis strategies and applications //Nanoarchitectonics. – 2020. – C. 70-86.
140. Jeyaraj M. et al. A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles //Nanomaterials. – 2019. – T. 9. – №. 12. – C. 1719.

141. Liu H. et al. Fine platinum nanoparticles supported on a porous ceramic membrane as efficient catalysts for the removal of benzene //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 16589.
142. Prasetya O. D., Khumaeni A. Synthesis of colloidal platinum nanoparticles using pulse laser ablation method //AIP Conference Proceedings. – AIP Publishing LLC, 2018. – T. 2014. – №. 1. – C. 020050.
143. Cueto M. et al. Platinum nanoparticles prepared by laser ablation in aqueous solutions: fabrication and application to laser desorption ionization //The Journal of Physical Chemistry C. – 2011. – T. 115. – №. 45. – C. 22217-22224.
144. Mafuné F., Kondow T. Selective laser fabrication of small nanoparticles and nano-networks in solution by irradiation of UV pulsed laser onto platinum nanoparticles //Chemical physics letters. – 2004. – T. 383. – №. 3-4. – C. 343-347.
145. Dobrzański L. A. et al. Synthesis of Pt nanowires with the participation of physical vapour deposition //Open Physics. – 2016. – T. 14. – №. 1. – C. 159-165.
146. Hu X. et al. Au@ PtAg core/shell nanorods: tailoring enzyme-like activities via alloying //RSC advances. – 2013. – T. 3. – №. 17. – C. 6095-6105.
147. Kumari S., Tyagi M., Jagadevan S. Mechanistic removal of environmental contaminants using biogenic nano-materials //International Journal of Environmental Science and Technology. – 2019. – T. 16. – C. 7591-7606.
- 148 Ali M. A. et al. Advancements in plant and microbe-based synthesis of metallic nanoparticles and their antimicrobial activity against plant pathogens //Nanomaterials. – 2020. – T. 10. – №. 6. – C. 1146.
149. Li X. et al. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications //Journal of nanomaterials. – 2011. – T. 2011. – C. 1-16.
150. Tamaoki K. et al. Microbial recovery of rhodium from dilute solutions by the metal ion-reducing bacterium *Shewanella algae* //Hydrometallurgy. – 2013. – T. 139. – C. 26-29.
151. Srivastava S. K., Constanti M. Room temperature biogenic synthesis of multiple nanoparticles (Ag, Pd, Fe, Rh, Ni, Ru, Pt, Co, and Li) by *Pseudomonas aeruginosa* SM1 //Journal of Nanoparticle Research. – 2012. – T. 14. – C. 1-10.
152. Dobrucka R. Synthesis and structural characteristic of platinum nanoparticles using herbal *bidens tripartitus* extract //Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. – 2016. – T. 26. – C. 219-225.
153. Thirumurugan A. et al. Green synthesis of platinum nanoparticles using *Azadirachta indica*–An eco-friendly approach //Materials Letters. – 2016. – T. 170. – C. 175-178.
154. Al-Radadi N. S. Green synthesis of platinum nanoparticles using Saudi's Dates extract and their usage on the cancer cell treatment //Arabian journal of chemistry. – 2019. – T. 12. – №. 3. – C. 330-349.
155. Mavukkandy M. O. et al. A clean-green synthesis of platinum nanoparticles utilizing a pernicious weed *lantana* (*Lantana Camara*) //Am. J. Eng. Applied Sci. – 2016. – T. 9. – C. 84-90.

156. Velmurugan P. et al. Prunus× yedoensis tree gum mediated synthesis of platinum nanoparticles with antifungal activity against phytopathogens //Materials letters. – 2016. – T. 174. – C. 61-65.
157. Rokade S. S. et al. Novel anticancer platinum and palladium nanoparticles from Barleria prionitis //Global journal of nanomedicine. – 2017. – T. 2. – №. 5. – C. 555600.
158. Vinod V. T. P. et al. A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid gum kondagogu (Cochlospermum gossypium) //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2011. – T. 83. – №. 2. – C. 291-298.1106
159. Shen D. S., Philip D., Mathew J. Synthesis of platinum nanoparticles using dried Anacardium occidentale leaf and its catalytic and thermal applications //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2013. – T. 114. – C. 267-271.
161. Zheng B. et al. Plant-mediated synthesis of platinum nanoparticles and its bioreductive mechanism //Journal of Colloid and Interface Science. – 2013. – T. 396. – C. 138-145.
162. Dauthal P., Mukhopadhyay M. Biofabrication, characterization, and possible bio-reduction mechanism of platinum nanoparticles mediated by agro-industrial waste and their catalytic activity //Journal of Industrial and Engineering Chemistry. – 2015. – T. 22. – C. 185-191.
163. Lim S. K. et al. Surface-plasmon resonance of Ag nanoparticles in polyimide //Journal of applied physics. – 2005. – T. 98. – №. 8. – C. 084309.
164. Kibis L. S. et al. The investigation of oxidized silver nanoparticles prepared by thermal evaporation and radio-frequency sputtering of metallic silver under oxygen //Applied surface science. – 2010. – T. 257. – №. 2. – C. 404-413.
165. Pingali K. C., Rockstraw D. A., Deng S. Silver nanoparticles from ultrasonic spray pyrolysis of aqueous silver nitrate //Aerosol Science and Technology. – 2005. – T. 39. – №. 10. – C. 1010-1014.
166. Kodu M. et al. Highly TB-ЧBitive NO2 TB-ЧBors by pulsed laser deposition on graphene //Applied Physics Letters. – 2016. – T. 109. – №. 11. – C. 113108.
167. Henglein A., Giersig M. Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of citrate //The Journal of Physical Chemistry B. – 1999. – T. 103. – №. 44. – C. 9533-9539.
168. Pillai Z. S., Kamat P. V. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? //The Journal of Physical Chemistry B. – 2004. – T. 108. – №. 3. – C. 945-951.
169. Lee P. C., Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols //The Journal of Physical Chemistry. – 1982. – T. 86. – №. 17. – C. 3391-3395.
170. Matulaitienė I. Adsorbuotų ant metalo paviršiaus monosluoksnių su piridinio funkcinė grupe struktūros ir sąveikos su tirpalo komponentais tyrimas virpesinės spektroskopijos metodais. – 2014.
171. Eisa W. H. et al. Gamma-irradiation assisted seeded growth of Ag nanoparticles within PVA matrix //Materials Chemistry and Physics. – 2011. – T. 128. – №. 1-2. – C. 109-113.

172. Kondeti V. S. S. K. et al. Ag<sup>+</sup> reduction and silver nanoparticle synthesis at the plasma–liquid interface by an RF driven atmospheric pressure plasma jet: Mechanisms and the effect of surfactant //Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films. – 2017. – T. 35. – №. 6. – C. 061302.
173. Zhang Y. T., Guo Y., Ma T. C. Plasma catalytic synthesis of silver nanoparticles //Chinese Physics Letters. – 2011. – T. 28. – №. 10. – C. 105201.
174. Lee H. et al. Preparation of nonaggregated silver nanoparticles by the liquid phase plasma reduction method //Journal of Materials Research. – 2013. – T. 28. – №. 8. – C. 1105-1110.
175. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold //Discussions of the Faraday Society. – 1951. – T. 11. – C. 55-75.
176. Kimling J. et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited //The Journal of Physical Chemistry B. – 2006. – T. 110. – №. 32. – C. 15700-15707.
177. Lee G. J. et al. Optical assessment of chiral–achiral polymer blends based on surface plasmon resonance effects of gold nanoparticles //Journal of Physics D: Applied Physics. – 2019. – T. 53. – №. 9. – C. 095102.
178. De Souza C. D., Nogueira B. R., Rostelato M. E. C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction //Journal of Alloys and Compounds. – 2019. – T. 798. – C. 714-740.
179. Dragieva I. D., Stoynov Z. B., Klabunde K. J. Synthesis of nanoparticles by borohydride reduction and their applications //Scripta materialia. – 2001. – T. 44. – №. 8-9. – C. 2187-2191.
180. Mavani K., Shah M. Synthesis of silver nanoparticles by using sodium borohydride as a reducing agent //International Journal of Engineering Research & Technology. – 2013. – T. 2. – №. 3. – C. 1-5.
181. Seney C. S., Gutzman B. M., Goddard R. H. Correlation of size and surface-enhanced Raman scattering activity of optical and spectroscopic properties for silver nanoparticles //The Journal of Physical Chemistry C. – 2009. – T. 113. – №. 1. – C. 74-80.
182. Dahlin A. B. et al. Electrochemical plasmonic ТБ-ЧBors //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2012. – T. 402. – C. 1773-1784.
183. Lopes M. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering on gold nanowire arrays //ГКPC Roundtable. – 2006.. Phys. Lett., 2006, 422, 303–307.
184. Tan B. J. Y. et al. Fabrication of size-tunable gold nanoparticles array with nanosphere lithography, reactive ion etching, and thermal annealing //The Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – T. 109. – №. 22. – C. 11100-11109.
185. Nikolov A. S. et al. Characterization of Ag and Au nanoparticles created by nanosecond pulsed laser ablation in double distilled water //Applied Surface Science. – 2011. – T. 257. – №. 12. – C. 5278-5282.

186. Nguyen, L. N.; Lamichhane, P.; Choi, E. H.; Lee, G. J. Structural and optical properties of nonthermal atmospheric plasma-synthesized polyethylene glycol-functionalized gold nanoparticles. *Nanomaterials* 2021, 11, 1678.
187. Nguyen L. N. et al. Structural and optical properties of nonthermal atmospheric plasma-synthesized polyethylene glycol-functionalized gold nanoparticles // *Nanomaterials*. – 2021. – T. 11. – №. 7. – C. 1678.
188. Nilghaz A. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy substrates for food safety and quality analysis // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2022. – T. 70. – №. 18. – C. 5463-5476.
189. Gao Q. et al. Gold nanoparticles in cancer theranostics // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2021. – T. 9. – C. 647905.
190. King M. E., Guzman M. V. F., Ross M. B. Material strategies for function enhancement in plasmonic architectures // *Nanoscale*. – 2022. – T. 14. – №. 3. – C. 602-611.
191. Azharuddin M. et al. A repertoire of biomedical applications of noble metal nanoparticles // *Chemical Communications*. – 2019. – T. 55. – №. 49. – C. 6964-6996.
192. Mauriz E., Lechuga L. M. Plasmonic biosensors for single-molecule biomedical analysis // *Biosensors*. – 2021. – T. 11. – №. 4. – C. 123.
193. Alula M. T. et al. Identification and quantitation of pathogenic bacteria via in-situ formation of silver nanoparticles on cell walls, and their detection via FRET // *Microchimica Acta*. – 2017. – T. 184. – C. 219-227.
194. Wang J. et al. Trimer structures formed by target-triggered AuNPs self-assembly inducing electromagnetic hot spots for FRET-fluorescence dual-signal detection of intracellular miRNAs // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2023. – C. 115051.
195. Jahangirian H. et al. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine // *International journal of nanomedicine*. – 2017. – T. 12. – C. 2957.
196. Basman C. et al. Antiplatelet and anticoagulation therapy during percutaneous coronary interventions: A review for the interventionalist // *Journal of Interventional Cardiology*. – 2018. – T. 31. – №. 5. – C. 693-704.
197. Casscells W., Naghavi M., Willerson J. T. Vulnerable atherosclerotic plaque: a multifocal disease // *Circulation*. – 2003. – T. 107. – №. 16. – C. 2072-2075.
198. Orme R., Judge H. M., Storey R. F. Monitoring antiplatelet therapy // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – Thieme Medical Publishers, 2017. – T. 43. – №. 03. – C. 311-319.
199. Farag M., Gorog D. A. Platelet function testing: a role for personalised therapy in coronary disease // *Current Pharmaceutical Design*. – 2017. – T. 23. – №. 9. – C. 1315-1327.
200. Gremmel T. et al. Prasugrel reduces agonists' inducible platelet activation and leukocyte-platelet interaction more efficiently than clopidogrel // *Cardiovascular Therapeutics*. – 2013. – T. 31. – №. 5. – C. e40-e45.

201. Kneipp K. et al. Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (ГКРС) //Physical Review E. – 1998. – Т. 57. – №. 6. – С. R6281.
202. Lin C. C. et al. A filter-like AuNPs@ MS ГКРС substrate for Staphylococcus aureus detection //BioТБ-ЧBors and Bioelectronics. – 2014. – Т. 53. – С. 519-527.
203. Xie C. et al. Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy //Analytical chemistry. – 2005. – Т. 77. – №. 14. – С. 4390-4397.
204. Lu Y., Huang Q. Label-free selective detection of coralyne due to aptamer–coralyne interaction using DNA modified SiO<sub>2</sub>@ Au core–shell nanoparticles as an effective ГКРС substrate //Analytical Methods. – 2013. – Т. 5. – №. 16. – С. 3927-3932.
205. Boyd A. R., Burke G. A., Meenan B. J. Monitoring cellular behaviour using Raman spectroscopy for tissue engineering and regenerative medicine applications //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2010. – Т. 21. – С. 2317-2324.
206. Qian X. M., Nie S. M. Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications //Chemical Society Reviews. – 2008. – Т. 37. – №. 5. – С. 912-920.
207. Jaworska A. et al. Potential of surface enhanced Raman spectroscopy (ГКРС) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review //BioТБ-ЧBors. – 2016. – Т. 6. – №. 3. – С. 47.
208. Wang Y. et al. Quantitative molecular phenotyping with topically applied ГКРС nanoparticles for intraoperative guidance of breast cancer lumpectomy //Scientific reports. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-12.
209. Perozziello G. et al. A microfluidic dialysis device for complex biological mixture ГКРС analysis //Microelectronic Engineering. – 2015. – Т. 144. – С. 37-41.
210. Stetciura I. Y. et al. Composite ГКРС-based satellites navigated by optical tweezers for single cell analysis //Analyst. – 2015. – Т. 140. – №. 15. – С. 4981-4986.
211. Okpalugo T. I. T. et al. Platelet adhesion on silicon modified hydrogenated amorphous carbon films //Biomaterials. – 2004. – Т. 25. – №. 2. – С. 239-245.
212. Chen P. et al. Laser Raman detection of platelet as a non-invasive approach for early and differential diagnosis of Alzheimer's disease //Laser Physics Letters. – 2011. – Т. 8. – №. 7. – С. 547-552.
213. Walsh G. M. et al. S-Nitrosylation of platelet  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 as revealed by raman spectroscopy //Biochemistry. – 2007. – Т. 46. – №. 21. – С. 6429-6436.
214. García-Rubio D. L. et al. Analysis of platelets in hypertensive and normotensive individuals using Raman and Fourier transform infrared-attenuated total reflectance spectroscopies //Journal of Raman Spectroscopy. – 2019. – Т. 50. – №. 4. – С. 509-521.
215. Cyrus T. et al. Intramural delivery of rapamycin with  $\alpha$ v $\beta$ 3-targeted paramagnetic nanoparticles inhibits stenosis after balloon injury //Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2008. – Т. 28. – №. 5. – С. 820-826.

216. Kim J. et al. Targeted delivery of nanoparticles to ischemic muscle for imaging and therapeutic angiogenesis //Nano letters. – 2011. – T. 11. – №. 2. – C. 694-700.
217. Gupta M. K. et al. Recent strategies to design vascular theranostic nanoparticles //Nanotheranostics. – 2017. – T. 1. – №. 2. – C. 166.
218. Barkur S., Chidangil S. Surface-enhanced Raman spectroscopy study of red blood cells and platelets //Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2019. – T. 37. – №. 4. – C. 1090-1098.
219. Joseph M. M. et al. Exploring the margins of SERS in practical domain: An emerging diagnostic modality for modern biomedical applications //Biomaterials. – 2018. – T. 181. – C. 140-181.
220. Atkins C. G. et al. Raman spectroscopy of blood and blood components //Applied spectroscopy. – 2017. – T. 71. – №. 5. – C. 767-793.
221. Aslanian D. et al. Resonance Raman spectrometric study of human blood platelets //Febs Letters. – 1979. – T. 101. – №. 1. – C. 39-42.
222. ASLANIAN D., VAINER H., GUESDON J. P. Thermotropic state transition in isolated platelet membranes studied by Raman spectroscopy //European journal of biochemistry. – 1983. – T. 131. – №. 3. – C. 555-558.
223. Okpalugo T. I. T. et al. Platelet adhesion on silicon modified hydrogenated amorphous carbon films //Biomaterials. – 2004. – T. 25. – №. 2. – C. 239-245.
224. Wang G. W. et al. Raman micro-spectroscopy of single blood platelets //Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu. – 2007. – T. 27. – №. 7. – C. 1347-1350.
225. Luo Y. et al. Laser Raman detection of platelets for early and differential diagnosis of Alzheimer's disease based on an adaptive Gaussian process classification algorithm //Laser Physics. – 2013. – T. 23. – №. 4. – C. 045603.
226. Chen P. et al. Laser Raman detection of platelet as a non-invasive approach for early and differential diagnosis of Alzheimer's disease //Laser Physics Letters. – 2011. – T. 8. – №. 7. – C. 547-552.
227. Coté G. L., Kameoka J., Marks H. Using micro and nanofluidics with surface enhanced Raman spectroscopy for in vitro blood based biomarker detection //Translational Biophotonics. – SPIE, 2014. – T. 9155. – C. 91550E.
228. González A. L. et al. Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles //The Journal of Physical Chemistry C. – 2014. – T. 118. – №. 17. – C. 9128-9136.
229. Swapna M. S. et al. Raman spectroscopic and fractal analysis of blood samples of dengue fever patients //Bio-medical Materials and Engineering. – 2018. – T. 29. – №. 6. – C. 787-797.
230. Manago S. et al. Internalization kinetics and cytoplasmic localization of functionalized diatomite nanoparticles in cancer cells by Raman imaging //Journal of biophotonics. – 2018. – T. 11. – №. 4. – C. e201700207.

231. Baglia F. A., Walsh P. N. Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor XI activation by thrombin //Biochemistry. – 1998. – T. 37. – №. 8. – C. 2271-2281.
233. Mahmoodi N. O., Ghavidast A., Amirmahani N. A comparative study on the nanoparticles for improved drug delivery systems //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2016. – T. 162. – C. 681-693.
234. Deb S. et al. Surface tunability of nanoparticles in modulating platelet functions //Blood Cells, Molecules, and Diseases. – 2012. – T. 48. – №. 1. – C. 36-44.
235. Kneipp K. et al. Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS) //Physical Review E. – 1998. – T. 57. – №. 6. – C. R6281
236. Lin C. C. et al. A new protein A assay based on Raman reporter labeled immunogold nanoparticles //BioТБ-ЧBors and Bioelectronics. – 2008. – T. 24. – №. 2. – C. 178-183.
237. Alexandre M. T. A. et al. Probing the carotenoid content of intact Cyclotella cells by resonance Raman spectroscopy //Photosynthesis research. – 2014. – T. 119. – C. 273-281.
238. Scully M. O. et al. FAST CARS: Engineering a laser spectroscopic technique for rapid identification of bacterial spores //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99. – №. 17. – C. 10994-11001
239. Xie C., Chen D., Li Y. Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers //Optics letters. – 2005. – T. 30. – №. 14. – C. 1800-1802
240. Liu Y. et al. Label and label-free based surface-enhanced Raman scattering for pathogen bacteria detection: A review //BioТБ-ЧBors and Bioelectronics. – 2017. – T. 94. – C. 131-140
241. Schuster K. C., Urlaub E., Gapes J. R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture //Journal of Microbiological Methods. – 2000. – T. 42. – №. 1. – C. 29-38.
242. Premasiri W. R. et al. Characterization of the surface enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria //The journal of physical chemistry B. – 2005. – T. 109. – №. 1. – C. 312-320), с высокой степенью чувствительности (Qian X. et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags //Nature biotechnology. – 2008. – T. 26. – №. 1. – C. 83-90.
243. Jarvis R. M., Goodacre R. Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy //Analytical chemistry. – 2004. – T. 76. – №. 1. – C. 40-47.
244. Cao Y. W. C., Jin R., Mirkin C. A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection //Science. – 2002. – T. 297. – №. 5586. – C. 1536-1540
245. Hidi I. J. et al. Lab-on-a-chip-surface enhanced Raman scattering combined with the standard addition method: toward the quantification of nitroxoline in spiked human urine samples //Analytical chemistry. – 2016. – T. 88. – №. 18. – C. 9173-9180.

246. Wang S. et al. Evidence aggregation for answer re-ranking in open-domain question answering //arXiv preprint arXiv:1711.05116. – 2017.; Perozziello G. et al. Microfluidics & nanotechnology: towards fully integrated analytical devices for the detection of cancer biomarkers //RSC Advances. – 2014. – T. 4. – №. 98. – C. 55590-55598.
247. Büchner T. et al. Relating surface-enhanced Raman scattering signals of cells to gold nanoparticle aggregation as determined by LA-ICP-MS micromapping //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2014. – T. 406. – C. 7003-7014
248. Cheong Y. et al. Rapid label-free identification of *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistant strains by the drop-coating deposition surface-enhanced Raman scattering method //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2017. – T. 183. – C. 53-59]
249. E. Coli, S. Cohnii (Kahraman M. et al. Convective assembly of bacteria for surface-enhanced Raman scattering //Langmuir. – 2008. – T. 24. – №. 3. – C. 894-901.
250. Drake P. et al. Raman based detection of *Staphylococcus aureus* utilizing single domain antibody coated nanoparticle labels and magnetic trapping //Analytical Methods. – 2013. – T. 5. – №. 16. – C. 4152-4158.
251. Qu L. L. et al. Highly selective and sensitive surface enhanced Raman scattering nanoSERS for detection of hydrogen peroxide in living cells //BioSERS and Bioelectronics. – 2016. – T. 77. – C. 292-298]
252. Huang M. et al. Phonon softening and crystallographic orientation of strained graphene studied by Raman spectroscopy //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – T. 106. – №. 18. – C. 7304-7308.;
253. Pazos-Perez N. et al. UltraSERS multiplex optical quantification of bacteria in large samples of biofluids //Scientific Reports. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 1-10.
254. Mühlhig A. et al. LOC-SERS: a promising closed system for the identification of mycobacteria //Analytical chemistry. – 2016. – T. 88. – №. 16. – C. 7998-8004.)
255. Stöckel S. et al. The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms //Journal of Raman Spectroscopy. – 2016. – T. 47. – №. 1. – C. 89-109
256. Lorenz B. et al. Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria //Trends in microbiology. – 2017. – T. 25. – №. 5. – C. 413-424.
257. Neumann A. C. et al. Identifying dormant growth state of mycobacteria by orthogonal analytical approaches on a single cell and ensemble basis //Analytical chemistry. – 2018. – T. 91. – №. 1. – C. 881-887
258. Rivera-Betancourt O. E. et al. Identification of mycobacteria based on spectroscopic analyses of mycolic acid profiles //Analyst. – 2013. – T. 138. – №. 22. – C. 6774-6785.

259. Sathyavathi R. et al. Raman spectroscopy provides a powerful, rapid diagnostic tool for the detection of tuberculous meningitis in ex vivo cerebrospinal fluid samples //Journal of biophotonics. – 2013. – T. 6. – №. 8. – C. 567-572
260. Owens N. A. et al. Handheld Raman spectrometer instrumentation for quantitative tuberculosis biomarker detection: a performance assessment for point-of-need infectious disease diagnostics //Applied Spectroscopy. – 2018. – T. 72. – №. 7. – C. 1104-1115
261. Jennings G. K. et al. Spin equilibrium and O<sub>2</sub>-binding kinetics of Mycobacterium tuberculosis CYP51 with mutations in the histidine–threonine dyad //Journal of inorganic biochemistry. – 2014. – T. 136. – C. 81-91
262. Crawford A. C. et al. Detection of the tuberculosis antigenic marker mannose-capped lipoarabinomannan in pretreated serum by surface-enhanced Raman scattering //Analyst. – 2017. – T. 142. – №. 1. – C. 186-196.
263. Owens N. A. et al. Handheld Raman spectrometer instrumentation for quantitative tuberculosis biomarker detection: a performance assessment for point-of-need infectious disease diagnostics //Applied Spectroscopy. – 2018. – T. 72. – №. 7. – C. 1104-1115.
264. Owens D. K. et al. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement //Jama. – 2019. – T. 322. – №. 7. – C. 652-665
265. Perumal J. et al. Identification of mycolic acid forms using surface-enhanced Raman scattering as a fast detection method for tuberculosis //International Journal of Nanomedicine. – 2018. – T. 13. – C. 6029
266. Robinson A. M. et al. The development of “fab-chips” as low-cost, TB-compatible surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrates for analytical applications //Analyst. – 2015. – T. 140. – №. 3. – C. 779-785
267. Karaballi R. A. et al. Development of an electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) aptaTB-compatible for direct detection of DNA hybridization //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2015. – T. 17. – №. 33. – C. 21356-21363.
268. Zhou X. et al. Bacteria detection: from powerful SERS to its advanced compatible techniques //Advanced Science. – 2020. – T. 7. – №. 23. – C. 2001739.
269. Perumal J. et al. Towards a point-of-care SERS TB-compatible for biomedical and agri-food analysis applications: A review of recent advancements //Nanoscale. – 2021. – T. 13. – №. 2. – C. 553-580
270. Alula M. T. et al. Identification and quantitation of pathogenic bacteria via in-situ formation of silver nanoparticles on cell walls, and their detection via SERS //Microchimica Acta. – 2017. – T. 184. – C. 219-227.
271. Kote J. R. et al. Antimycobacterial, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Mesoporous Nickel Oxide Nanoparticles for Healthcare //Coatings. – 2020. – T. 10. – №. 12. – C. 1242.

272. Kumar S. et al. Rapid detection of bacterial infection and viability assessment with high specificity and sensitivity using Raman microspectroscopy //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2020. – T. 412. – C. 2505-2516.
273. Robert H. M. et al. Spectroscopic (IR, Raman, UV, NMR) characterization and investigation of reactive properties of pyrazine-2-carboxamide by anti-bacterial, anti-mycobacterial, Fukui function, molecular docking and DFT calculations //Chemical Data Collections. – 2020. – T. 30. – C. 100583.
274. Verma A. K., Soni R. K. Silver nanodendrites for ultralow detection of thiram based on surface-enhanced Raman spectroscopy //Nanotechnology. – 2019. – T. 30. – №. 38. – C. 385502
275. Thomas R. et al. Synthesis and spectroscopic study of two new pyrazole derivatives with detailed computational evaluation of their reactivity and pharmaceutical potential //Journal of Molecular Structure. – 2019. – T. 1181. – C. 599-612
276. Rawat P. et al. Antimycobacterial, antimicrobial activity, experimental (FT-IR, FT-Raman, NMR, UV-Vis, DSC) and DFT (transition state, chemical reactivity, NBO, NLO) studies on pyrrole-isonicotinyl hydrazone //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2017. – T. 179. – C. 1-10.
277. Maheswari R., Manjula J. Vibrational spectroscopic analysis and molecular docking studies of (E)-4-methoxy-N'-(4-methylbenzylidene) benzohydrazide by DFT //Journal of Molecular Structure. – 2016. – T. 1115. – C. 144-155.
278. Ulahannan R. T. et al. Molecular structure, FT-IR, FT-Raman, NBO, HOMO and LUMO, MEP, NLO and molecular docking study of 2-[(E)-2-(2-bromophenyl) ethenyl] quinoline-6-carboxylic acid //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. – T. 151. – C. 184-197).
279. Wang L. et al. Machine learning analysis of SERS fingerprinting for the rapid determination of Mycobacterium tuberculosis infection and drug resistance //Computational and structural biotechnology journal. – 2022. – T. 20. – C. 5364-5377.
280. Xia J. et al. Analysis and classification of oral tongue squamous cell carcinoma based on Raman spectroscopy and convolutional neural networks //Journal of Modern Optics. – 2020. – T. 67. – №. 6. – C. 481-489.
281. Brücher H., Knolmayer G., Mittermayer M. A. Document classification methods for organizing explicit knowledge. – 2002.
282. Lakshmanan M. K., Boelt B., Gislum R. A chemometric method for the viability analysis of spinach seeds by near infrared spectroscopy with variable selection using successive projections algorithm //Journal of Near Infrared Spectroscopy. – 2023. – T. 31. – №. 1. – C. 24-32.
283. Riva M. et al. Glioma biopsies classification using Raman spectroscopy and machine learning models on fresh tissue samples //Cancers. – 2021. – T. 13. – №. 5. – C. 1073.

284. Zuvela P. et al. Fiber-optic Raman spectroscopy with nature-inspired genetic algorithms enhances real-time in vivo detection and diagnosis of nasopharyngeal carcinoma //Analytical chemistry. – 2019. – T. 91. – №. 13. – C. 8101-8108.
285. Helin R. et al. On the possible benefits of deep learning for spectral preprocessing //Journal of Chemometrics. – 2022. – T. 36. – №. 2. – C. e3374.
286. LeCun Y. et al. Gradient-based learning applied to document recognition //Proceedings of the IEEE. – 1998. – T. 86. – №. 11. – C. 2278-2324.
287. Næs T. et al. Artificial neural networks in multivariate calibration //Journal of Near Infrared Spectroscopy. – 1993. – T. 1. – №. 1. – C. 1-11.
288. Liu J. et al. Deep convolutional neural networks for Raman spectrum recognition: a unified solution //Analyst. – 2017. – T. 142. – №. 21. – C. 4067-4074.
289. Acquarelli J. et al. Convolutional neural networks for vibrational spectroscopic data analysis //Analytica chimica acta. – 2017. – T. 954. – C. 22-31.
290. Bocklitz T. et al. How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models? //Analytica chimica acta. – 2011. – T. 704. – №. 1-2. – C. 47-56.
291. Dong J. et al. A practical convolutional neural network model for discriminating Raman spectra of human and animal blood //Journal of Chemometrics. – 2019. – T. 33. – №. 11. – C. e3184.
292. Shorten C., Khoshgoftaar T. M. A survey on image data augmentation for deep learning //Journal of big data. – 2019. – T. 6. – №. 1. – C. 1-48.
293. Perez F. et al. Data augmentation for skin lesion analysis //OR 2.0 Context-Aware Operating Theaters, Computer Assisted Robotic Endoscopy, Clinical Image-Based Procedures, and Skin Image Analysis: First International Workshop, OR 2.0 2018, 5th International Workshop, CARE 2018, 7th International Workshop, CLIP 2018, Third International Workshop, ISIC 2018, Held in Conjunction with MICCAI 2018, Granada, Spain, September 16 and 20, 2018, Proceedings 5. – Springer International Publishing, 2018. – C. 303-311..
294. Bengio Y., Grandvalet Y. No unbiased estimator of the variance of k-fold cross-validation //Advances in Neural Information Processing Systems. – 2003. – T. 16.
295. Beleites C. et al. Variance reduction in estimating classification error using sparse datasets //Chemometrics and intelligent laboratory systems. – 2005. – T. 79. – №. 1-2. – C. 91-100.
296. Ruiz-Chica A. J. et al. Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine–cytosine and adenine–thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine //Journal of Raman spectroscopy. – 2004. – T. 35. – №. 2. – C. 93-100.
297. Wu X. et al. Rapid and accurate identification of colon cancer by Raman spectroscopy coupled with convolutional neural networks //Japanese Journal of Applied Physics. – 2021. – T. 60. – №. 6. – C. 067001.

298. Guo S. et al. Common mistakes in cross-validating classification models //Analytical Methods. – 2017. – T. 9. – №. 30. – C. 4410-4417.
299. K. Yee, "Numerical solution of initial boundary value problems involving maxwell's equations in isotropic media," IEEE Transactions on Antennas and Propagation 14 (3), 302–307 (1966)
300. Sullivan D. M. Electromagnetic simulation using the FDTD method. – John Wiley & Sons, 2013.
301. Taflove A., Hagness S. C., Picket-May M. Computational electromagnetics: the finite-difference time-domain method //The Electrical Engineering Handbook. – 2005. – T. 3. – C. 629-670.
302. McCreery R. L. Raman spectroscopy for chemical analysis. – John Wiley & Sons, 2005.
303. Stiles P. L. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy //Annu. Rev. Anal. Chem. – 2008. – T. 1. – C. 601-626.
304. Le Ru E. C., Etchegoin P. G. Rigorous justification of the  $|E|^4$  enhancement factor in surface enhanced Raman spectroscopy //chemical Physics letters. – 2006. – T. 423. – №. 1-3. – C. 63-66.
305. Zyubin A. et al. Spectral homogeneity of human platelets investigated by SERS //Plos one. – 2022. – T. 17. – №. 5. – C. e0265247.
306. Helin R. et al. On the possible benefits of deep learning for spectral preprocessing //Journal of Chemometrics. – 2022. – T. 36. – №. 2. – C. e3374.
307. Kimling J. et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited //The Journal of Physical Chemistry B. – 2006. – T. 110. – №. 32. – C. 15700-15707
308. Matveeva K. et al. Spectral and time-resolved photoluminescence of human platelets doped with platinum nanoparticles //Plos one. – 2021. – T. 16. – №. 9. – C. e0256621
309. Greben K. et al. Immobilization and surface functionalization of gold nanoparticles monitored via streaming current/potential measurements //The Journal of Physical Chemistry B. – 2015. – T. 119. – №. 19. – C. 5988-5994.
310. Kyaw H. H. et al. Self-organization of gold nanoparticles on silanated surfaces //Beilstein journal of nanotechnology. – 2015. – T. 6. – №. 1. – C. 2345-2353
311. Barmina E. V. et al. Laser control of the properties of nanostructures on Ta and Ni under their ablation in liquids //Journal of optoelectronics and advanced materials. – 2010. – T. 12. – №. 3. – C. 495.
312. Schaaf P. (ed.). Laser processing of materials: fundamentals, applications and developments. – Springer Science & Business Media, 2010. – T. 139.].
313. Maier S. A. et al. Plasmonics: fundamentals and applications. – New York : springer, 2007. – T. 1. – C. 245.).
314. Surface plasmon resonance tuning in gold film on silver nanospheres through optical absorption //ТБ-ЧБing and Bio-ТБ-ЧБing Research. – 2020. – T. 30. – C. 100374 .

315. N. S. Tikhomirova, I. G. Samusev, V. A. Slezhkin, A. Y. Zyubin, and V. V. Bryukhanov, “Plasmon processes of electronic energy transfer to adsorbed rhodamine 6G during clustering of silver nanoparticles on the surface of macroporous silica,” *J. Appl. Spectrosc.* 84(2), 261–267 (2017). [CrossRef]
316. E. Konstantinova, A. Zyubin, E. Moiseeva, K. Matveeva, V. Slezhkin, I. Samusev, and V. Bryukhanov, “Application of quantum dots CdZnSeS/ZnS luminescence, enhanced by plasmons of silver rough surface for detection of albumin in blood facies of infected person,” In *Biophotonics—Riga 2017* (International Society for Optics and Photonics), vol. 10592, p. 105920C (2017).
317. Chen P. et al. Laser Raman detection of platelet as a non-invasive approach for early and differential diagnosis of Alzheimer's disease // *Laser Physics Letters*. – 2011. – T. 8. – №. 7. – C. 547-552.
318. Zyubin A., Kon I., Tcibulnikova A., Matveeva K., Khankaev A., Myslitskaya N., et al., “Numerical FDTD-based simulations and Raman experiments of femtosecond LIPSS,” *Opt. Express* 29(3), 4547–4558 (2021)
319. e Ru E., Blackie E., Meyer M., Etchegoin P.,. “Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study“. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(37), 13794–13803 (2007)
320. Silveira L. Jr, de Paula A. R. Jr, Pasqualucci C. A., Pacheco M. T. T., “Independent component analysis applied to Raman spectra for classification of in vitro human coronary arteries,” *Instrum. Sci. Technol* 36(2), 134–145 (2008)
321. Silveira Jr L. et al. Near-infrared Raman spectroscopy of human coronary arteries: histopathological classification based on Mahalanobis distance // *Journal of clinical laser medicine & surgery*. – 2003. – T. 21. – №. 4. – C. 203-208.
322. Redko I. et al. *Advances in domain adaptation theory*. – Elsevier, 2019
323. El-Hag D and Dahab A 2016 Identification and characterisation of disulphide bonds in therapeutic proteins by using Raman spectroscopy *Adv. J. Pharm. Life Sci. Res.* 4 50–9
324. Rygula A, Majzner K, Marzec K, Kaczor A, Pilarczyk M and Baranska M 2013 *J. Raman Spectrosc.* 44 1061
325. Leyto P, Lizama-Vergara P, Campos-Vallette M, Becker M, Clavijo E, Cordova Reyes I and Jerez C 2005 Surface enhanced Raman spectrum of nanometric molecular systems *J. Chil. Chem. Soc.* 50 725–30
326. Notingher I 2007 Raman spectroscopy cell-based bioТБ-ЧBors ТБ-ЧBors 7 1343–58
327. Akutsu H and Kyogoku Y 1975 *Chem. Phys. Lipids* 14 113
328. Zhu G, Zhu X, Fan Q and Wan X 2011 Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions *Spectrochim. Acta A* 78 1187–95
329. Depciuch J, Kaznowska E, Zawlik I, Wojnarowska R, Cholewa M, Heraud P and Cebulski J 2016 Application of Raman spectroscopy and infrared spectroscopy in the identification of breast cancer *Appl. Spectrosc.* 70 251

330. Wu H, Volponi J, Oliver A, Parikh A, Simmons B and Singh S 2011 In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108 3809
329. de Jesus A and Allen T 2013 *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr* 1828 864
330. Wood B, Caspers P, Puppels G, Pandiancherri S and McNaughton D 2007 Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation *Anal. Bioanal. Chem.* 387 1691–703
331. Otange B, Birech Z, Rop R and Oyugi J 2017 Label-free surface-enhanced Raman spectroscopic detection of HIV-1 infection in blood and plasma adsorbed on conductive silver pasted glass substrate Thesis (Egerton University)
332. Lykina A, Artemyev D, Bratchenko I, Khristoforova Y, Myakinin O, Kuzmina T, Davydkin I and Zakharov V 2017 Raman spectra analysis of human blood protein fractions using the projection on latent structures method *CEUR Workshop Proceedings* 64–68
335. Maiti N, Apetri M, Zagorski M, Carey P and Anderson V 2004 *J. Am. Chem. Soc.* 126 2399
336. Blobaum A and Marnett L 2007 Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition *J. Med. Chem.* 50 1425–41
337. von Kügelgen I 2017 *Protein Reviews Structure, pharmacology and roles in physiology of the P2Y12 receptor* 123–38
338. Algaier I, Jakubowski J, Asai F and Von Kügelgen I 2008 Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y12 receptor *J. Thromb. Haemost.* 6 1908–14
339. David C, Foley S and Enescu M 2009 Protein S–S bridge reduction: a Raman and computational study of lysozyme interaction with TCEP *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 2532–42
340. Pelton J and McLean L 2000 Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure *Anal. Biochem.* 277 167–76
341. Rance G, Marsh D and Khlobystov A 2008 Extinction coefficient analysis of small alkanethiolate-stabilised gold nanoparticles *Chem. Phys. Lett.* 460 230–6
342. Wang M. et al. Molecular-fluorescence enhancement via blue-shifted plasmon-induced resonance energy transfer // *The Journal of Physical Chemistry C.* – 2016. – T. 120. – №. 27. – C. 14820-14827]
343. Hellmann N., Schneider D. Hands on: using tryptophan fluorescence spectroscopy to study protein structure // *Protein Supersecondary Structures: Methods and Protocols.* – 2019. – C. 379-401.
344. Haupt S, Lazar I, Weitman H, Senge MO, Ehrenberg B (2015). Pdots, a new type of nanoparticle, bind to m THPC via their lipid modified surface and exhibit very high FRET efficiency between the core and the TB-ЧBitizer. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015; 17(17): 11412–11422
345. Chau YFC, Chao CTC, Chiang HP, Lim CM, Voo NY, Mahadi AH. Plasmonic effects in composite metal nanostructures for TB-ЧBing applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 2018

346. Chau YFC, Chao CTC, Huang HJ, Anwar U, Lim CM, Voo NY et al. Plasmonic perfect absorber based on metal nanorod arrays connected with veins. *Results in Physics*, 2019
347. Iwunze MO. The characterization of the fluorescence of l-histidine in simulated body fluid. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2007; 186(2–3): 283–289
348. Czamara K. et al. Raman spectroscopy of lipids: a review // *Journal of Raman spectroscopy*. – 2015. – T. 46. – №. 1. – C. 4-20.
349. Saboor M, Ayub Q, Samina Ilyas M. Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology. *Pakistan journal of medical sciences*. 2013; 29(3): 891. pmid:24353652
350. Chen RF. Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine. *Analytical Letters*. 1967; 1(1): 35–42
351. Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, New York; 2006
352. Liu T. Y. et al. Differentiation of bacteria cell wall using Raman scattering enhanced by nanoparticle array // *Journal of nanoscience and nanotechnology*. – 2012. – T. 12. – №. 6. – C. 5004-5008
353. Tang M. et al. Characterization and analysis of mycobacteria and Gram-negative bacteria and co-culture mixtures by Raman microspectroscopy, FTIR, and atomic force microscopy // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2013. – T. 405. – №. 5. – C. 1577-1591
354. Perumal J. et al. Identification of mycolic acid forms using surface-enhanced Raman scattering as a fast detection method for tuberculosis // *International journal of nanomedicine*. – 2018. – T. 13. – C. 6029
355. Attarian R. et al. Glutathione disulfide and S-nitrosoglutathione detoxification by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin system // *FEBS letters*. – 2009. – T. 583. – №. 19. – C. 3215-3220.
356. De Gelder J. et al. Methods for extracting biochemical information from bacterial Raman spectra: focus on a group of structurally similar biomolecules—fatty acids // *Analytica chimica acta*. – 2007. – T. 603. – №. 2. – C. 167-175.
357. Parrish N. et al. Rapid, standardized method for determination of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility by use of mycolic acid analysis // *Journal of clinical microbiology*. – 2007. – T. 45. – №. 12. – C. 3915-3920.
358. Khosravi A. D. et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens of patients suspected of having extrapulmonary tuberculosis by application of nested PCR on five different genes // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2017. – T. 7. – C. 3
359. Notingher I. Raman spectroscopy cell-based bioTB-ЧBors // *ТБ-ЧBors*. – 2007. – T. 7. – №. 8. – C. 1343-1358
360. Glušič M. et al. The binding sites of cadmium to a reduced form of glutathione // *Acta Chimica Slovenica*. – 2013. – T. 60. – №. 1. – C. 61-69
361. Deneke S. M., Fanburg B. L. Regulation of cellular glutathione // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 1989. – T. 257. – №. 4. – C. L163-L173

362. Allen M. et al. Mechanisms of control of Mycobacterium tuberculosis by NK cells: role of glutathione. *Front Immunol* 6: 508. – 2015
363. Zyubin A. et al. Raman spectroscopy for glutathione measurements in Mycobacterium tuberculosis strains with different antibiotic resistance // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2021
364. Zyubin, A., Lavrova, A., Manicheva, O., Dogonadze, M., Belik, V., & Samusev, I. (2019) Raman spectroscopy reveals M. tuberculosis strains with different antibiotic susceptibility. *Laser Physics Letters*, 16(8), 085602
365. Kim J. et al. Label-free detection for a DNA methylation assay using Raman spectroscopy // *Chinese Medical Journal*. – 2017. – T. 130. – №. 16. – C. 1961-1967
366. Stefanu A. et al. SERS-based DNA methylation profiling allows the differential diagnosis of malignant lymphadenopathy // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2022. – T. 264. – C. 120216
367. Kahraman M., Keseroğlu K., Çulha M. On sample preparation for surface-enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra // *Applied spectroscopy*. – 2011. – T. 65. – №. 5. – C. 500-506
368. Xie C. et al. Real-time Raman spectroscopy of optically trapped living cells and organelles // *Optics Express*. – 2004. – T. 12. – №. 25. – C. 6208-6214
369. Rivera-Betancourt O. E. et al. Identification of mycobacteria based on spectroscopic analyses of mycolic acid profiles // *Analyst*. – 2013. – T. 138. – №. 22. – C. 6774-6785
370. Boyaci I. H. et al. Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis // *Rsc Advances*. – 2015. – T. 5. – №. 70. – C. 56606-56624
371. De Gelder J. Raman spectroscopy as a tool for studying bacterial cell compounds : дис. – Ghent University, 2008
372. De Gelder J. Raman spectroscopy as a tool for studying bacterial cell compounds : дис. – Ghent University, 2008
373. Becke A. D. Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction // *The Journal of chemical physics*. – 1992. – T. 96. – №. 3. – C. 2155-2160.
374. Maquelin K., Kirschner C., Choo-Smith L.-P., Braak N., Endtz H. Ph., Naumann D., Puppels G. J. (2002). Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Methods*, 51, 255-271
375. Kundalevich A., Kapitonova A., Berezin, K., Zyubin, A., Moiseeva, E., Rafalskiy, V., & Samusev, I. Raman spectra simulation of antiplatelet drug-platelet interaction using DFT // *Scientific Reports*. – 2024. – T. 14. – №. 1. – C. 1445.
376. García-Rubio D. L. et al. Analysis of platelets in hypertensive and normotensive individuals using Raman and Fourier transform infrared-attenuated total reflectance spectroscopies // *Journal of Raman spectroscopy*. – 2019. – T. 50. – №. 4. – C. 509-521.

377. Papaleo S. et al. The red thread between methylation and mutation in bacterial antibiotic resistance: How third-generation sequencing can help to unravel this relationship //Frontiers in Microbiology. – 2022. – T. 13. – C. 957901.
378. Kim J. et al. Label-free detection for a DNA methylation assay using Raman spectroscopy //Chinese Medical Journal. – 2017. – T. 130. – №. 16. – C. 1961-1967.
379. Griffin J. E. et al. Cholesterol catabolism by Mycobacterium tuberculosis requires transcriptional and metabolic adaptations //Chemistry & biology. – 2012. – T. 19. – №. 2. – C. 218-227.
380. Qian W., Krimm S. Vibrational analysis of glutathione //Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 1994. – T. 34. – №. 10. – C. 1377-1394.
381. Allen M. et al. Mechanisms of control of Mycobacterium tuberculosis by NK cells: role of glutathione //Frontiers in Immunology. – 2015. – T. 6. – C. 508.
382. Morris D. et al. Glutathione and infection //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2013. – T. 1830. – №. 5. – C. 3329-3349.
383. Lira R. P. C., Rocha E. M. PICOT: Imprescriptible items in a clinical research question //Arquivos brasileiros de oftalmologia. – 2019. – T. 82. – №. 2. – C. 1-1.
384. Schön T. et al. Mycobacterium tuberculosis drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives //Clinical Microbiology and Infection. – 2017. – T. 23. – №. 3. – C. 154-160
385. Mugenyi N. et al. Innovative laboratory methods for improved tuberculosis diagnosis and drug-susceptibility testing //Frontiers in Tuberculosis. – 2024. – T. 1. – C. 1295979
386. Schami A. et al. Drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis: cell envelope profiles and interactions with the host //Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2023. – T. 13. – C. 1274175.
387. Shukla S., Bhardwaj N., Singh A. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: an evolutionary perspective and its adaptation to the lung microenvironment //The Microbe. – 2024. – C. 100189.
388. Postnikov E. B. et al. Accessing properties of molecular compounds involved in cellular metabolic processes with electron paramagnetic resonance, raman spectroscopy, and differential scanning calorimetry //Molecules. – 2023. – T. 28. – №. 17. – C. 6417
389. Ilchenko O. et al. Optics miniaturization strategy for demanding Raman spectroscopy applications //Nature Communications. – 2024. – T. 15. – №. 1. – C. 3049
390. Gaussian 16, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H.

- Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016
391. Becke A.D. // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98. № 7. P. 5648. doi 10.1063/1.464913, Lee C., Yang W., Parr R.G. // *Phys. Rev.* 1988. V. 37B. № 2. P. 785
392. Marrakchi, H., Lanéelle, M. A., & Daffé, M. (2014). Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & biology*, 21(1), 67-85
393. Divya, P., Reeda, V. J., Selvaraj, S., & Jothy, B. (2024). Theoretical spectroscopic electronic elucidation with polar and non-polar solvents (IEFPCM model), molecular docking and molecular dynamic studies on bendiocarb-antiallergic drug agent. *Journal of Molecular Liquids*, 404, 124895
394. Jeba Reeda, V. S., Divya, P., Karthick, T., Jothy, V. B., S. Alharbi, N., Kadaikunnan, S., ... & Muthu, S. (2024). Quantum chemical computational analysis, electronic transitions, interaction mechanisms analysis by spectroscopic, molecular docking, and molecular dynamic simulation of retinol. *Spectroscopy Letters*, 1-19
395. Szymańska-Chargot M. et al. A determination of the composition and structure of the polysaccharides fractions isolated from apple cell wall based on FT-IR and FT-Raman spectra supported by PCA analysis // *Food Hydrocolloids*. – 2024. – T. 150. – С. 109688
396. Kuznetsov B. N. et al. The Raman spectroscopy, XRD, SEM, and AFM study of arabinogalactan sulfates obtained using sulfamic acid // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2017. – Т. 43. – С. 722-726
397. Liav, A., & Goren, M. B. (1984). Sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. Synthesis of the core  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose 2-sulfate. *Carbohydrate research*, 127(2), 211-216
398. Le Ru E., Etchegoin P. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*. – Elsevier, 2008.
399. Выборнов Н.А. Зюбин А.Ю. Разработка модифицированного метода главных компонент для анализа биохимических изменений богатой тромбоцитами плазмы человека при ее хранении / Н.А. Выборнов, А.Ю. Зюбин // *Международный научно-исследовательский журнал*. — 2025. — №1 (151).
400. Зюбин А. Ю. и др. Оптические свойства планарных плазмон-активных поверхностей, модифицированных золотыми нанозвездами // *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. – 2022. – Т. 22. – №. 5. – С. 824-831.
401. Byuchkova Y. A., Zyubin A.Y. et al. Mathematical Analysis of Raman Spectra Data Arrays Using Machine Learning Algorithms // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2023. – Т. 9. – №. 2. – С. 020308.

402. Matveeva K., Zyubin A., Ognedyuk A., Demishkevich E., Kon I., & Samusev I. Photophysical properties of Au and Au@SiO<sub>2</sub> Nanoparticle-Dye Complexes in Mesoporous Silica Matrices for Theranostics Purposes //Romanian Journal of Physics. – 2021. – Т. 66. – №. 7-8.
403. Матвеева, К. И., **Зюбин, А. Ю.**, Кон, И. И., & Самусев, И. Г. Влияние размерности, геометрии и ориентации наноструктур на распределение электрического поля в вопросах усиления комбинационного рассеяния света //Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2022. – Т. 22. – №. 5. – С. 818-823.
404. Kon I., Zyubin A., Samusev I. FDTD simulations of local plasmonic fields for theranostic core-shell gold-based nanoparticles //JOSA A. – 2020. – Т. 37. – №. 9. – С. 1398-1403.
405. Zyubin A., Kon, I., Tcibulnikova A., Matveeva K., Khankaev A. Numerical FDTD-based simulations and Raman experiments of femtosecond LIPSS //Optics Express. – 2021. – Т. 29. – №. 3. – С. 4547-4558.
406. **Zyubin A.**, Rafalskiy V., Tcibulnikova A., Moiseeva E., Matveeva K., Tsapkova A., Lyatun I., Medvedskaya P., Samusev I., Demin M. Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment //Laser Physics Letters. – 2020. – Т. 17. – №. 4. – С. 045601.
407. Zyubin A., Rafalskiy V., Tcibulnikova A., Matveeva K., Moiseeva E., Tsapkova A., Samusev I., Bryu-khanov V., Demin M. Dataset of human platelets in healthy and individuals with cardiovascular pathology obtained by Surface-enhanced Raman spectroscopy //Data in brief. – 2020. – Т. 29. – С. 105145.
408. Lavrova A. I., Zyubin A. Y. Dogonadze, M. Z., Borisov, E. V., Samusev, I., & Postnikov, E. B. Surface-enhanced Raman spectroscopy reveals structure complexity difference in single extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis bacteria with different drug resistance //Results in Physics. – 2023. – Т. 44. – С. 106106.
409. Byuchkova Y. A., **Zyubin A.Y.**, Rafalskiy V.V., Moiseeva E.M., Samusev I.G. Mathematical Analysis of Raman Spectra Data Arrays Using Machine Learning Algorithms //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2023. – Т. 9. – №. 2. – С. 020308.
410. Rafalskiy, V. V., **Zyubin, A. Y.**, Moiseeva, E. M., Kupriyanova, G. S., Mershiev, I. G., Kryukova, N. O., Igor I. Kon , Ilya G. Samusev , Yana D. Belousova and Svetlana A. Doktorova Application of vibrational spectroscopy and nuclear magnetic resonance methods for drugs pharmacokinetics research //Drug Metabolism and Personalized Therapy. – 2022
411. Demishkevich, E., **Zyubin, A.**, Seteikin, A., Samusev, I., Park, I., Hwangbo, C. K., ... & Lee, G. J et al. Synthesis Methods and Optical ЛЧ-ТБing Applications of Plasmonic Metal Nanoparticles Made from Rhodium, Platinum, Gold, or Silver //Materials. – 2023. – Т. 16. – №. 9. – С. 3342.
412. Postnikov, E. B., Lebedeva, E. A., **Zyubin, A. Y.**, & Lavrova, A. I. The Cascade Hilbert-Zero Decomposition: A Novel Method for Peaks Resolution and Its Application to Raman Spectra //Mathematics. – 2021. – Т. 9. – №. 21. – С. 2802.

413. Zyubin A., Lavrova, A., Manicheva, O., Dogonadze, M., Belik, V., Demin, M., Samusev, I. The cell-wall structure variation in Mycobacterium tuberculosis with different drug sensitivity using Raman spectroscopy in the high-wavenumber region //Laser Physics Letters. – 2020. – T. 17. – №. 6. – C. 065602.
414. Rafalsky, V.V., Zyubin, A.Yu., Moiseeva, E.M., Samusev, I.G. Prospects for Raman spectroscopy in cardiology //Cardiovascular Therapy and Prevention. – 2020. – T. 19. – №. 1. – C. 70-77.
415. Zyubin, A., Lavrova, A., Manicheva, O., Dogonadze, M., & Samusev, I. Dataset of single Mycobacterium tuberculosis bacteria cells with different antibiotic susceptibility obtained by Raman spectroscopy //Data in brief. – 2018. – T. 21. – C. 2430-2434.
416. Zyubin A, Lavrova A, Dogonadze M, Borisov E, Postnikov EB. 2025. Single-cell analysis of Mycobacterium tuberculosis with diverse drug resistance using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) PeerJ 13:e18830.
417. Kundalevich, A., Kapitonova, A., Zyubin, A., & Samusev, I. Raman spectra DFT simulation of M. Tu-berculosis cell wall components //Journal of Molecular Structure. – 2025. – T. 1326. – C. 141051.
418. Zyubin, A. Y., Kon, I. I., Poltorabatko, D. A., & Samusev, I. G et al. FDTD simulations for rhodium and platinum nanoparticles for UV plasmonics //Nanomaterials. – 2023. – T. 13. – №. 5. – C. 897.
419. Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode //Chemical physics letters. – 1974. – T. 26. – №. 2. – C. 163-166.
420. Keren S. et al. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – T. 105. – №. 15. – C. 5844-5849.
421. Qian X. et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags //Nature biotechnology. – 2008. – T. 26. – №. 1. – C. 83.
422. Sonvico F. et al. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments //Bioconjugate chemistry. – 2005. – T. 16. – №. 5. – C. 1181-1188.
423. Bohndiek S. E. et al. A small animal Raman instrument for rapid, wide-area, spectroscopic imaging //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – T. 110. – №. 30. – C. 12408-12413.
424. Garai E. et al. A real-time clinical endoscopic system for intraluminal, multiplexed imaging of surface-enhanced Raman scattering nanoparticles //PloS one. – 2015. – T. 10. – №. 4. – C. e0123185.
425. Jokerst J. V. et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy //Nanomedicine. – 2011. – T. 6. – №. 4. – C. 715-728.
426. Kircher M. F. et al. A brain tumor molecular imaging strategy using a new triple-modality MRI-photoacoustic-Raman nanoparticle //Nature medicine. – 2012. – T. 18. – №. 5. – C. 829.
427. Liu Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study //The Lancet infectious diseases. – 2016. – T. 16. – №. 2. – C. 161-168.

428. Yu W., Xie H. A review on nanofluids: preparation, stability mechanisms, and applications //Journal of nanomaterials. – 2012. – T. 2012. – C. 1.
429. Zavaleta C. L. et al. Multiplexed imaging of surface enhanced Raman scattering nanotags in living mice using noninvasive Raman spectroscopy //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – T. 106. – №. 32. – C. 13511-13516.
430. Shi P. C. et al. Hierarchically porous nitrogen-doped carbon nanotubes derived from core-shell ZnO@ zeolitic imidazolate framework nanorods for highly efficient oxygen reduction reactions //Journal of Materials Chemistry A. – 2017. – T. 5. – №. 24. – C. 12322-12329.
431. El-Sayed I. H., Huang X., El-Sayed M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer //Nano letters. – 2005. – T. 5. – №. 5. – C. 829-834.
432. Jain P. K., Qian W., El-Sayed M. A. Ultrafast cooling of photoexcited electrons in gold nanoparticle– thiolated DNA conjugates involves the dissociation of the gold– thiol bond //Journal of the American Chemical Society. – 2006. – T. 128. – №. 7. – C. 2426-2433.
433. Samanta A. et al. Ultrasensitive near-infrared Raman reporters for SERS-based in vivo cancer detection //Angewandte Chemie International Edition. – 2011. – T. 50. – №. 27. – C. 6089-6092.
434. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold //Discussions of the Faraday Society. – 1951. – T. 11. – C. 55-75.
435. Brust M. et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system //Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. – 1994. – №. 7. – C. 801-802.
436. Vigderman L., Khanal B. P., Zubarev E. R. Functional gold nanorods: synthesis, self-assembly, and sensing applications //Advanced materials. – 2012. – T. 24. – №. 36. – C. 4811-4841.
437. Ashkarran A. A., Derakhshi M. The effect of FeCl<sub>3</sub> in the shape control polyol synthesis of silver nanospheres and nanowires //Journal of Cluster Science. – 2015. – T. 26. – №. 5. – C. 1901-1910.
438. Nativo P., Prior I. A., Brust M. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles //ACS nano. – 2008. – T. 2. – №. 8. – C. 1639-1644.
439. Sapsford K. E. et al. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology //Chemical reviews. – 2013. – T. 113. – №. 3. – C. 1904-2074.
440. Rosi N. L. et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation //Science. – 2006. – T. 312. – №. 5776. – C. 1027-1030.
441. Doria G. et al. Noble metal nanoparticles for biosensing applications //Sensors. – 2012. – T. 12. – №. 2. – C. 1657-1687.
442. Petros R. A., DeSimone J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications //Nature reviews Drug discovery. – 2010. – T. 9. – №. 8. – C. 615.

443. Kratz J. V. et al. Chemical properties of element 105 in aqueous solution: Halide complex formation and anion exchange into Triisooctyl amine //Radiochimica Acta. – 1989. – Т. 48. – №. 3-4. – С. 121-134.
444. Siemann D. W. et al. Differentiation and definition of vascular-targeted therapies //Clinical Cancer Research. – 2005. – Т. 11. – №. 2. – С. 416-420.
445. Tang J. et al. Nanomedical theranostics in cardiovascular disease //Current cardiovascular imaging reports. – 2012. – Т. 5. – №. 1. – С. 19-25.
446. Lammers T. et al. Nanotheranostics and image-guided drug delivery: current concepts and future directions //Molecular pharmaceutics. – 2010. – Т. 7. – №. 6. – С. 1899-1912.
447. Gupta M. K. et al. Recent strategies to design vascular theranostic nanoparticles //Nanotheranostics. – 2017. – Т. 1. – №. 2. – С. 166.
448. Maurya S. P. et al. Performance of machine learning algorithms for lung cancer prediction: a comparative approach //Scientific Reports. – 2024. – Т. 14. – №. 1. – С. 18562.
449. Alzubaidi L. et al. Review of deep learning: concepts, CNN architectures, challenges, applications, future directions //Journal of big Data. – 2021. – Т. 8. – С. 1-74.
450. Rivera J. et al. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation //haematologica. – 2009. – Т. 94. – №. 5. – С. 700.
451. Đukanović N. et al. Lipids and antiplatelet therapy: important considerations and future perspectives //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 6. – С. 3180.
452. Матвеева К. И. и др. Спектроскопия комбинационного рассеяния света в исследованиях процессов инактивации бактериальных микроорганизмов //Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2023. – Т. 23. – №. 4. – С. 676-684.