Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и прикладной электродинамики РАН (ИТПЭ РАН)

На правах рукописи

Звягина Юлия Юрьевна

Разработка методик определения белков и олигосахаридов с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния на поверхности наноструктурированных пленок Ag

1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата технических наук

Научный руководитель
к.т.н. Богинская И.А.

Москва, 2026

Оглавление

Введение.....5

Глава 1. Обзор литературы..... 13

1.1. Спектроскопия ГКР..... 13

1.1.1. Физические основы и ограничения КР..... 13

1.1.2. Механизмы усиления ГКР..... 16

1.2. ГКР-активные структуры..... 19

1.2.1. Коллоидные наночастицы..... 20

1.2.2. Планарные подложки..... 22

1.3. Пробоподготовка..... 29

1.3.1. Осаждение аналита на подложку..... 31

1.3.2. Использование лазерного и ультразвукового воздействия при пробоподготовке биологических образцов..... 33

1.3.3. Влияние морфологии ГКР-структур на ГКР-спектр..... 37

1.4. Локализация ГКР-эффекта..... 39

1.5. Методы математической обработки в ГКР-анализе..... 42

Вывод..... 47

Глава 2. Материалы и методы..... 49

2.1. Получение и характеризация подложек..... 49

2.1.1. Подложки Ag#G..... 51

2.1.2. Подложки Ag#M..... 53

2.2. Спектрометрическая система WiTec Alpha 300R..... 54

2.2.1. Аппаратная функция конфокального микроскопа..... 57

2.3. Объекты исследования 58
2.3.1. Миоглобин человека 59
2.3.2. Олигосахариды 60
2.4. Особенности измерения профилей Z-скана 62
2.4.1. Z-скан монокристалла кремния 63
2.4.2. Z-скан азота на ГКР-подложке 63
2.4.3. Программная обработка данных 64
2.5. Параметры пробоподготовки и измерения образцов 64
2.5.1. Пробоподготовка с использованием лазерного воздействия 64
2.5.2. Пробоподготовка с использованием ультразвукового воздействия 65
2.5.3. Олигосахариды 66
2.6. Математическая обработка данных 67
2.6.1. Алгоритм обработки и классификации спектров групп олигосахаридов ... 67
Глава 3. Определение высоты локализации ГКР-эффекта над поверхностью подложки 71
3.1. Моделирование и интерпретация Z-скана 71
3.1.1. Базовая модель: свёртка прямоугольных профилей 71
3.1.2. Учёт внефокусного рассеяния 73
3.1.3. Модель толстого слоя (L>H) 77
3.1.4. Модель тонкого слоя (L<H) 77
3.1.5. Итерационный алгоритм варьирования параметров модели 78
3.1.6. Валидация модели на известных данных 79
3.2. Измерение и обработка Z-сканов кремния и азота 81

Глава 4. Исследование влияния физических способов пробоподготовки высокомолекулярного аналита на результат ГКР-анализа 84

4.1. Лазерное воздействие на водный раствор миоглобина 84

4.2. Предварительная обработка стеклянной основы подложек Ag#G 89

4.3. Ультразвуковое воздействие на водный раствор миоглобина 91

Глава 5. ГКР-анализ клинически значимых олигосахаридов – маркеров грибковых и бактериальных инфекций 103

Заключение 113

Основные публикации по теме диссертации 115

Список литературы 118

Приложение А. Акт об использовании результатов работы. 145

Введение

Актуальность темы. Развитие современных методов молекулярной диагностики требует создания аналитических подходов, обеспечивающих высокочувствительное и воспроизводимое определение биологических молекул. При этом их анализ осложняется низкими концентрациями, структурной гетерогенностью и высокой чувствительностью к внешним условиям. Современные лабораторные методы, такие как иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, методы хроматографии и масс-спектрометрии, демонстрируют высокую точность и чувствительность, однако обладают рядом ограничений, включая необходимость сложной пробоподготовки, использования меток и реагентов, а также характеризуется длительностью и ограниченными возможностями одновременного структурного анализа [1].

В качестве альтернативы активно развиваются спектроскопические методы, в частности, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), основанная на усилении сигнала комбинационного рассеяния молекул, адсорбированных на наноструктурированных металлических поверхностях. Усиление обусловлено электромагнитным и химическим механизмами и позволяет регистрировать вещества в крайне низких концентрациях.

В настоящей работе под ГКР-анализом понимается совокупность экспериментальных и вычислительных методов, направленных на получение, обработку и интерпретацию ГКР-спектров с целью качественного и количественного определения веществ. ГКР-анализ включает выбор усиливающей и воспроизводимой ГКР-структуры, способа пробоподготовки анализируемого вещества, определение оптических параметров используемой системы регистрации, подбор параметров регистрации спектров, а также их последующую обработку с использованием методов многомерной статистики и машинного обучения.

Белки и олигосахариды являются одними из основных маркеров патологических состояний. В частности, миоглобин является маркером повреждения миокарда и скелетных мышц, а олигосахариды с остатком галактофуранозы (Galf) — маркерами грибковых и бактериальных инфекций, вызванных такими возбудителями, как *Aspergillus fumigatus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*. В связи с этим, данные биологические вещества представляют особый интерес как в фундаментальных, так и в прикладных областях применения ГКР-спектроскопии.

В опубликованных работах по ГКР биомолекул чаще независимо оптимизируются либо усиливающие подложки, либо алгоритмы обработки спектров; при этом этап формирования осадка аналита на планарной поверхности обычно рассматривается как вспомогательный, хотя именно он задает контакт молекул с областью усиления [2]. Только в последние годы этот аспект начинает рассматриваться как один из ключевых факторов, ограничивающих воспроизводимость и внедрение ГКР в клиническую диагностику [3].

ГКР-спектроскопия занимает промежуточное положение между высокочувствительными методами молекулярной диагностики и физико-химическими методами анализа. Она сочетает преимущества безмаркерного анализа, высокой чувствительности и структурной информативности, однако требует дальнейшего развития в области воспроизводимости и стандартизации. В связи с этим одной из ключевых задач является разработка подходов к оптимизации параметров ГКР-анализа с учётом физико-химических особенностей системы «подложка–аналит» и геометрии измерения, а также создание методов обработки данных, позволяющих нивелировать влияние вариабельности сигнала. Решение этих задач является необходимым условием для перехода спектроскопии ГКР от исследовательского инструмента к методу клинического лабораторного анализа, что позволит создавать лечебно-диагностические методики и аппаратурные комплексы для биомедицинских исследований.

Таким образом, **целью** диссертационной работы является разработка методик, повышающих воспроизводимость и чувствительность ГКР-анализа биологических аналитов на планарных наноструктурированных подложках на основе управления условиями адсорбции и морфологией осадка аналита с применением методов машинного обучения для задач клинической диагностики.

Исходя из поставленной цели, в работе решались следующие задачи:

1. Определение высоты области локализации усиливающего эффекта планарной наноструктурированной серебряной подложки;

2. Исследование влияния ультразвуковой и лазерной пробоподготовки на адсорбцию миоглобина из водных растворов в низких концентрациях на наноструктурированных серебряных ГКР-подложках;

3. Определение влияния морфологии ГКР-подложек на физико-химический контакт молекул миоглобина из водного раствора низкой концентрации с поверхностью подложки;

4. Определение способа пробоподготовки и параметров морфологии подложек, позволяющих получать наиболее высокоинтенсивные ГКР-спектры миоглобина с наибольшим соотношением сигнал/шум;

5. Разработка методов ГКР-анализа клинически значимых аналитов на примере олигосахаридов – маркеров грибковой и бактериальной инфекций на планарных наноструктурированных подложках;

6. Определение набора методов математической обработки спектральных данных, включая методы машинного обучения, для повышения точности интерпретации и классификации спектров олигосахаридов.

Основные результаты и научная новизна работы:

1. Предложен метод определения эффективной высоты локализации ГКР-сигнала на планарных подложках с использованием конфокальной микроскопии, позволяющий минимизировать вклад химического механизма усиления;

2. Впервые показана возможность получения белковых кристаллических структур (кристаллов и кристаллических точек) при воздействии расфокусированным пучком непрерывного лазерного излучения на длине волны 785 нм на каплю водного раствора миоглобина низкой концентрации (1 мкг/мл и 10 нг/мл);

3. Впервые показано, что воздействие высоко- и низкочастотного ультразвука на водный раствор миоглобина в низкой концентрации (1 мкг/мл) приводит к изменению конформации белковых молекул и появлению четырех типов ГКР-спектров, один из которых характеризуется усиленной полосой 996 $см^{-1}$;

4. Впервые разработана методика ГКР-анализа синтетических олигосахаридов с галактофуранозным остатком, которые являются маркерами бактериальных и грибковых инфекций, вызванных K. pneumoniae, E. faecalis и A. fumigatus;

5. Предложен набор методов машинного обучения (PCA, бутстрэп, логистическая регрессия с L1 регуляризацией), позволяющий классифицировать спектры олигосахаридных миметиков, содержащих и не содержащих галактофуранозный остаток, с точностью 97%.

Практическая значимость работы:

1. Разработанный метод определения эффективной высоты локализации ГКР-усиления подложки, основанный на экспериментальной регистрации ослабления ГКР-сигнала азота воздуха при удалении измерительного объема объектива микроскопа от поверхности подложки и интерпретации полученных результатов с помощью предложенной математической модели, является универсальным для измерений на любых планарных ГКР-активных подложках при использовании конфокальной микроскопии;

2. Разработанные подходы к пробоподготовке белковых аналитов на примере низких концентраций водных растворов миоглобина, применяемые в качестве этапов комплексного ГКР-анализа высокомолекулярных соединений, повышают чувствительность и специфичность метода. В частности, пробоподготовка с использованием лазерного воздействия на капли водного раствора миоглобина приводит к его кристаллизации, что может быть использовано для разработки подходов к селективному анализу миоглобина в сложных смесях. Пробоподготовка с использованием ультразвукового воздействия на систему подложка–капля аналита приводит к значительному уменьшению времени пробоподготовки и нескольким конформациям миоглобина, что выражается в изменениях ГКР-спектра. Наблюдаемый эффект, как и в случае лазерного воздействия, является перспективным для выделения миоглобина в сложных смесях на фоне сопутствующих компонентов, а также может быть использован при исследовании фундаментальных свойств белков, например, установления зависимостей между пространственным расположением молекулы на подложке и спектральным откликом, что актуально для разработки ГКР-активных подложек с оптимальной морфологией;

3. Разработанный комплексный подход к ГКР-анализу с использованием методов машинного обучения для обработки спектров и классификации данных является эффективным для определения маркеров бактериальных и грибковых инфекций на примере галактофуранозосодержащих олигосахаридов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Метод определения эффективной высоты локализации ГКР-усиления на наноструктурированных самоорганизованных серебряных подложках по спектрам азота воздуха, основанный на Z-сканировании и разработанной математической модели. При использовании конфокального микроскопа с объективом 100×/0,9 и пинхолом диаметром 50 мкм эффективная высота локализации ГКР-усиления составляет 140±10 нм.

2. Использование расфокусированного пучка непрерывного лазерного излучения (785 нм, 100 мВт) для пробоподготовки водного раствора миоглобина (1 мкг/мл и 10 нг/мл) приводит к формированию двух типов кристаллических объектов белка на подложке и увеличению амплитуды ГКР-спектров на порядок по сравнению с контролем без лазерного воздействия;

3. Низкочастотное (47 кГц) и высокочастотное (580 кГц) ультразвуковое воздействие на каплю водного раствора миоглобина (1 мкг/мл) в совокупности с особенностями морфологии ГКР-подложки приводит к изменению конформации молекул белка и появлению четырех типов спектров, в одном из которых наблюдается усиление колебательной полосы на порядок, а также сокращению времени пробоподготовки с 30 до 4–7 минут;

4. Предварительная очистка стеклянной основы ГКР-подложек в ультразвуковой ванне с органическими растворителями (изопропиловый спирт и ацетон) перед нанесением серебряных пленок приводит к резкому изменению эксцесса поверхности, что в сочетании с высокочастотной (580 кГц) ультразвуковой пробоподготовкой капли раствора миоглобина (1 мкг/мл) при ГКР-измерениях на длине волны 785 нм увеличивает долю спектров, соответствующих кристаллическому состоянию белка на поверхности подложки;

5. Разработанный подход к ГКР-анализу позволяет детектировать олигосахариды с галактофуранозным остатком (маркеры патогенов *A. fumigatus, K. pneumoniae, E. faecalis*) в физиологически значимой концентрации 100 пг/мл с точностью 97%.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современных апробированных методов исследования на сертифицированном оборудовании, согласованностью данных, полученных независимыми методами (атомно-силовая микроскопия, конфокальная рамановская спектроскопия, оптическая

микроскопия), воспроизводимостью результатов на различных партиях подложек и соответствием современным представлениям о механизмах ГКР-усиления.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на следующих конференциях: 24–27-я Ежегодная научная конференция ИТПЭ РАН, Москва (2023 – 2026 г.); 13-я Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (Суздаль, 25-29 июня, 2023 г.); 2-я Научно-практическая конференция «Клиническая диагностика и Персонализированная медицина» (Москва, 10-11 сентября 2024 г.); 67-я Всероссийская научная конференция МФТИ, Москва (31 марта–5 апреля 2025 г); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2025» (Москва, 11–25 апреля 2025 г.); Российская конференция по комбинационному рассеянию света – 8-й Сибирский семинар по спектроскопии комбинационного рассеяния света – Школа молодых ученых по актуальным проблемам комбинационного рассеяния света. Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН. Красноярск, (22–26 сентября 2025 г.); X Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIX Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 10-11 июня 2026 г.).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых отечественных и международных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus, Белом списке (три из которых К1 и одна К2), и 2 публикации по материалам отечественных и международных конференций в сборниках, индексируемых в РИНЦ. Дополнительно 5 работ опубликованы по смежной тематике.

Личный вклад автора. Автор участвовал в постановке цели и задач исследований, подготовке научных публикаций. Автор самостоятельно провел анализ литературных источников по теме диссертации, эксперименты и обработку данных по пробоподготовке образцов миоглобина с использованием лазерного и ультразвукового воздействия и дальнейшем измерении методом спектроскопии

гигантского комбинационного рассеяния. Результаты работы представлены на конференциях лично автором. Автором лично получены экспериментальные результаты по измерению ГКР-спектров олигосахаридов, представленные в Главе 5 диссертационной работы. Разработка протокола математической обработки, представленного в Главе 5, проводилась совместно с младшим научным сотрудником ИТПЭ РАН Сафиуллиным Р.Р. Модель интерпретации экспериментальных результатов, описывающая ослабление ГКР-сигнала при удалении измерительного объема конфокального микроскопа от поверхности подложки, представленная в Главе 3, разработана совместно со старшим научным сотрудником ИТПЭ РАН Верещагиным К.А. Основные результаты, представленные в диссертации, получены лично автором.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованных источников литературы (222 наименования) и приложения. Диссертация изложена на 146 страницах, содержит 29 рисунков и 9 таблиц.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Спектроскопия ГКР

1.1.1. Физические основы и ограничения КР

При взаимодействии электромагнитного излучения с веществом электрическое поле световой волны вызывает поляризацию молекул и индуцирует в них переменные дипольные моменты. Характер взаимодействия определяется энергетической структурой вещества и может сопровождаться поглощением, упругим или неупругим рассеянием излучения, а также последующей релаксацией возбуждённого состояния с испусканием фотона. Совокупность возможных переходов между энергетическими состояниями вещества обычно представляется с помощью энергетических диаграмм, в частности диаграммы Яблонского (Рисунок 1.1).

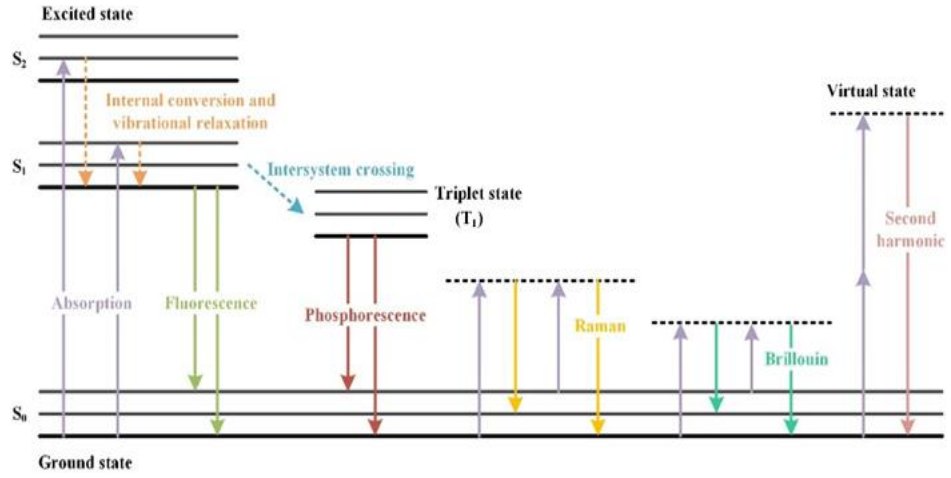

Рисунок 1.1 – Диаграмма Яблонского [4]

При облучении вещества монохроматическим излучением основную долю рассеянного света составляет рэлеевское рассеяние, при котором энергия фотона и, соответственно, частота излучения не изменяются. Значительно меньшая часть фотонов претерпевает неупругое взаимодействие с веществом, сопровождающееся обменом энергией между фотоном и колебательными состояниями молекулы. Этот процесс получил название комбинационного рассеяния (КР).

В зависимости от направления энергетического обмена между фотоном и молекулой различают Стоксово и Антистоксово рассеяние. При Стоксовом рассеянии фотон передаёт часть своей энергии молекуле, переводя её в более высокое колебательное состояние. Поэтому энергия рассеянного фотона уменьшается, а его частота смещается относительно частоты возбуждающего излучения в сторону низких энергий. При Антистоксовом рассеянии молекула первоначально находится в возбуждённом колебательном состоянии и передаёт часть своей энергии фотону, в результате чего энергия рассеянного излучения увеличивается. Соответствующий энергетический сдвиг определяется разностью между колебательными уровнями молекулы и выражается в спектроскопии КР через рамановский сдвиг, измеряемый в $см^{-1}$. Схематическое соотношение между рэлеевским, Стоксовым и Антистоксовым рассеянием представлено на Рисунке 1.2 [5,6].

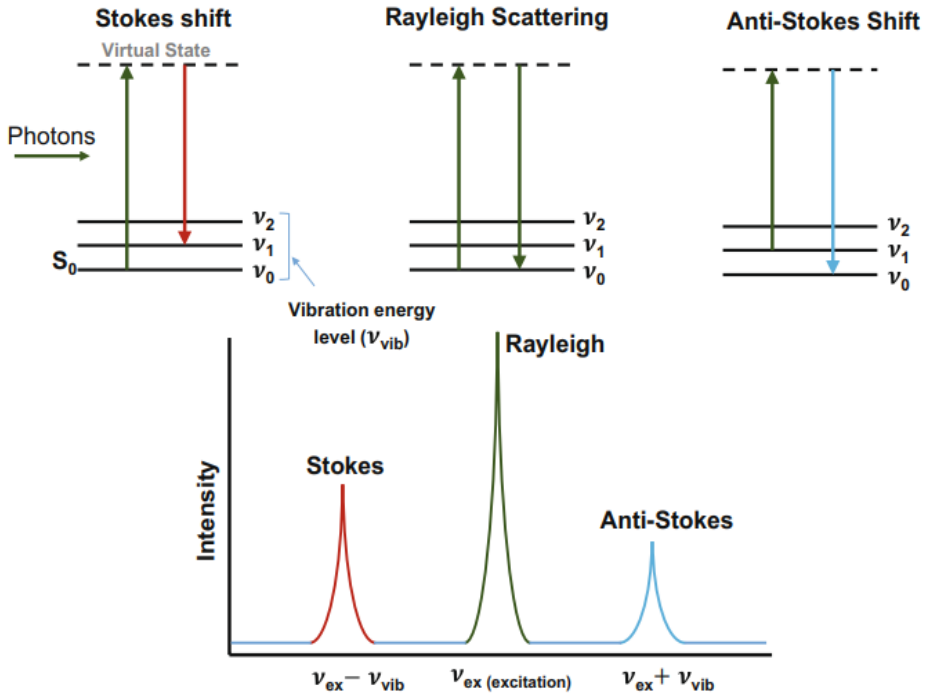

Рисунок 1.2 – Рэлеевское рассеяние в сравнении со Стоксовым и Антистоксовым КР [6]

Колебательные уровни молекул определяются массами составляющих их атомов, длинами и прочностью химических связей, симметрией молекулярной

структуры и характером межмолекулярного взаимодействия. Поэтому набор частот КР является специфической характеристикой молекулярной структуры вещества. Совокупность полос в спектре позволяет идентифицировать химический состав и структурные особенности исследуемого объекта. В отличие от методов, основанных преимущественно на регистрации одного или нескольких характерных переходов, КР формирует многокомпонентный спектральный профиль, содержащий информацию о различных колебательных модах молекулы.

Универсальность механизма комбинационного рассеяния определяет широкую область применения КР-спектроскопии. Метод используется для исследования газообразных, жидких и твёрдых веществ, включая кристаллические и аморфные материалы, тонкие плёнки, порошки, коллоидные системы и биологические объекты [7]. При этом регистрация спектра, как правило, не требует разрушения исследуемого образца и может осуществляться с использованием небольших объёмов вещества.

Для количественного описания процессов рассеяния используется понятие сечения рассеяния – это эффективная площадь, характеризующая вероятность взаимодействия фотона с молекулой [8]. Чем больше сечение, тем выше интенсивность рассеяния. Для большинства молекул эффективное сечение КР чрезвычайно мало – порядка 10^{-30} см^2, что делает сигнал слабым и требующим значительного усиления. Для сравнения, характерные сечения флуоресценции биомолекул составляют 10^{-16}–10^{-17} см^2 [9]. Поэтому зачастую при измерении спектров КР флуоресценция подавляет весь полезный сигнал от образца [10].

Высокая селективность КР сопровождается фундаментальными ограничениями. Слабость сигнала делает метод требовательным к мощности лазера, времени накопления и качеству оптических элементов. Это ограничивает возможность анализа аналитов в малых объемах и низких концентрациях. Флуоресценция биомолекул часто перекрывает весь диапазон комбинационного

рассеяния и делает невозможным выделение характерных полос. В отсутствие усиления метод позволяет обнаруживать аналиты только при относительно высоких концентрациях, несопоставимых с естественными уровнями многих биомаркеров [11,12]. Перечисленные ограничения послужили основой для развития методов усиления сигнала КР. Наиболее широко применяемым из них стал метод комбинационного рассеяния, усиленного поверхностью, или гигантское комбинационное рассеяние (Surface Enhanced Raman Spectroscopy – SERS или ГКР).

1.1.2. Механизмы усиления ГКР

В 1970-х годах несколько исследовательских групп установили, что КР сигнал от молекул органических соединений, таких как пиридин, значительно усиливается при адсорбции на шероховатой металлической подложке [13–15]. Впервые необычно высокая интенсивность КР была экспериментально обнаружена в работе M. Fleischmann, P. J. Hendra и A. J. McQuillan в 1974 году [13], которые объяснили увеличение сигнала КР увеличением площади поверхности серебряного электрода и, соответственно, количества рассеивающих молекул. Позднее в фундаментальных исследованиях D. L. Jeanmaire и R. P. Van Duyne [14], а также M. G. Albrecht и J. A. Creighton [15] было показано, что наблюдаемое усиление не может быть объяснено исключительно увеличением площади поверхности и связано с особыми электронно-оптическими свойствами металлических наноструктур. Авторы установили ключевую роль состояния поверхности и условий адсорбции, а также выдвинули концепцию совместного вклада электромагнитного и химического механизмов усиления. Эти работы заложили теоретические и экспериментальные основы спектроскопии ГКР.

Электромагнитный механизм (ЭМ) вносит основной вклад в усиление ГКР и обусловлен возбуждением поверхностных плазмонных резонансов (ППР) в металлических наноструктурах [10]. При резонансном взаимодействии падающего

света с коллективными колебаниями свободных электронов металла происходит многократное усиление локального электромагнитного поля вблизи поверхности.

Необходимым условием реализации ППР является наличие границы раздела металл-диэлектрик. ППР возникает на границе раздела между средой с положительной диэлектрической проницаемостью (диэлектрик, например, воздух, вода, стекло) и средой с отрицательной действительной частью комплексной диэлектрической проницаемости $\varepsilon'<0$ (металл). Наиболее эффективно ППР наблюдается у благородных металлов (золото, серебро) и меди, поскольку они обладают отрицательными значениями действительной и относительно малыми значениями мнимой части комплексной диэлектрической проницаемости ε'' [16]. Отрицательное значение ε' указывает на способность свободных электронов поддерживать коллективные колебания – плазмоны, тогда как малая ε'' минимизирует диссипацию энергии. Если частота падающего электромагнитного поля совпадает с собственной частотой коллективных колебаний плазмонов на поверхности металла, происходит резонансное усиление поля [10]. Для возбуждения ППР используют, как правило, p-поляризованный свет (электрическое поле ориентировано параллельно плоскости падения), поскольку при перпендикулярной поляризации (s-поляризованный свет) поверхностные плазмоны возбуждаются слабее [10].

В местах с резкими изгибами, зазорах между наночастицами или на заостренных особенностях структуры происходит гигантское локальное усиление электрического поля – локализованный поверхностный плазмонный резонанс (ЛППР) – формируются области, называемые в литературе "горячие точки" [17]. Интенсивность КР-сигнала в этих областях пропорциональна четвёртой степени отношения локального и падающего полей:

$$G_{EM} \approx \left|\frac{E_{loc}(\omega_{exc})}{E_0}\right|^2 \times \left|\frac{E_{loc}(\omega_{RS})}{E_0}\right|^2 \approx \left|\frac{E_{loc}}{E_0}\right|^4$$

где E_{loc} — локальное электромагнитное поле, E_0 — падающее поле, ω_{exc} и ω_{RS} — частоты возбуждающего и рассеянного излучения соответственно [18].

Вблизи горячих точек молекулы находятся в экстремально усиленном локальном электромагнитном поле, что приводит к резкому увеличению вероятности КР, изменению их ориентации и адсорбции, модификации электронной структуры, появлению новых спектральных мод, флуктуациям сигналов и возможным фотохимическим процессам [19]. По сути, молекула в горячей точке действует как высокоэффективная светорассеивающая антенна, а ее обычный слабый КР сигнал значительно усиливается за счет окружающей плазмонной среды. По разным оценкам усиление сигнала ГКР за счет ЭМ составляет 10^3-10^{11} в зависимости от типа рассматриваемой усиливающей структуры [10,17].

Химический механизм (ХМ) связан с изменением электронной структуры молекулы при её адсорбции на поверхности металла. В отличие от электромагнитного механизма, химическое усиление носит локальный и молекулярно-специфический характер. Существующие теории говорят о том, что ХМ обусловлен переносом заряда между молекулой и металлом, гибридизацией электронных состояний, изменением поляризуемости молекулы в адсорбированном состоянии и появлением новых резонансных переходов [20,21]. Химический вклад обычно обеспечивает усиление на уровне 10^1–10^3 и проявляется преимущественно для молекул, находящихся в непосредственном контакте с поверхностью металла [19]. Он сопровождается изменением относительных интенсивностей полос, появлением новых линий и смещением частот, что отличает его от чисто электромагнитного усиления, которое усиливает все полосы пропорционально. Важной особенностью ХМ является его селективность: для разных молекул, даже при одинаковых условиях, вклад ХМ в усиление сигнала может различаться.

Современные экспериментальные и теоретические исследования показывают, что усиление ГКР обусловлено суперпозицией электромагнитного и химического механизмов [22]. Электромагнитный механизм определяет основную величину

усиления, тогда как химический механизм модифицирует спектральный отклик, влияя на относительную интенсивность колебательных полос.

Благодаря совместному действию механизмов усиления эффективное сечение ГКР составляет порядка 10^{-20} – 10^{-15} см^2, что позволяет регистрировать сигнал на фоне флуоресценции и детектировать вещества в чрезвычайно низких концентрациях [23].

1.2. ГКР-активные структуры

В зависимости от способа организации плазмонно-активной поверхности ГКР-структуры условно делят на две большие группы: суспензии металлических наночастиц (коллоиды) и планарные подложки. На Рисунке 1.3 оби обозначены как Colloidal и Solid соответственно.

К ключевым параметрам ГКР-активных структур относятся: (i) способность материала поддерживать поверхностные плазмоны; (ii) наличие нанометровых особенностей поверхности (острия, межчастичные зазоры), где локализуется усиленное электромагнитное поле; (iii) химическая инертность и стабильность материала в условиях анализа; (iv) воспроизводимость и однородность коэффициента усиления по поверхности, необходимые для количественных измерений; (v) низкий собственный фон (спонтанное КР или флуоресценция материала подложки); (vi) технологичность и масштабируемость производства.

Рисунок 1.3 – Типы ГКР-активных структур [24]

1.2.1. Коллоидные наночастицы

Коллоидные наночастицы благородных металлов (Ag, Au) представляют собой дисперсные системы, состоящие из металлических частиц наноразмерного диапазона, стабилизированных в жидкой среде за счёт электростатических или стерических взаимодействий. ГКР-активность коллоидных наночастиц обусловлена их способностью формировать области локального усиления электромагнитного поля в межчастичных зазорах или на участках с высокой кривизной поверхности [17]. Коэффициент усиления коллоидных наночастиц достигает 10^6-10^{11}, что позволяет регистрировать спектры при ультранизких концентрациях вплоть до единичных молекул [25]. Получать коллоидные растворы наночастиц можно как химическими, так и физическими методами.

Химические методы синтеза основаны на восстановлении ионов металла в растворе с последующим образованием наночастиц и их стабилизацией с помощью поверхностно-активных веществ или ионов. Одним из классических подходов является цитратный метод Туркевича [26], применяемый преимущественно для синтеза золотых наночастиц сферической формы [27–30]. Для синтеза сферических серебряных наночастиц широко применяется метод Ли-Мейсела [31] – восстановление нитрата серебра цитрат-ионами [32,33] и метод Леопольда-Лендла [34] – восстановление нитрата серебра гидроксиламин-ионами [35,36]. Значительное развитие получил метод, основанный на использовании заранее синтезированных зародышей (seed-mediated) для направленного роста наночастиц заданной формы [37]. Данный метод позволяет получать наностержни [38,39], нанокубики [40], нанопроволоки [41,42], нанозвезды [43], нанопризмы [44] и другие анизотропные структуры [45–47] с выраженными плазмонными свойствами. Контроль формы достигается за счёт подбора восстановителей, стабилизаторов и поверхностно-активных веществ.

Физические методы синтеза основаны на диспергировании металлического материала с последующим образованием наночастиц в жидкой среде без использования химических восстановителей. К таким методам относятся лазерная абляция в жидкости [48,49], дуговой разряд [50], распыление металла в жидкой среде [51].

Ключевыми параметрами, определяющими эффективность ГКР-анализа с использованием коллоидных суспензий, являются размер, форма наночастиц и расстояние между ними [52–54]. Оптимальным диапазоном размера наночастиц для получения эффективного усиления ГКР-сигнала принято от 5 до 100 нм [55,56]. Изменение концентрации восстановителя, температуры, pH среды и скорости перемешивания при химическом синтезе приводит к изменению кинетики роста частиц и, как следствие, к смещению полосы ЛППР [57]. Поскольку адсорбция молекул аналита на коллоидных частицах является определяющим фактором возникновения ГКР, необходимо учитывать заряд как наночастиц, так и анализируемых веществ [58]. Очевидно, что одноименно заряженные молекулы и частицы будут взаимодействовать между собой гораздо слабее. Контролируемая агрегация наночастиц в растворе может значительно повысить чувствительность ГКР-анализа [59]. Однако чрезмерная агрегация может привести к тому, что наночастицы в растворе выпадут в осадок и какой-либо дальнейший анализ будет невозможен [58]. Не менее важным фактором является состояние поверхности наночастиц. Наличие агрегирующих агентов, стабилизаторов или поверхностных лигандов может препятствовать адсорбции анализируемых молекул и искажать ГКР-спектр вещества [60].

Таким образом, коллоидные наночастицы являются эффективными ГКР-структурами, обеспечивающими высокую чувствительность за счёт формирования локальных областей усиления. Однако вариабельность размеров и агрегатного состояния частиц, изменение их оптических свойств при взаимодействии с

компонентами образца и недостаточная стабильность коллоидов ограничивают воспроизводимость количественного анализа. Это определяет целесообразность применения более стабильных планарных ГКР-подложек при разработке воспроизводимых аналитических методик.

1.2.2. Планарные подложки

Намного большей стабильностью, воспроизводимостью и пригодностью для рутинного анализа обладают планарные подложки (планарный - расположенный на плоскости). В общем случае, как показано на Рисунке 1.3, такие ГКР-структуры представляют собой основу, которой может быть практически любой материал в твердом агрегатном состоянии (стекло, кремний, полимер, бумага и т.д.), с нанесенным на нее ГКР-активным слоем металла (золото, серебро). Также в конструкцию планарной подложки могут быть включены дополнительные слои, такие как адгезионные подслои (Ti, Cr), защитные или функциональные покрытия (SiO_2, Al_2O_3, графен).

Существующие методы формирования ГКР-активного слоя представляют собой иммобилизацию наночастиц из раствора [61,62], электрохимическое и химическое травление [63,64], вакуумные методы осаждения [65], литографические методы [66,67], а также гибридные подходы [68,69].

Исторически первыми планарными ГКР-подложками (и в целом первыми ГКР-структурами) были серебряные электроды, используемые для экспериментов по исследованию электрохимически осажденного пиридина [13–15]. Электрохимическое травление – это контролируемый процесс растворения металла в среде электролита при приложении внешнего источника тока, приводящий к формированию нано-и микрорельефа поверхности металлической пластины. Помимо серебряных подложек, электрохимическим травлением возможно получать и золотые шероховатые поверхности [70].

Классические электрохимически обработанные электроды дают усиление сигнала порядка 10^3–10^4 [63]. Более современный подход [64] показывает, что для сложных структур, состоящих из мембран серебряных нанопроволок, обработанных методом электрохимической циклической вольтамперометрии, коэффициент усиления для аминотиофенола и кристаллического фиолетового (краситель) составляет в среднем 1.24×10^9.

Электрохимически можно не только травить объемный материал, но и осаждать из соответствующего раствора наночастицы металла на проводящую подложку [71,72]. Серебряные подложки получают осаждением из раствора нитрата серебра $AgNO_3$, а золотые – из раствора тетрахлороаурата водорода $HAuCl_4$. Основой в таких структурах может быть электропроводящий графен [73], тонкая пленка ITO (indium tin oxide, оксид индия олова) [74], стеклоуглеродный электрод [72]. Коэффициент усиления таких подложек составляет от 9.1×10^5 [75] до $<10^9$ [71] для низкомолекулярных органических кислот и родамина 6G (R6G).

Главным недостатком ГКР-подложек, получаемых методами электрохимического травления и/или осаждения, является ограниченный контроль над их конечной морфологией, что неизбежно снижает воспроизводимость результатов от партии к партии. Процессы чувствительны к концентрации электролита, скорости травления, силе тока, исходному состоянию поверхности [68]. Дополнительный фактор нестабильности – конкурентная адсорбция галогенид-ионов из электролита [76]. Подложки, сформированные осаждением коллоидных наночастиц, наследуют фундаментальные ограничения самих коллоидных систем — полидисперсность и склонность к неконтролируемой агрегации.

Альтернативой становятся методы, предоставляющие возможность получать контролируемую периодическую структуру. Наиболее распространенным методом получения периодических структур является литография, которая представляет собой совокупность методов формирования заданного микро- или нано-рельефа на

поверхности твёрдого материала путём пространственно-селективного переноса рисунка (шаблона) с использованием внешнего воздействия. В зависимости от типа воздействия различают фотолитографию [77], электронно-лучевую [78] и ионно-лучевую литографию [79], лазерную интерференционную литографию [80], а также наносферную литографию [81].

Электронно-лучевая литография (ЭЛЛ) предоставляет практически неограниченные возможности для проектирования периодических массивов наноструктур любой формы (точки, диски, треугольники, «бабочки») с нанометровой точностью [67,78,82–84]. Димерные нано-столбики показали коэффициенты усиления $4.3–8.0\times10^{9}$ для R6G и 4-меркаптопиридина (4-MPy) при относительном стандартном отклонении 3.2–5.6% [85]. Золотые «бабочки» достигают коэффициента усиления 7×10^{11} для р-меркаптоаланина [86]. Массивы различных форм (круги, треугольники, квадраты, пяти- и шестиугольники, звёзды) на SiO2/Si показали, что шестиугольники дают максимальное усиление 3.57×10^{6}, а круги — минимальное 6.11×10^{4} для родамина-Б (RhB) [78].

Несмотря на выдающуюся воспроизводимость и гибкость конструкции, метод ЭЛЛ ограничен высокой стоимостью оборудования, низкой производительностью и масштабируемостью, что препятствует его полноценному внедрению в рутинный ГКР-анализ [84,87]. В результате ГКР-подложки, изготовленные на основе ЭЛЛ, в основном используются в качестве эталонных систем, модельных платформ для фундаментальных плазмонных исследований и ориентиров для оценки альтернативных, более масштабируемых подходов к изготовлению усиливающих структур.

Другим распространенным подходом, разработанным группой R. P. Van Duyne [88], является наносферная литография (НСЛ). Этот метод основан на самоорганизации монослоя полимерных или SiO_2 наносфер на твердой основе, которая впоследствии служит шаблоном для нанесения слоя ГКР-активного металла.

После удаления сфер на поверхности подложки формируется периодическая структура, повторяющая рисунок зазоров в шаблоне [89]. В сравнении с ЭЛЛ технология НСЛ проще и позволяет получать более масштабируемые массивы наноструктур с меньшими временными затратами, однако контроль над их формой и, в особенности, над шириной зазоров между сферами ограничен [90].

В последние годы для формирования ГКР-подложек набирает популярность метод лазерной интерференционной литографии (ЛИЛ) [80,91,92]. Он основан на селективном лазерном облучении материалов двумя или более когерентными лазерными лучами, которые накладываются на поверхность образца и формируют интерференционную картину [93]. Структуры, получаемые методом ЛИЛ, как правило, требуют дополнительной постобработки, например, в виде травления [94], что усложняет технологический процесс и увеличивает суммарную погрешность воспроизведения геометрии. Несмотря на сравнительно высокую масштабируемость и возможность настройки геометрии структуры, ЛИЛ требует специализированного лазерного оборудования и оптических систем, что ограничивает её использование вне специализированных лабораторий.

Подложки, полученные методами литографии, демонстрируют высокую воспроизводимость геометрии, однако большинство сравнительных экспериментов выполнено на низкомолекулярных красителях и тиолсодержащих молекулах; перенос этих результатов на высокомолекулярные соединения требует отдельной проверки. Также широкое внедрение ГКР-подложек, полученных методами литографии, сдерживается экономическими (высокая стоимость производства) и технологическими (временные затраты, малая масштабируемость) барьерами. Это создаёт потребность в поиске компромиссных решений, сочетающих достаточный уровень контроля морфологии с приемлемой стоимостью и масштабируемостью.

Одним из таких компромиссных подходов является использование вакуумных методов напыления тонких металлических плёнок, в особенности термического и

электронно-лучевого испарения, для получения планарных ГКР-подложек с контролируемой, но случайной (непериодической) морфологией. Физическое осаждение из газовой фазы (Physical Vapor Deposition, PVD) – это технология получения тонких металлических пленок методом испарения, за счет переноса атомов металла на подготовленную основу ГКР-подложки в условиях вакуума [95]. Ключевое отличие термического и электронно-лучевого испарения в способе нагрева материала для дальнейшего испарения. Термическое испарение реализуется посредством прямого резистивного нагрева - электрический ток пропускается через тигель или спираль, изготовленные из тугоплавкого материала (вольфрам, молибден), в котором находится испаряемый материал. При электронно-лучевом испарении на тигель воздействуют высокоэнергетическим сфокусированным пучком электронов, что способствует локальному нагреву. Ускоренные в электронной пушке электроны передают свою кинетическую энергию небольшому участку поверхности материала-мишени, размещённого в водоохлаждаемом тигле. Локальный нагрев минимизирует потери энергии и обеспечивает точный контроль процесса.

Усиление ГКР-сигнала определяется морфологией осажденного металлического слоя, которая зависит от угла падения потока испаряющихся атомов, температуры подложки, количества испаряемого материала и скорости осаждения [96–100]. Например, в систематическом исследовании M. Oh и соавторов [97] показано влияние температуры кремниевой основы на структуру пленок Ag при термическом испарении. Угол и скорость осаждения оставались постоянными - 86^{o} и 0.5 нм/с соответственно, толщина пленок оценивалась от 1 до 3 мкм. Показано, что при температурах ниже 100^{o}C реализуется столбчатый рост слоя серебра. При повышении температуры до 100^{o}C появляется плоская плёнка Ag, состоящая из доменов микрометрового размера. ГКР-анализ на предложенных подложках проводился с использованием молекул бензилтиола и показал наибольший коэффициент усиления 6×10^{7} для подложек, сформированных при температуре 70^{o}C.

Также была обнаружена существенная зависимость размера частиц и плотности их расположения на поверхности от количества термически испарившегося серебра и золота [98]. Показано, что при испарении образца массой ~2 мг преобладают кластеры размером ~9 нм, тогда как при испарении более крупного образца массой ~11 мг доминирующие кластеры имеют диаметр ~35 нм. Толщина кластеров, соответственно, увеличивалась с 1.3 до 7 нм. Исследования массивов серебряных наностержней, полученных под разными углами осаждения, показали экспоненциальный рост коэффициента усиления с увеличением угла (78°–84°) на три порядка; максимальное усиление составило 7.2×10^8 [99].

I. Boginskaya с соавторами показали [100], что подложки в виде тонких пленок серебра, полученные электронно-лучевым испарением демонстрируют воспроизводимое усиление ГКР-сигнала белка миоглобина (10 мкг/мл) до 10^5 раз по сравнению с контролем в виде алюминиевой подложки. В работе также отмечается, что непрерывные плёнки превосходят островковые по теплопроводности, что позволяет использовать более высокую мощность лазера (до 65 мВт) без деградации подложки. Эффективность подложек, полученных методом электронно-лучевого напыления серебра на различные основы была продемонстрирована на таких сложных биологических аналитах как ангиотензинпревращающий фермент [101,102], человеческий сывороточный альбумин [103], вирусы (*rabbit myxomatosis virus, canine distemper virus, tobacco mosaic virus and potato virus X*) [104]. В таблице 1.1 представлены сравнительные характеристики методов формирования планарных ГКР-подложек с учетом исследуемого аналита, коэффициента усиления и оценкой масштабируемости и стоимости изготовления.

Таблица 1.1 – Сравнение различных методов формирования планарных ГКР подложек.

Метод	**Аналит**	**Коэффициент усиления**	**Масштабируемость**	**Стоимость**	**Источник**
Электрохимическое травление	Py, ATP, CV	10^3–10^4, $1{,}24\times10^9$	высокая	низкая	[13–15,63,64,70]
Электрохимическое осаждение	Низкомолекулярные органические кислоты, R6G	$9{,}1\times10^5$ – $<10^9$	высокая	низкая	[73,75,74,72,71]
Осаждение коллоидных наночастиц	CV	2×10^4	высокая	низкая	[105]
Литография (ЭЛЛ, НСЛ, ЛИЛ)	R6G, 4-MPy, p-Cys, RhB	$6{,}11\times10^4$ – 7×10^{11}	низкая	высокая	[78,80,85,86,88–94]
Термическое испарение (PVD)	BnSH	6×10^7	средняя	средняя	[96–98]
Электронно-лучевое испарение (PVD)	BPE, миоглобин, ACE, HSA, вирусы	10^5 – $7{,}2\times10^8$	средняя	средняя	[99–104]

Py – пиридин; ATP – аминотиофенол; CV – кристаллический фиолетовый; R6G – родамин 6G; 4-MPy – 4-меркаптопиридин; Cys – цистеин, β-меркаптоаланин; RhB – родамин-Б; BnSH – бензилтиол; BPE – 1,2-бис(4-пиридил)этан; ACE – ангиотензинпревращающий фермент; HSA – человеческий сывороточный альбумин.

Таким образом, планарные наноструктурированные металлические подложки представляют перспективную основу для воспроизводимого ГКР-анализа благодаря стабильной геометрии, возможности контролируемого изготовления и пространственного позиционирования области измерения. Методы термического и электронно-лучевого испарения выступают как важные технологии получения планарных ГКР-подложек, предлагая баланс между контролем морфологии, масштабируемостью и стоимостью изготовления – промежуточную альтернативу между сложной и низкопроизводительной литографией и нестабильными осажденными наночастицами. Для аналитических задач высокий коэффициент усиления важен только в сочетании с воспроизводимостью поверхности: при анализе биомолекул снижение разброса сигнала между точками измерения может быть не менее значимо, чем максимальное локальное усиление.

1.3. Пробоподготовка

В отличие от низкомолекулярных соединений, для которых адсорбция на поверхности металла, как правило, носит сравнительно простой и однозначный характер, высокомолекулярные объекты представляют собой крупные, пространственно-развернутые молекулы со сложным строением, содержащие множество функциональных групп, потенциально способных участвовать во взаимодействии с металлической поверхностью. В результате процесс их адсорбции на ГКР-подложке является многофакторным и может приводить к различным ориентациям молекулы относительно поверхности, а также к формированию неоднородных по структуре и составу приповерхностных слоёв. На примере молекулы миоглобина было показано [106] что при ультранизких концентрациях 10^{-11} М, фактически одиночных молекулах, адсорбированных на наночастицах серебра, наблюдаются значительные флуктуации спектра. Авторы проводили серию измерений по 1 секунде с промежутком между измерениями 60 секунд (Рисунок 1.4).

Это наблюдение связывают, в том числе, с различными конформационными состояниями, которые может принимать молекула белка [107].

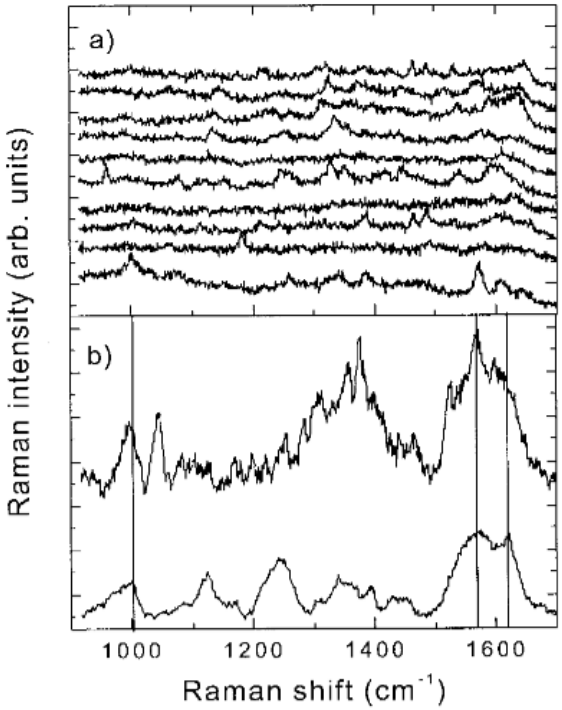

Рисунок 1.4 – (а) ГКР-спектры миоглобина 10^{-11} М в растворе наночастиц серебра, иммобилизованного на поверхности стекла, полученные при времени интегрирования 1 сек. (промежуток между двумя последовательными измерениями 60 сек.); (б) Верхняя кривая - спектр, полученный путем суммирования 100 серий ГКР-спектров, нижняя кривая – спектр комбинационного рассеяния сухого миоглобина (время интегрирования 30 сек.) [106]

Для преодоления таких фундаментальных ограничений воспроизводимости может потребоваться химическое или физическое воздействие на белковый раствор. В следующих параграфах приведены возможные способы контроля адсорбции белка на металлической поверхности с учетом их реализации в качестве дополнительных этапов пробоподготовки в ГКР-анализе.

1.3.1. Осаждение аналита на подложку

В ГКР-анализе биологических образцов важную роль играют вопросы, связанные с их предварительной подготовкой. Следует особо выделить эффективность адсорбции или, в более общем смысле, перенос анализируемого вещества из раствора на подложку. При работе с планарными подложками можно выделить два способа нанесения аналита: капельное осаждение с последующим высыханием [108] и инкубацию подложки в растворе аналита [109].

На примере красителя "метиленовый синий" показано, что при инкубации подложки в растворе аналита достигается его более равномерная адсорбция [110]. За счет присутствия тиазинового кольца (кольцо из четырех атомов углерода, одного атома азота и одного атома серы) он хорошо адсорбируется на золотой поверхности, используемой в работе. Известно, что тиольные и серосодержащие вещества имеют хорошую способность к хемосорбции как на золоте, так и на серебре [111–113]. Их часто используют в качестве функционализирующих покрытий при ГКР исследованиях аналитов, имеющих плохую способность к хемосорбции на этих металлах, а также для селективного определения целевого вещества в смеси. Так, в работе [114] использовали 4-меркаптофенилбороновую кислоту, обладающую тиольной группой, для исследования гликированного альбумина на серебряных подложках. В другом исследовании [115] золотые планарные подложки предварительно функционализировали в растворе 11-меркапто-ундекановой кислоты для замены цитратных лигандов на тиольные группы для исследования бычьего сывороточного альбумина и иммуноглобулина кролика. Однако, функционализация подложек так или иначе будет влиять на ГКР-спектр исследуемого вещества. Поскольку тиольная группа располагается непосредственно на поверхности подложки, она будет вносить свой вклад в результирующий спектр, что может приводить к неправильной интерпретации результатов анализа. Помимо ограниченной способности к хемосорбции, метод инкубации подложек ограничен и

объемом раствора аналита. Как правило, для осаждения аналита вымачиванием подложки требуется от десятков микролитров образца.

Метод капельного осаждения характеризуется нанесением небольшого объема анализируемого вещества (порядка единиц микролитров) непосредственно на ГКР-подложку с последующим высыханием образца до формирования сухого осадка. В отличие от инкубации, при таком способе нанесения весь исследуемый материал остается на поверхности подложки и пригоден к анализу. Также данный метод не требует функционализации подложки.

Основным недостатком капельного нанесения является неравномерное распределение аналита по поверхности. Известно, что при высыхании капли, содержащей частицы растворенного вещества, естественным образом формируется неоднородный осадок в виде "кофейного кольца" [116]. В 1997 году R.D. Digan с соавторами предложили механизм [117], согласно которому это явление обусловлено геометрическим ограничением: свободная поверхность, ограниченная фиксированной линией контакта, выталкивает жидкость наружу, чтобы компенсировать потери на испарение. Форма конечного осадка зависит от концентрации частиц (анализируемого вещества) в осажденном растворе. Например, было показано [118], что при высыхании капли N-(фосфонометил)-глицина в концентрациях больше, чем $1x10^{-3}$ М (169 мкг/мл), образуется кофе-ринг, при меньших концентрациях по наблюдениям авторов кофе-ринг отсутствует.

Во избежание неравномерного распределения осадка, а также для осуществления контролируемой адсорбции в раствор аналита можно добавлять поверхностно-активные вещества (ПАВ) [119,120] или желирующие агенты [121,122], либо предварительно обработать поверхность подложки гидрофобизатором [116]. Однако известно, что и ПАВы, и гидрофобизаторы вносят свой вклад в ГКР-спектр аналита [123]. В связи с этим необходимо использование методов, которые позволяли бы управлять анализируемым веществом без изменения его химического состава. В

случае биологических проб такими методами могут выступать ультразвуковое [124] и лазерное [125] воздействие на образец в процессе его сушки.

1.3.2. Использование лазерного и ультразвукового воздействия при пробоподготовке биологических образцов

Воздействие лазерного излучения на растворы белков может приводить к инициации процессов нуклеации и последующей кристаллизации. Данное явление известно как лазерно-индуцированная кристаллизация и активно исследуется в последние годы [126]. В конце 20-го века P. Garetz и его коллеги при исследовании генерации второй гармоники в пересыщенных водных растворах мочевины обнаружили неожиданное явление — мгновенную кристаллизацию под действием лазерного излучения [127]. В экспериментах использовались образцы объёмом порядка нескольких миллилитров, облучаемые серией линейно поляризованных расфокусированных наносекундных лазерных импульсов с длиной волны 1064 нм и интенсивностью в диапазоне 50–250 МВт/см². Сами авторы при объяснении наблюдаемого эффекта проводят параллель с оптическим эффектом Керра. Согласно их гипотезе, воздействие лазера создает слабый крутящий момент для молекул мочевины в растворе, который выравнивает все молекулы так, чтобы из наиболее поляризуемая ось была параллельна поляризации лазерного излучения. Иными словами, индуцированная электрическим полем ориентация молекул приводит к снижению энтропийного вклада в свободную энергию активации процесса нуклеации, тем самым облегчая его инициирование.

В последующие десятилетия многочисленные исследования подтвердили, что лазерное облучение приводит к увеличению вероятности нуклеации в различных системах типа растворённое вещество–растворитель, например, в водном растворе гистидина [128], сахарозы [129] или растворе лизоцима в буфере [130]. Экспериментальные исследования также демонстрируют, что применение лазерного

излучения позволяет не только инициировать кристаллизацию белков в метастабильных условиях, но и увеличивать скорость роста кристаллов и их качество [131].

В работе [132] показана зависимость анизотропии белковых молекул лизоцима в растворе от поляризации используемого при облучении лазера. Авторы использовали лазерный луч непрерывного действия с линейной и круговой поляризацией. Согласно полученным результатам, линейная поляризация лазера более эффективна для нуклеации и формирования кристаллов лизоцима. Механизм кристаллизации авторы также объясняют ориентацией молекул параллельно оси поляризации лазера вследствие эффекта Керра.

Однако, во всех представленных работах используются либо большие концентрации целевых образцов, либо буферные растворы, что обусловлено целями авторов - как правило, получение больших кристаллов для дальнейшего изучения методом рентгеновской дифракции или для исследований в области структурной биологии и разработки лекарств.

В контексте КР-анализа сравнительно недавно была представлена детализированная работа [125], в которой исследовали кристаллы лизоцима, протеиназы и ферритина, полученных лазерно-индуцированной кристаллизацией непрерывным диодным ИК-лазером (785 нм, 75мВт) на чистых и покрытых двумя разными гидрофобизаторами предметных стеклах. Несмотря на то, что целью работы была оптимизация процесса получения белковых кристаллов для макромолекулярной рентгеновской кристаллографии, КР спектроскопия была использована для валидации структурных свойств полученных белковых кристаллов. Авторы представили детальную расшифровку колебательных полос, однако, они ограничились большими концентрациями белков (20-40 мг/мл) и использовали буферные растворы (ацетат натрия и трометамин).

Ультразвуковое воздействие рассматривается как эффективный инструмент управления адсорбционными процессами белков на межфазных границах. Исследования показывают, что ультразвуковая стоячая волна способна существенно модифицировать кинетику и термодинамику сорбции белковых молекул, обусловливая как ускорение их переноса к поверхности, так и перераспределение уже адсорбированного слоя [133]. На макроуровне этот эффект реализуется через активацию адсорбционно-десорбционных процессов: акустическое поле снижает энергетический барьер десорбции и одновременно повышает вероятность повторной фиксации молекул в энергетически более выгодной ориентации [134]. В результате формируется плотный и структурированный адсорбционный слой.

Ключевым механизмом, определяющим перечисленные эффекты, является акустическая кавитация. Образование, рост и имплозия микропузырьков сопровождаются локальными экстремальными значениями температуры и давления, генерацией микроструй и ударных волн, что ускоряет массоперенос в приповерхностном слое [135]. В условиях кавитации белковые молекулы подвергаются значительным механическим напряжениям, что может приводить к их частичной денатурации, агрегации и формированию устойчивых межмолекулярных связей [136]. При этом ультразвуковая обработка не разрушает функциональность белков, а, напротив, может способствовать раскрытию функциональных групп, улучшению поверхностной активности и стабилизации межфазных систем, например, эмульсий [137,138]. Такие конформационные перестройки увеличивают число центров, способных взаимодействовать с твёрдой поверхностью, тем самым усиливая адгезию и плотность покрытия.

В контексте ГКР-анализа перечисленные эффекты приобретают принципиальное значение. Эффективность регистрации ГКР-сигнала определяется не только количеством молекул в зоне «горячих точек», но и их ориентацией относительно плазмонной поверхности. Ультразвуковое осаждение обеспечивает

формирование компактных кристаллоподобных агрегатов белка. Так, для миоглобина на Ag-подложках, полученных методом электронно-лучевого испарения, УЗ-обработка на частоте 1,4 МГц привела к дополнительному усилению отдельных спектральных полос более чем в 40 раз по сравнению с сушкой на воздухе [124]. Систематическое изучение частотного диапазона (90 кГц – 1,7 МГц) показало, что максимальное усиление амплитуды ГКР-спектров миоглобина на наноструктурированных серебряных плёнках достигается при 1,7 МГц, при этом наблюдаются различные конформационные состояния белка, отражающиеся в структуре спектров [139]. Вместе с тем эффективность УЗ-пробоподготовки существенно зависит от топологии самой ГКР-подложки. На предварительно протравленных стеклянных подложках с нанесённым серебром ультразвуковое осаждение обеспечивает увеличение интенсивности спектров до 9 раз при времени сушки менее минуты, причём максимальный эффект достигается при промежуточной шероховатости поверхности. Это свидетельствует о необходимости совместной оптимизации параметров акустического поля и морфологии плазмонной структуры.

Таким образом, воздействие лазерного излучения ИК-диапазона на белковый раствор способствует упорядочению молекул посредством их кристаллизации. Открытым остается вопрос влияния лазерного излучения на растворы белков в низких концентрациях (менее 100 мкг/мл). Ультразвуковое воздействие формирует уникальные условия для управления адсорбцией, агрегацией и конформационным состоянием белков, что делает его перспективным методом пробоподготовки для ГКР-анализа. Не до конца раскрыт вопрос влияния взаимодействия частоты ультразвукового воздействия и параметров морфологии подложек на форму и амплитуду ГКР-спектров белков.

1.3.3. Влияние морфологии ГКР-структур на ГКР-спектр

Влияние морфологии поверхности ГКР-подложки на форму и амплитуду ГКР-сигнала аналита можно выделить в отдельный пункт. Так, в работе [140] авторы исследуют влияние шероховатости поверхности подложки и толщины слоя серебра на интенсивность ГКР-сигнала 4-аминотиофенола (4-ATP, один из модельных ГКР аналитов). В качестве основы для ГКР-подложек были взяты предметное стекло и полидиметилсилоксан (ПДМС). Было рассмотрено три типа подложек, как показано на Рисунке 1.5, толщина серебряного слоя для каждого типа была 10, 20 и 40 нм. Результаты показывают сильно отличающуюся поверхность условно плоских подложек на основе стекла и ПДМС даже при условии, что их поверхность до напыления серебра имела схожие значения средней шероховатости. Авторы объясняют это особенностями структуры ПДМС, которая деформировалась в условиях вакуума при напылении серебра, что обусловило большую шероховатость итоговой подложки. Очевидно, что наибольшей шероховатостью обладает трехмерная подложка на основе ПДМС - 89 нм против единиц нм для подложек на основе плоских стекла и ПДМС. ГКР-анализ 4-ATP на данных структурах показал интересный результат: для трехмерной подложки характерно усиление сигнала аналита при увеличении толщины напыленного серебра, в то время как для плоских двумерных подложек наибольшее усиление наблюдалось при толщине серебра 10 нм, а затем, при увеличении толщины серебра, резкий спад сигнала для подложки на основе стекла и чуть более плавный спад для подложки на основе ПДМС.

Рисунок 1.5 – Схематичное изображение серебряных ГКР-подложек на различных основах (A) трехмерная серебряная подложка на шаблоне PDMS, (B)

двумерная серебряная плоская подложка на шаблоне PDMS и (C) двумерная серебряная плоская подложка на предметном стекле [140]

Годом ранее был опубликован результат схожего эксперимента [141]. В цитируемой работе рассматривался только один тип подложек - серебро на предметном стекле, но толщина серебряного покрытия составляла 3, 5, 7 и 10 нм, то есть выходила за рамки предыдущего исследования. Авторы также показали зависимость усиления ГКР-сигнала меркаптоаланина (p-Ma, серосодержащая аминокислота) от толщины серебряного слоя. Максимум усиления приходится для покрытия толщиной 7 нм, в то время как меньшая толщина не способствует усилению вовсе. При увеличении толщины серебра сигнал исследуемого вещества несущественно ослаб.

Более раннее исследование говорит о том, что как для серебряных, так и для золотых подложек, ГКР-сигнал увеличивается с увеличением толщины активного слоя [142]. В данной работе в качестве подложки использовали плотноупакованные шарики полистирола, нанесенные на стекло, ГКР-активным слоем был слой серебра, нанесенный магнетронным распылением, толщиной 10, 20, 40, 80 нм или слой золота толщиной 10, 30 и 50 нм. Авторы отмечают, что усиление сигнала аналита на серебряной подложке сопоставимо при толщине серебряного слоя 10 нм и 20 нм. Затем сигнал резко увеличивается при толщине 40 нм и еще незначительно возрастает при 80 нм. С другой стороны, ГКР-сигнал аналита на золотой подложке линейно возрастает с увеличением толщины слоя золота.

Существует ряд аналогичных исследований [143–145] показывающих, что и толщина ГКР-активного слоя, и шероховатость основы ГКР-подложки напрямую влияют на усиление ГКР-сигнала.

Влияние морфологии поверхности ГКР-структуры на форму спектра аналита представлено в работах [146,147]. Исследование проводили на наночастицах различной формы (наносферы, треугольные нанопластинки и нанодэкэдры) с

использованием в качестве аналита АТР. Результат показал, что на более шероховатых нанодэкаэдрах ГКР-сигнал аналита не только более интенсивный, но и более информативный – проявляются колебания, не различимые на других более гладких формах наночастиц.

Таким образом, пробоподготовка является одним из определяющих этапов ГКР-анализа биологических объектов. Пространственное распределение аналита после нанесения и высушивания капли определяет вероятность его контакта с областями максимального усиления и тем самым непосредственно влияет на интенсивность и воспроизводимость спектров. В связи с этим управление процессами осаждения и формированием морфологии высушенного образца может рассматриваться как самостоятельный инструмент оптимизации ГКР-анализа.

1.4. Локализация ГКР-эффекта

Поскольку при ГКР-анализе на планарных подложках аналит располагается непосредственно на их поверхности, одним из важных параметров является область локализации ГКР-эффекта, то есть расстояние от поверхности металлической наноструктуры, на котором сохраняется усиление сигнала. Теоретически эта область определяется пространственным распределением локализованного электромагнитного поля, возникающего при возбуждении поверхностных плазмонных резонансов в металлических наноструктурах. Теоретическое описание пространственного затухания усиления было предложено в ряде работ, основанных на решении уравнений Максвелла для металлических наноструктур [148]. В рамках простейшей модели сферической наночастицы усиление ЭМ поля уменьшается пропорционально r^{-3} при удалении от поверхности. Затухание ГКР-эффекта происходит по формуле $G = \left[\frac{r}{r+d}\right]^{12}$ для одной молекулы, расположенной на расстоянии d от поверхности сферы радиусом r, или $G = \left[\frac{r}{r+d}\right]^{10}$ для монослоя

молекул [149–151]. Таким образом, в зависимости от радиуса сферических наночастиц, теоретически ГКР-эффект может наблюдаться вплоть до 10 нм от поверхности структуры [149].

Экспериментальное исследование локализации ГКР обычно проводят с использованием диэлектрических промежуточных слоев контролируемой толщины, позволяющих изменять расстояние между молекулами аналита и металлической поверхностью. Одним из наиболее распространённых подходов является нанесение тонких слоёв SiO_2 или других диэлектриков поверх металлической наноструктуры. Так, в работе [152] исследовалась зависимость интенсивности ГКР-сигнала от расстояния между молекулами аналита и серебряными наночастицами. Для контроля расстояния использовались диэлектрические слои SiO_2 различной толщины. Было показано, что при увеличении расстояния интенсивность сигнала быстро уменьшается. Для серебряных наночастиц диаметром около 20 нм усиление наблюдалось на расстояниях порядка 1 нм, тогда как для частиц диаметром около 90 нм область наблюдаемого усиления увеличивалась до нескольких нанометров. Авторы связывают это с изменением характеристик локализованных плазмонных мод и увеличением объёма ближнего электромагнитного поля вокруг более крупных наноструктур.

В ряде работ показано, что для более сложных наноструктурированных поверхностей эффективная область действия ГКР может быть значительно больше. Например, в работе [153] была исследована регистрация ГКР-сигнала одноцепочечной ДНК, расположенной на различном расстоянии от серебряной поверхности. Эксперимент показал, что детектируемый сигнал может наблюдаться на расстояниях до ~30 нм, а экстраполяция экспериментальных данных указывает на возможность регистрации сигнала даже на расстояниях порядка 40–45 нм. В работе [154] было показано, что в системах с наноструктурированными серебряными островковыми пленками усиление сигнала сохраняется практически постоянным до

расстояния около 30 нм, после чего резко уменьшается. Схожие результаты получены в работе [155], где между молекулами аналита и золотой наноструктурированной поверхностью вводился диэлектрический слой TiO_2 контролируемой толщины. Было показано, что ГКР может наблюдаться даже при толщине промежуточного слоя до ~60 нм, хотя интенсивность сигнала существенно уменьшается при увеличении расстояния.

Анализ совокупности теоретических и экспериментальных данных показывает, что область локализации ГКР определяется несколькими факторами: геометрией и размерами металлических наноструктур, расстоянием между ними, диэлектрическими свойствами окружающей среды и особенностями морфологии поверхности. В простейших моделях для изолированных наночастиц характерная область усиления ограничена расстоянием порядка 1–10 нм от поверхности металла. Однако в реальных наноструктурированных системах, содержащих ансамбли частиц и локализованные «горячие точки», область детектируемого ГКР-сигнала может достигать нескольких десятков нанометров. Это особенно важно при анализе крупных биологических молекул, размеры которых могут превышать характерную толщину ближнего плазмонного поля.

Для разработки модели описания пространственного затухания ГКР-сигнала над поверхностью подложки важно учитывать оптическую схему спектрометра, что обычно игнорируется в исследованиях. Для этого важно проанализировать конфокальность используемого в работе микроскопа.

Проблема аппроксимации измерительного объёма конфокального микроскопа остаётся предметом исследований на протяжении более трёх десятилетий. В классическом подходе Tabaksblat и соавторы [156] представили измерительный объём в виде цилиндра с высотой, равной удвоенной длине зоны Рэлея, что определяет продольное разрешение микроскопа. Grauw и соавторы [157] уточнили модель на основе гауссовой аппроксимации пучка, однако показали, что она адекватна лишь при

строгом выполнении конфокальности. Everall [158] внёс принципиальный вклад, описав искажения фокального пятна при рефракции на границе раздела сред и продемонстрировав, что аксиальное разрешение может сильно изменяться относительно номинального значения с увеличением глубины фокусировки. Расширение этого подхода к сравнительному анализу типов объективов представлено в работе [159].

В работе [160] авторы систематизировали ограничения предшествующих подходов, связанные с неучтённой негауссовостью пучка, аберрациями объектива и неоднородностью оптических свойств образца, и разработали универсальный математический формализм для описания глубинных профилей. Детальное обсуждение эволюции представлений о точности определения измерительного объема конфокального микроскопа содержится во введении работы [160], что позволяет сослаться на неё как на актуальную базу для построения собственной модели ослабления ГКР-сигнала.

Таким образом, эффективная область пространственной локализации ГКР-сигнала является важным параметром, определяющим требования к расположению аналита относительно поверхности подложки и интерпретацию результатов конфокальных измерений. Опубликованные экспериментальные и теоретические данные характеризуются существенным разбросом оценок дальнодействия ГКР, что может быть связано как с различиями в морфологии подложек и свойствах аналитов, так и с используемыми методиками измерения. Поэтому разработка корректного экспериментального подхода к определению пространственной области локализации ГКР представляет самостоятельную методическую задачу.

1.5. Методы математической обработки в ГКР-анализе

В настоящее время в ГКР-анализе неотъемлемым этапом является обработка спектральных данных с использованием методов математической статистики и

машинного обучения, особенно случае сложных смесей и структурно схожих аналитов. Современные подходы базируются на сочетании методов предобработки, хемометрики и машинного обучения, что позволяет существенно повысить точность идентификации и количественного анализа веществ [161].

Обработка ГКР-спектров представляет собой многоступенчатый процесс, включающий предобработку данных, выделение информативных признаков, применение методов многомерной статистики и построение моделей классификации или регрессии. На первом этапе осуществляется предобработка спектров, направленная на устранение нежелательных искажений и подготовку данных к дальнейшему анализу. Одной из ключевых задач является удаление фоновой составляющей, обусловленной флуоресценцией. Фоновый сигнал, как правило, представляет собой медленно меняющуюся функцию, которая маскирует полезные колебательные полосы. Для его удаления широко применяются методы полиномиальной аппроксимации, а также алгоритмы, основанные на асимметричных наименьших квадратах, такие как airPLS (adaptive iterative reweighted penalized least-squares) и ALS (asymmetric least-squares) [162–164]. Эти методы позволяют адаптивно оценивать базовую линию спектра и вычитать её, минимизируя искажения формы пиков. Также используются вейвлет-преобразования [165] и алгоритмы типа «rubber band», демонстрирующие хорошую устойчивость при обработке сложных спектров [162].

Немаловажным является этап удаления аномальных данных в спектрах, например, космических лучей. В литературе применяются различные подходы к выявлению и удалению выбросов. Классические методы основаны на статистическом анализе данных и включают использование пороговых критериев [166]. Эти методы эффективны при близости распределения данных к нормальному, однако их применение ограничено в случае высокоразмерных и нелинейных спектральных данных. В последние годы всё большее распространение получают методы

машинного обучения для обнаружения аномалий, включая алгоритмы на основе кластеризации (например, k-means) [167] и ансамблевых моделей (таких как Isolation Forest) [168]. Данные методы не требуют строгих предположений о распределении данных и способны эффективно выявлять сложные, нелинейные выбросы в высокоразмерных спектральных массивах.

Следующим этапом является подавление шумов. Шум в ГКР-спектрах может иметь как инструментальную природу, связанную с характеристиками детектора, так и статистическую, обусловленную неоднородностью усиления в так называемых «горячих точках». Для сглаживания спектров широко применяется фильтр Савицкого–Голея [169], позволяющий уменьшить шум при сохранении формы спектральных линий [170]. Однако стоит учитывать, что чрезмерное сглаживание (например, более 15 точек в окне) может привести к потере важной информации, особенно в случае низкоинтенсивных полос, характерных для биологических объектов [171]. Альтернативой выступают методы вейвлет-фильтрации, обеспечивающие эффективное разделение сигналов по частотным компонентам [172].

Значительное внимание в обработке ГКР-спектров уделяется нормировке, поскольку интенсивность сигнала может существенно варьироваться в зависимости от экспериментальных условий, таких как мощность лазера, фокусировка или морфология подложки. Для устранения этих эффектов используются различные методы нормировки, включая векторную нормировку [173,174], нормировку по площади спектра [175], а также статистические подходы, такие как Standard Normal Variate (SNV) [176] и Multiplicative Scatter Correction (MSC) [177].

Обзор всех возможных методов предварительной обработки спектральных данных представляет собой отдельное полноценное исследование и невозможен в рамках литературного обзора. Одна из наиболее полных систематических оценок методов предварительной обработки спектральных данных представлена в работе [178].

После этапа предобработки осуществляется выделение информативных признаков и анализ структуры данных. Поскольку SERS-спектры представляют собой высокоразмерные наборы данных, их эффективное исследование невозможно без применения методов многомерной статистики. Наиболее распространённым методом является Principal Component Analysis (PCA), позволяющий снизить размерность данных и выделить основные источники вариации. Преобразование исходных спектров в пространство главных компонент способствует устранению корреляций между переменными и выделению наиболее значимых признаков. PCA широко используется как самостоятельный инструмент визуализации, так и в качестве предварительного этапа перед построением классификационных моделей [179].

Для задач классификации часто применяется Linear Discriminant Analysis (LDA), который позволяет максимизировать различия между заранее заданными классами. Комбинация PCA и LDA является одной из наиболее распространённых стратегий анализа SERS-данных в биомедицинских приложениях, включая диагностику заболеваний [180]. В задачах количественного анализа широко используется метод регрессии Partial Least Squares (PLS), позволяющий устанавливать связь между спектральными данными и концентрацией анализируемых веществ [181]. Данный метод особенно эффективен в условиях высокой коллинеарности переменных и присутствия шума.

Особенности анализа биологических объектов методом ГКР обусловлены высокой гетерогенностью исследуемых систем и вариабельностью спектральных сигналов. Наличие «горячих точек» приводит к значительным флуктуациям интенсивности, что требует применения методов статистической обработки и нормализации. Перекрытие спектральных полос различных биомолекул усложняет интерпретацию данных и требует использования многомерных методов анализа. Кроме того, низкое отношение сигнал/шум и сложный состав биологических образцов

обуславливают необходимость применения продвинутых алгоритмов фильтрации и машинного обучения.

Несмотря на значительный прогресс в области обработки спектральных данных, остаётся ряд нерешённых проблем. К ним относятся отсутствие стандартизации методов обработки, высокая зависимость результатов от выбора параметров алгоритмов, а также риск переобучения моделей при использовании методов машинного обучения. В литературе неоднократно отмечается необходимость строгой валидации моделей, включая использование кросс-валидации и независимых тестовых выборок [182,183].

В условиях больших объемов многомерных ГКР-спектров математическая обработка является неотъемлемой частью ГКР-анализа и напрямую определяет достоверность получаемых результатов. Современные подходы основаны на комбинации методов предварительной обработки, многомерного анализа и машинного обучения. При этом ключевым фактором остаётся корректный выбор методов с учётом физической природы сигнала, типа анализируемого объекта и поставленной аналитической задачи.

Вывод

Анализ современных литературных данных показывает, что воспроизводимость ГКР-анализа определяется совокупностью трёх ключевых факторов: (1) морфологии и свойств ГКР-активной подложки, (2) условий адсорбции и пробоподготовки биологического аналита, и (3) методов математической обработки спектральных данных. При этом в литературе значительное внимание уделяется оптимизации наноструктурированных подложек и развитию алгоритмов машинного обучения для обработки спектров, тогда как вопросы пробоподготовки – в частности, управления адсорбцией и морфологией осадка биомолекул на поверхности подложки – освещены недостаточно полно. Также, немаловажным фактором для правильной интерпретации спектров является определение дальнодействия усиливающих эффектов подложки. Основным ограничением существующих методов является зависимость результата от типа аналита. Использование универсального аналита, а также разработка модели интерпретации экспериментальных результатов позволит преодолеть существующие ограничения.

Несмотря на значительный объём исследований, направленных на развитие ГКР-спектроскопии, задача обеспечения воспроизводимости ГКР-анализа остаётся актуальной и требует комплексного подхода. Её решение позволит существенно повысить надёжность и информативность анализа биомолекул и приблизить внедрение ГКР-анализа в практику клинической диагностики.

Таким образом, анализ литературы показывает, что перспективность ГКР для исследования биологических объектов определяется сочетанием высокой молекулярной специфичности, чувствительности и возможности работы с малыми количествами вещества. Вместе с тем, воспроизводимость и количественная информативность ГКР-анализа определяются совокупностью взаимосвязанных факторов: характеристиками ГКР-подложки, пространственной локализацией эффекта, условиями адсорбции и осаждения аналита, параметрами измерения и

алгоритмами обработки спектральных данных. Недостаточная разработанность комплексного подхода, учитывающего эти факторы одновременно, определяет необходимость разработки методических решений по управлению пробоподготовкой, оценке пространственной локализации ГКР-эффекта и математической обработке спектров биологических аналитов.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Получение и характеризация подложек

В работе использовались два типа подложек: тонкая серебряная пленка (Ag) на предметном стекле (G, Glass) - Ag#G - и на слюде (M, Mica) - Ag#M. Подробное описание методов получения и характеризация подложек представлены в [100]. ГКР-подложки Ag#G сформированы методом электронно-лучевого испарения на автоматизированных установках вакуумного испарения УРМ-3.279.072 (АО «Кварц», Россия) и STE EB71M (АО НТО «SemiTeq», Россия). Испаряемым материалом служило высокочистое серебро (>99.99%, АО «МЗСС», Россия) в виде гранул размером до 3 мм. Процесс испарения на установке УРМ-3.279.072 проводили при следующих параметрах: давление в камере 5×10^{-6} Торр ($6{,}7\times10^{-4}$ Па), напряжение на катоде 12 В, ток пучка 30 мА и напряжение ускоряющего источника 8 кВ. Испарение серебра в установке STE EB71M осуществлялось с помощью испарительной системы, которая представлена катодным блоком электронной пушки («Telemark», США) мощностью 8 кВт с ускоряющим напряжением 10 кВ. Давление в рабочей камере 2×10^{-8} Торр (3×10^{-6} Па).

Толщина осаждаемых пленок контролировалась с помощью кварцевого датчика («Inficon», Швейцария), что обеспечивает контроль толщины с точностью до ангстрем. Распыление серебра проводили на предметное стекло (ООО «МиниЛаб», Россия). Перед нанесением серебра предметные стекла последовательно обрабатывали ПАВ и этиловым спиртом, промывали деионизованной водой, сушили теплым воздухом и непосредственно перед процессом испарения подвергали обработке ионами Ar^+ в технологической камере в течение 1 минуты.

В главе 4 представлены исследования влияния лазерного излучения в процессе пробоподготовки аналитов, где в качестве ГКР-подложек использовали Ag#M. Данные подложки были также сформированы методом электронно-лучевого испарения, но на установке Angstrom Engineering (Кембридж, Онтарио, Канада) с

мощностью испарителя 10 кВт, с базовым давлением ниже 3×10^{-8} Торр. Перед нанесением серебра (АО «МЗСС», Москва, Россия; чистота: 99,99%) поверхность слюды промывали изопропиловым спиртом (Sigma-Aldrich, США). Скорость осаждения составляла 1 Å/с, а температура подложки - 300 К. Толщина пленок во время осаждения контролировалась с помощью кварцевого датчика оптического контроля. После нанесения толщина пленки была выборочно измерена с помощью стилусного профилометра. Толщина полученных пленок составила около 100 нм.

Морфология поверхности подложек исследовалась на атомно-силовом микроскопе Solver Pro (NT-MDT, Зеленоград, Россия). Исследовались изображения размером от 40×40 мкм^2 до 1×1 мкм^2. Измерения проводились в полуконтактном режиме. Данный режим наиболее оптимальный как для исследования поверхности металлических подложек, так и для осадков биологических объектов на таких подложках.

Анализ морфологии осуществлялся в соответствии с международным стандартом геометрических характеристик изделий ISO 21920-2:2021, регламентирующим параметры микрорельефа поверхности и методы их статистического описания, включая амплитудные, пространственные и статистические характеристики профиля шероховатости. Использование международного стандарта позволило описывать рельеф разных партий подложек в единой системе амплитудных и статистических характеристик.

Согласно ISO 21920-2:2021, для описания профиля поверхности используются следующие группы параметров [184]:

Амплитудные параметры, характеризующие вертикальный масштаб неровностей:

R_a – среднее арифметическое отклонение профиля;

R_q – среднеквадратическое отклонение профиля;

R_p – максимальная высота выступа профиля;

R_v – максимальная глубина впадины профиля;

R_{3z} – средняя высота от третьего самого высокого пика до третьей самой низкой впадины;

R_t – полная высота профиля.

Статистические параметры формы распределения высот профиля:

R_{sk} – (skewness) – коэффициент асимметрии распределения высот профиля, характеризующий преобладание выступов или впадин;

R_{ku} – (kurtosis, куртозис) – коэффициент эксцесса распределения высот, определяющий степень «остроты» профиля и наличие экстремумов;

λ_a – средняя длина корреляции профиля.

2.1.1. Подложки Ag#G

Подложки, используемые в работе, производились в виде партий по 12-24 штуки. Для проведения анализа морфологии из каждой партии случайно выбирались от 3 до 5 подложек.

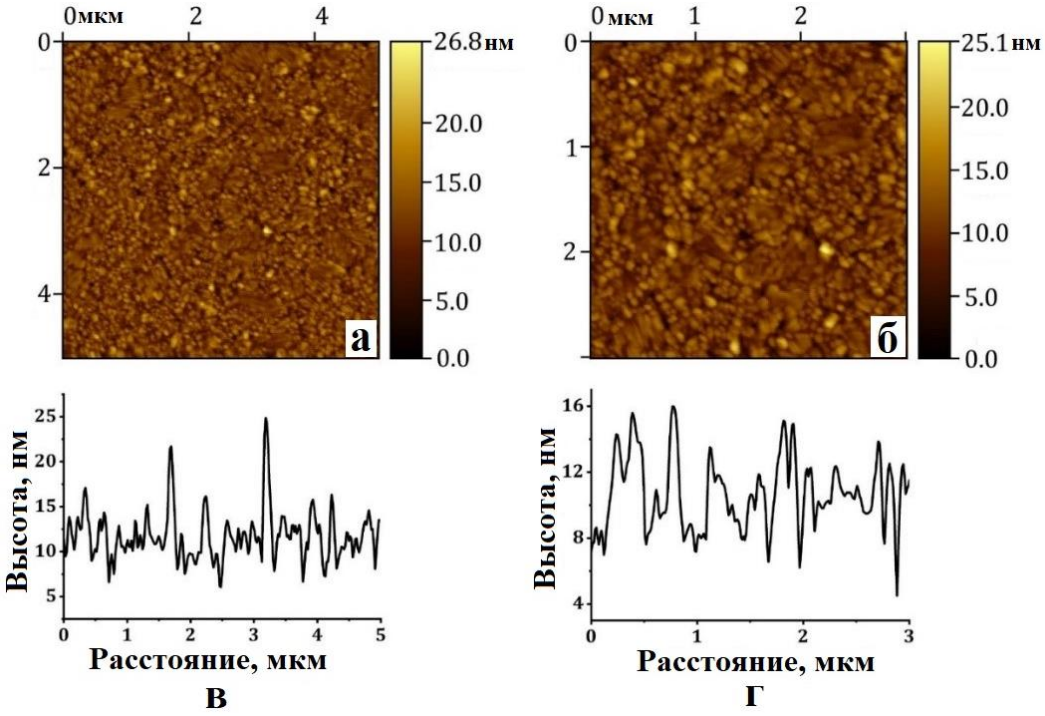

Рисунок 2.1 – АСМ изображения ГКР-подложек Ag#G: (а) 5х5мкм, (б) 3х3 мкм; (в, г) соответствующие профили сечения

Статистические параметры морфологии были рассчитаны на основе 15 поперечных сечений поверхности с помощью встроенного модуля в программе Gwyddion (CMI, Брно, Чехия), сведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Параметры морфологии ГКР-подложек Ag#G

R_a (нм)	R_q (нм)	R_p (нм)	R_v (нм)	R_{3z} (нм)	R_t (нм)	R_{sk}	R_{ku}	λ_a (нм)
1,7±0,1	2,2±0,1	6,5±1,4	6,2±1,9	10,3± 1,1	12,7±2,9	0.21±0.05	3,7 ± 0,5	183,8 ± 24,6

Особое внимание уделялось параметрам R_q и R_{ku}, поскольку они позволяют не только количественно оценить степень шероховатости поверхности, но и описать наличие редких экстремальных элементов рельефа, которые, с физической точки зрения, являются наиболее вероятными центрами локализации электромагнитного поля. Согласно ISO 21920-2:2021: R_{ku}=3 соответствует нормальному (гауссовому) распределению высот, R_{ku}>3 указывает на наличие редких, но выраженных пиков и впадин, R_{ku}<3 соответствует более «плоскому» и равномерному профилю [185]. Для рассматриваемых подложек Ag#G R_{ku} составляет больше 3. Параметр R_{3z} в 5 раз больше R_q, что указывает на редкие, но выраженные локальные экстремумы на фоне в целом гладкой поверхности. Положительное значение коэффициента асимметрии R_{sk}=0.21±0.05 свидетельствует о преобладании выступающих элементов рельефа над впадинами. Средняя длина корреляции профиля λ_a=183,8±24,6 нм характеризует латеральный масштаб неоднородностей поверхности и может быть интерпретирована как среднее расстояние между соседними морфологическими элементами. Данное значение указывает на формирование квазипериодической наноструктуры с характерным шагом порядка сотен нанометров. Совокупность параметров R_q, R_{3z}, R_{ku}, R_{sk} и λ_a указывает на умеренную шероховатость и наличие выраженных локальных пиков. Характерный латеральный масштаб неоднородностей составляет около 180 нм. Наблюдаемая морфология может способствовать локализации электромагнитного поля и, следовательно, реализации ГКР эффекта [140].

2.1.2. Подложки Ag#M

АСМ изображения ГКР-подложек Ag#M и соответствующие профили сечения представлены на Рисунке 2.2. Толщина серебряной пленки составляет 100 нм, структура характеризуется наличием регулярных конусообразных углублений, глубина которых на фоне общей шероховатости может достигать 25 нм.

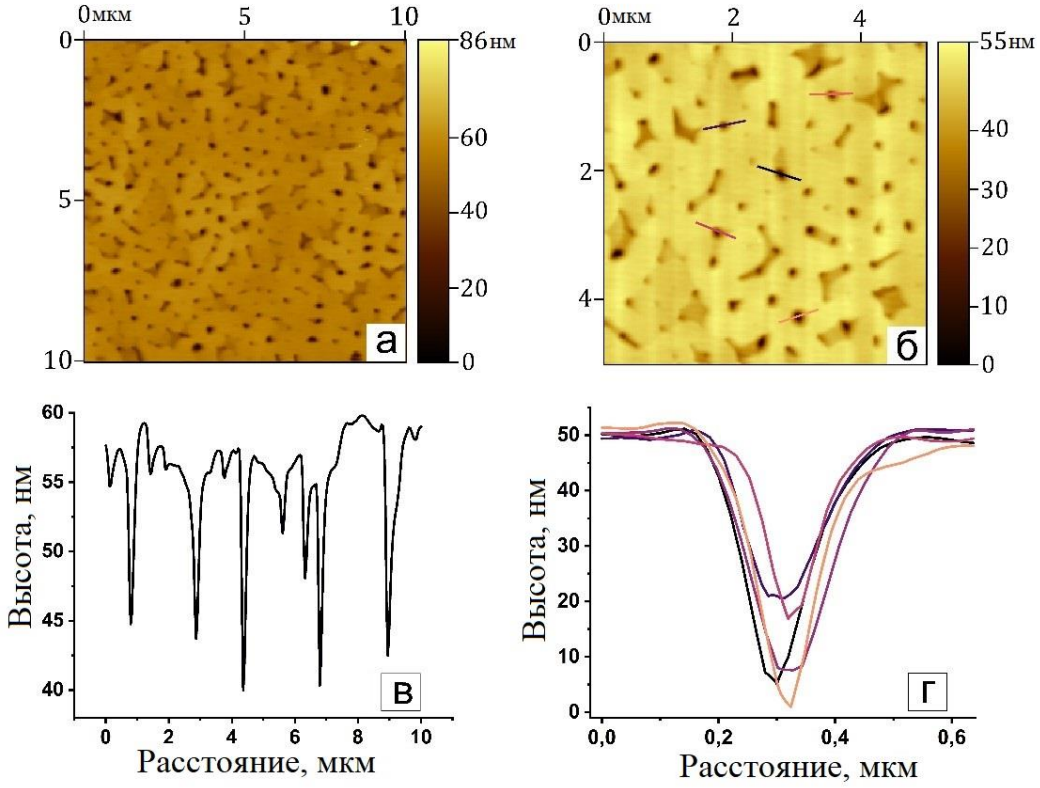

Рисунок 2.2 – АСМ изображения ГКР-подложек Ag#M: (а) 10x10 мкм; (б) 5x5 мкм; (в, г) соответствующие профили сечения

Анализ морфологии показывает, что эффективный размер неоднородностей поверхности наноструктуры составляет 127 нм, средняя площадь поверхности, занятой ими, составляет 12.5%. Основные параметры морфологии ГКР-подложек Ag#M, рассчитанные на основе данных АСМ, представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Параметры морфологии ГКР-подложек Ag#M

R_a (нм)	R_q (нм)	R_p (нм)	R_v (нм)	R_{3z} (нм)	R_t (нм)	R_{sk}	R_{ku}	λ_a (нм)
2,5±0,3	3,8±0,2	4,8±0,8	19,9±5,1	12,4±3,6	24,0±4,9	-2,0±0,7	6,2±1,0	792,1±90,4

Профиль поверхности лептокуртический с отрицательной асимметрией (R_{sk} = −2,0 ± 0,7) с преобладанием глубоких впадин (R_v = 19,9 ± 5,1 нм) над относительно низкими выступами (R_p = 4,8 ± 0,8 нм). При этом большая часть поверхности гладкая, что следует из малых значений среднего (R_a = 2,5 нм) и среднеквадратичного (R_q = 3,8 нм) отклонений, а также высокого эксцесса (R_{ku} = 6,2 ± 1,0), указывающего на островершинное распределение с редкими экстремальными отклонениями. Базовая глубина шероховатости R_{3z} = 12,4 ± 3,6 нм свидетельствует о наличии устойчивых локальных минимумов, способных играть роль «горячих точек» для локализации плазмонного поля. Средняя длина волны профиля λ_a = 792,1 ± 90,4 нм значительно превышает амплитуду неровностей и характерные размеры наноструктур.

В целом подложку можно описать как совокупность планарных участков с низкой шероховатостью, на стыках которых формируются углубления поверхности, которые можно аппроксимировать конической формой со средним углом при вершине 50º. Полученные углубления выступают потенциальными областями локализации электромагнитного поля.

2.2. Спектрометрическая система WiTec Alpha 300R

Для получения ГКР спектров в работе использовался комплекс WiTec Alpha 300R, который представляет собой исследовательскую систему конфокальной рамановской микроскопии (Рисунок 2.3). Система разработана компанией WITec GmbH (Германия) и предназначена для высокочувствительного, трехмерного картирования и спектроскопического анализа поверхности и объёма образцов. Для возбуждения колебаний в работе использовались волоконно-оптические лазеры с длинами волн 532 и 785 нм с возможностью регулировки мощности от единиц до сотни мВт. Система оснащена двумя спектрометрами (для разных длин волн лазеров), которые оснащены дифракционными решетками с разрешением 600 штрихов/мм, а также ПЗС-матрицами с термоэлектрическим охлаждением до -60ºС, что позволяет значительно снизить шумы при снятии спектров.

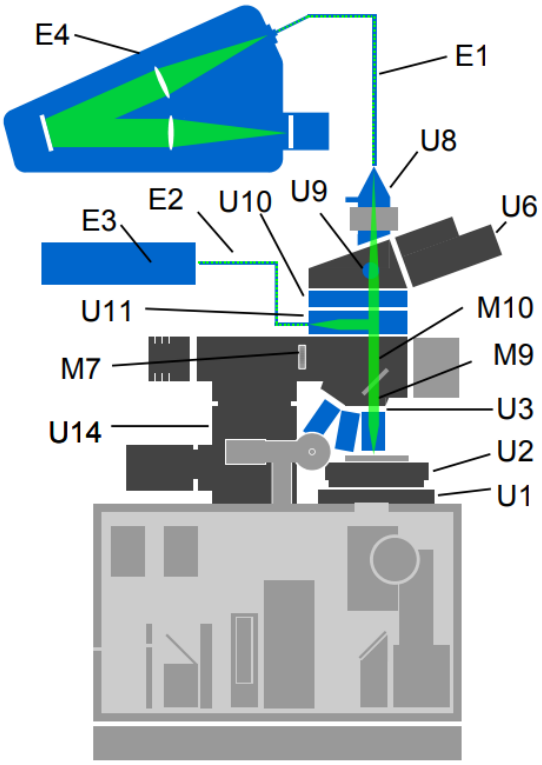

Рисунок 2.3 – Схема спектрометрической системы WiTec Alpha 300R

U1 - XY-позиционер; U2 - сканирующий столик; U3 - турель с объективами; U6 - бинокулярная трубка с окулярной камерой; U8 - оптический выход блока оптоволоконной связи; U9 - толкатель; U10 - ползунок фильтра; U11 - оптический вход блока лазерной связи; U14 - предметный столик микроскопа с шаговым двигателем вдоль оси Z; M9 - револьверная головка объектива; M10 - ползунок отражателя; E1 - многомодовое оптическое волокно; E2 - одномодовое оптическое волокно; E3 - лазер; E4 - спектрометр

Центральным элементом системы является конфокальный микроскоп (Рисунок 2.4). В отличие от классической широкопольной микроскопии, в конфокальной системе образец освещается не широким световым пучком, а лазерным пятном, который фокусируется с помощью пинхола (конфокальная диафрагма), расположенном в оптически сопряженной плоскости с детектором. Пинхол пропускает на детектор свет только из фокальной точки, эффективно отсекая при этом рассеянный свет из остальных областей. Построение изображения происходит

последовательно, точка за точкой, путем сканирования лазерным пятном по заданной площади образца.

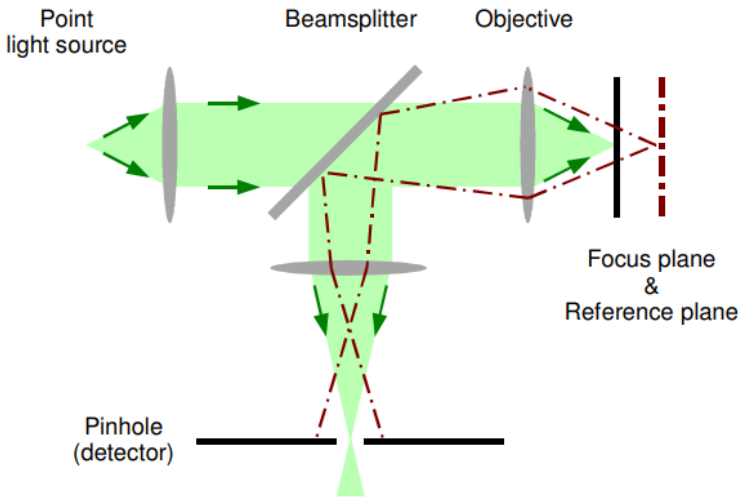

Рисунок 2.4 – Принципиальная схема оптического пути конфокального микроскопа

В системе WiTec Alpha 300R лазерный луч подается по одномодовому оптическому волокну. Этот тип волокна поддерживает только одну поперечную моду (LP01, гауссов луч), которая может быть сфокусирована в области, ограниченной дифракцией. Отраженный свет собирается с помощью того же объектива и фокусируется на многомодовом волокне, которое направляет луч на спектрометр, оснащенный ПЗС-камерой. Сердцевина многомодового оптического волокна действует как точечное отверстие для конфокальной микроскопии. Лазер фокусируется на образце, и изображение получается путем сканирования образца по оси X и Y. Сканирование выполняется пьезоэлектрическим сканирующим столом с емкостным управлением и точностью позиционирования 3 нм в поперечном направлении. Бинокуляр микроскопа имеет второй выходной порт, который оснащен регулируемым соединителем для многомодовых волокон. Сердцевина многомодового волокна выполняет функцию точечного отверстия для конфокального микроскопа. Волокно закреплено в плоскости изображения микроскопа и может регулироваться по горизонтали для достижения максимальной эффективности сбора.

2.2.1. Аппаратная функция конфокального микроскопа

В микроскопии пространственное разрешение оптической системы характеризуют с помощью трёхмерной функции рассеяния точки (3-D PSF, Point Spread Function). PSF описывает отклик оптической системы на точечный источник излучения и представляет собой её аппаратную функцию (Рисунок 2.5). В конфокальном микроскопе таким источником служит сфокусированное лазерное пятно в фокальной плоскости.

В поперечном направлении распределение интенсивности PSF соответствует диску Эйри. Сканирование фокального пятна в плоскости XOY позволяет регистрировать распределение стоксовой интенсивности (XY-скан) с поперечным разрешением, определяемым диаметром фокального пятна возбуждающего лазера. В аксиальной плоскости изображение точечного источника имеет характерную форму песочных часов с наименьшим сечением в фокусе объектива [186].

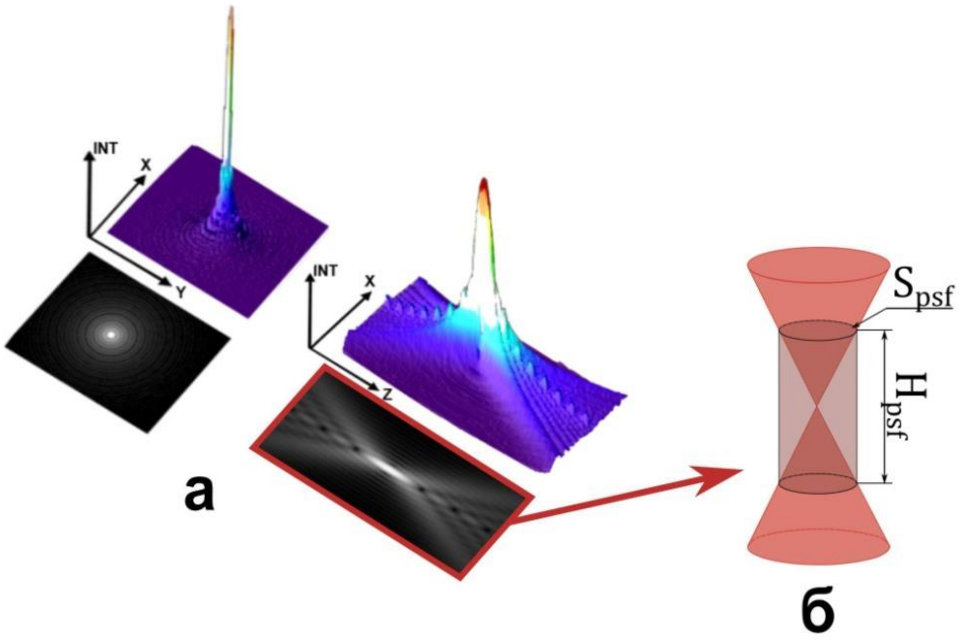

Рисунок 2.5 – (а) PSF конфокального микроскопа в латеральном и аксиальном направлениях; (б) схематичное представление измерительного цилиндра конфокального микроскопа

Конфокальная диафрагма осуществляет пространственную фильтрацию внефокусного света, в результате чего распределение интенсивности преобразуется в сплюснутый эллипсоид вращения с преобладающим размером вдоль оптической оси Z. Данный эллипсоид является измерительным объёмом конфокального микроскопа и допускает аппроксимацию цилиндром (далее — измерительный цилиндр) с площадью основания S_{HSF} и высотой H_{PSF} (Рисунок 2.5б). Диаметр цилиндра (2R) равен диаметру фокального пятна. Теоретический минимум PSF определяется длиной волны возбуждающего излучения, числовой апертурой объектива и оптическими характеристиками образца [187]:

$$H_{PSF} = \frac{1.4\lambda n}{NA^2} \quad (2.1)$$

где λ — длина волны, n — показатель преломления среды, NA — числовая апертура объектива. H_{PSF} является константой для фиксированной конфигурации оптической системы микроскопа.

Таким образом, конфокальный микроскоп обеспечивает не только поперечное разрешение в плоскости XOY, но и продольное разрешение вдоль оси Z. Перемещение фокального пятна вдоль оптической оси (Z-скан) позволяет получать распределение стоксовой интенсивности по глубине внутри толщи образца, обеспечивая послойное измерение объёмных образцов и реконструкцию их трёхмерных изображений.

2.3. Объекты исследования

В качестве модельного белка для исследований влияния лазерного и ультразвукового воздействия на образец в процессе пробоподготовки (Глава 4) был выбран миоглобин. Помимо того, что этот белок играет важную диагностическую роль – его уровень в крови часто рассматривают как биомаркер повреждения мышечной ткани, в том числе и сердечной [188–190] – он также относительно стабилен и достаточно хорошо изучен структурно – является первым белком, для которого была решена структура методом рентгеноструктурного анализа [191]. Анализ клинически значимых аналитов (Глава 5) представлен на примере ряда

олигосахаридов - маркеров грибковой и бактериальной инфекции. В условиях увеличения разнообразия патогенных микроорганизмов и одновременного роста резистентности бактерий к антибиотикам такой выбор биологических объектов является мотивированным.

2.3.1. Миоглобин человека

Миоглобин человека представляет собой глобулярный белок (молекулярная масса ~17 кДа), состоящий из 153 аминокислотных остатков и преимущественно сформированный α-спиральными участками [191,192]. Внутри белковой матрицы расположен гидрофобный карман, содержащий гем-группу с ионом Fe^{2+}, координированным порфириновым кольцом и проксимальным гистидином (Рисунок 2.6).

Рисунок 2.6 – Структура молекулы миоглобина. Данные взяты из RCSB Protein Data Bank [193]

Основу молекулы составляют гидрофобные аминокислоты - аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин и метионин, которые формируют плотное внутреннее ядро белка и обеспечивают стабильность его третичной структуры за счет гидрофобных взаимодействий [194]. Значительную роль в структуре и функциональной активности миоглобина играют полярные и заряженные

аминокислоты, такие как аспарагиновая и глутаминовая кислоты, лизин, аргинин и гистидин. Эти остатки в основном локализованы на поверхности белка, обеспечивая его высокую растворимость в водной среде и участие в электростатических взаимодействиях [195]. В аминокислотной последовательности миоглобина также присутствуют глицин и пролин, которые играют ключевую роль в формировании изгибов и петель между α-спиралями, обеспечивая локальную гибкость структуры [194].

С точки зрения КР и ГКР спектроскопии, аминокислотный состав миоглобина определяет наличие характерных амидных полос (Amide I, II и III), связанных с колебаниями пептидного остова, а также вклад боковых цепей ароматических и гетероциклических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана и гистидина) в формирование ГКР-спектра [196,197]. Это делает миоглобин удобным модельным объектом для изучения связи между структурой белка, его аминокислотным составом и спектральным откликом при адсорбции на металлических наноструктурированных подложках [198].

2.3.2. Олигосахариды

Объектами исследования являются синтетические олигосахариды, структурно родственные бактериальным и грибковым гликанам [199]. Олигосахариды 1–3 (Рисунок 2.7) соответствуют фрагментам грибкового α-(1→2)-маннана, β-(1→3)-глюкана и β-(1→6)-глюкана, которые являются компонентами клеточной стенки патогенных грибов рода *Candida*. Эти гликаны состоят из моносахаридных остатков только одного типа: α-маннопиранозы в 1-м, β-глюкопиранозы во 2-м и 3-м. Олигосахариды 4–6 представляют собой гетеросахариды, состоящие из двух типов моносахаридных остатков, один из которых — β-D-галактофураноза (Galf). Galf обладает высокой антигенностью для человека и обнаруживается в крови пациентов с рядом грибковых и бактериальных инфекций. Рассматриваемые в данной работе олигосахариды 4–6 являются фрагментами дигетерогликана *Enterococcus faecalis*,

галактозана I *Klebsiella pneumoniae* и галактоманнана *Aspergillus spp.* соответственно. Синтез всех рассматриваемых олигосахаридов представлен в работах [199–204].

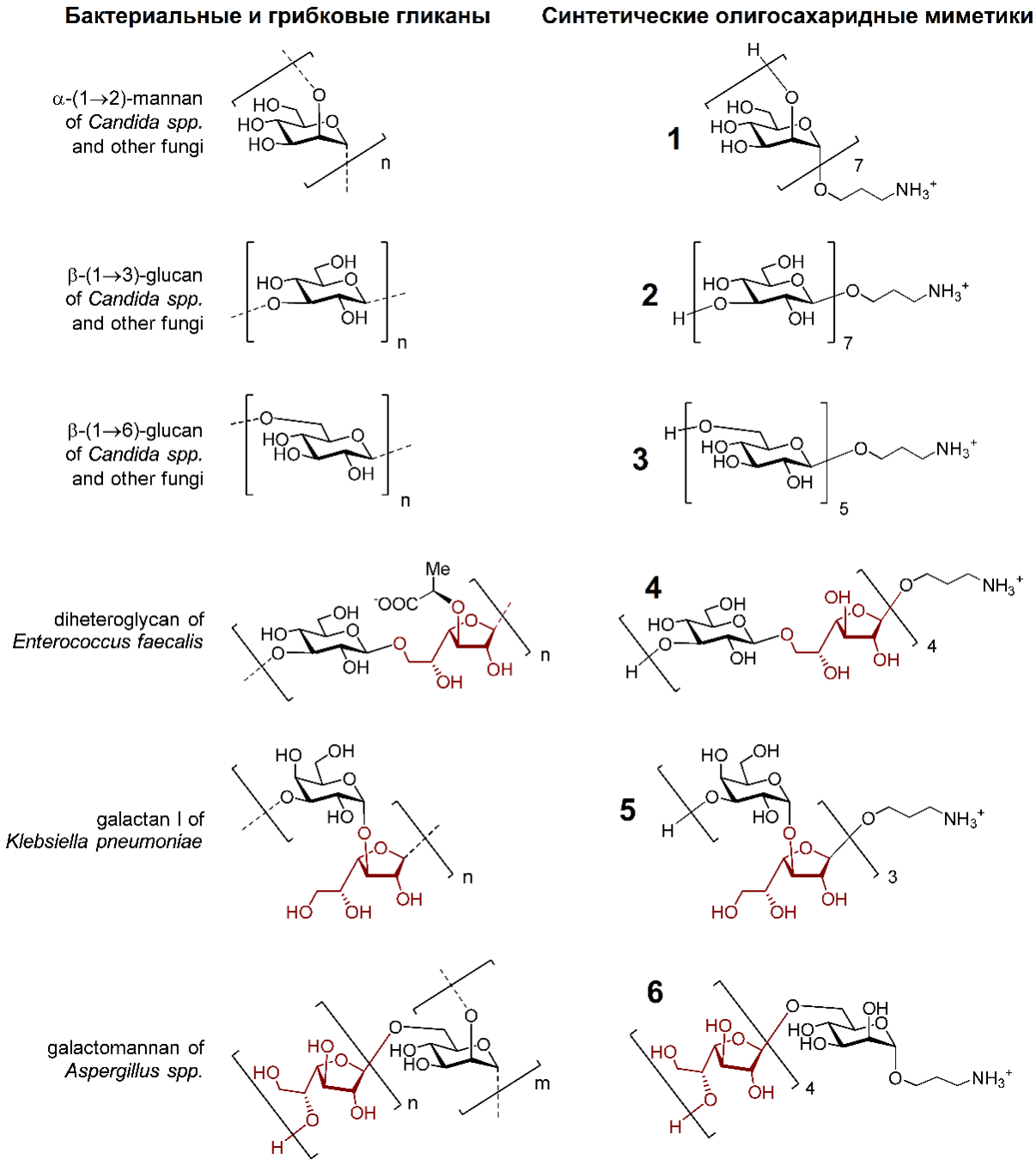

Рисунок 2.7 – Природные бактериальные и грибковые гликаны (слева) и синтетические олигосахаридные миметики (справа)

2.4. Особенности измерения профилей Z-скана

Метод Z-скана заключался в последовательном перемещении измерительного объема конфокального микроскопа вдоль оптической оси Z относительно поверхности исследуемого образца с регистрацией спектра комбинационного или гигантского комбинационного рассеяния в каждой координате. В результате формировалась зависимость интенсивности выбранной спектральной полосы от положения измерительного объема, отражающая пространственное распределение регистрируемого сигнала вдоль оси Z.

Перед началом измерений выполняли фокусировку объектива по поверхности образца с использованием изображения лазерного пятна. Полученное положение принимали за начало координат (Z = 0), после чего объектив перемещали в положительном направлении оси Z и проводили пошаговое сканирование с регистрацией спектра в каждой точке.

В качестве источника возбуждения использовали полупроводниковый лазер с длиной волны 785 нм и мощностью излучения на образце 54 мВт. Фокусировку осуществляли объективом Epiplan Neofluar 100×/0,9 (Carl Zeiss, Germany). Рассеянное излучение отделяли от возбуждающего нотч-фильтром и направляли в многомодовое оптическое волокно диаметром 50 мкм, выполняющее функцию конфокальной щели. Управление спектрометрическим комплексом осуществляли с помощью программного обеспечения WITec Control.

Выбор длины волны возбуждения 785 нм обусловлен особенностями регистрации спектра азота. При использовании лазера с длиной волны 532 нм сигнал азота регистрируется практически при любом положении объектива относительно поверхности подложки, что затрудняет определение области локализации ГКР-эффекта. В конфигурации 785 нм / 100×/0,9 сигнал азота наблюдается только в непосредственной близости от поверхности ГКР-подложки, что позволяет корректно анализировать его пространственное распределение.

2.4.1. Z-скан монокристалла кремния

Для определения аппаратной функции конфокального микроскопа использовали пластину монокристаллического кремния Si(111). За начало координат принимали положение фокуса на поверхности образца. Затем объектив перемещали на +82,5 мкм относительно поверхности и выполняли сканирование до −82,5 мкм с шагом 1,5 мкм, регистрируя КР-спектр в каждой точке.

Время накопления спектров кремния и воздуха составляло 0,3 с, спектральный диапазон регистрации – −5 –1778 $см^{-1}$. До начала и после завершения серии измерений регистрировали контрольные спектры воздуха и кремния для проверки стабильности спектрометрической системы.

2.4.2. Z-скан азота на ГКР-подложке

Для оценки пространственной локализации ГКР-эффекта использовали наноструктурированные серебряные подложки и газообразный азот воздуха в качестве аналита. После фокусировки на поверхности подложки (Z = 0) выполняли сканирование в двух диапазонах: от 0 до +1 мкм с шагом 20 нм и от +1 до +5 мкм с шагом 50 нм. Уменьшенный шаг вблизи поверхности обеспечивал высокое пространственное разрешение в области локализации ГКР-сигнала.

Время накопления спектров азота составляло 120 с, спектральный диапазон регистрации — 1374–2820 $см^{-1}$. Интенсивность сигнала определяли интегрированием полосы Q-ветви азота в области ≈ 2330 $см^{-1}$.

Контрольные измерения включали регистрацию спектра кремния (экспозиция 0,3 с), спектра азота над поверхностью кремния (экспозиция 30 с), а также спектров атмосферного азота при удалении объектива от поверхности подложки (экспозиции 30 и 120 с).

2.4.3. Программная обработка данных

Спектры, записанные в бинарном формате, конвертировали в формат ASCII и импортировали в пакет Origin 6.5, где выполняли удаление артефактов, обусловленных космическими лучами, группировку спектров и формирование матриц данных. Для анализа пространственного распределения сигнала спектры азота были разделены на шесть диапазонов расстояний до поверхности подложки: 0–500, 500–1000, 1000–2000, 2000–3000, 3000–4000 и 4000–5000 нм.

Дальнейшую обработку и моделирование Z-сканов проводили в среде Mathcad 5.0, а трехмерную визуализацию распределения интенсивности выполняли в программе ImageJ (версия IJ1.46r).

2.5. Параметры пробоподготовки и измерения образцов

2.5.1. Пробоподготовка с использованием лазерного воздействия

Для исследования воздействия лазерного излучения на подложку Ag#M капельным способом с помощью микродозатора был нанесен свежеприготовленный водный раствор лиофилизированного порошка миоглобина (Sigma-Aldrich, USA) в концентрации 1 мкг/мл и 10 нг/мл в деионизированной воде 18 МОм (Milli-Q, Merk, Германия). Объем капель составлял 3 мкл. Всего было нанесено 20 капель: по 5 для каждой концентрации высушенных на воздухе (25^{o}C) и под воздействием лазера. С каждой капли было измерено не менее 15 спектров.

Спектры миоглобина, полученные для образцов, высушенных на воздухе, использовали в качестве контроля. Для высушивания с использованием лазерного воздействия использовался расфокусированный p-поляризованный лазерный луч с длиной волны 785 нм и мощностью 100 мВт, который встроен в используемую спектрометрическую систему. После полного высушивания спектр измеряли в образовавшемся осадке миоглобина при следующих параметрах: объектив Epiplan Neofloural 50X/0.8, длина волны возбуждения – 785 нм, мощность лазера – 54 мВт,

режим съемки Single Spectrum, время накопления одного спектра составило 60 сек при высушивании на воздухе и 10 сек в случае с лазерной пробоподготовкой из-за высокой интенсивности спектров. Полученные спектры были пересчитаны исходя из времени накопления.

2.5.2. Пробоподготовка с использованием ультразвукового воздействия

Для изменения морфологии подложек Ag#G на наномасштабе использовали предварительную отмывку предметных стекол двумя методами:

Метод I.

1. Кипячение в изопропиловом спирте (10 мин., 82,4°C);

2. Очистка в ультразвуковой ванне (40 кГц, 35 Вт) с ацетоном в течение 5 мин.;

3. Очистка парами изопропилового спирта (82,4 °C, 15 мин.). Вертикально ориентированные стекла помещали над поверхностью изопропилового спирта в герметически закрытый сосуд, нагретый на водяной бане до температуры кипения спирта.

Метод II.

1. Очистка в ультразвуковой ванне (40 кГц) с дистиллированной водой в течение 5 мин. при мощности 10 Вт и после 5 мин. при мощности 35 Вт;

2. Кипячение в ацетоне (56,1 °C, 5 мин.);

3. Очистка в ультразвуковой ванне (40 кГц, 35 Вт) с дистиллированной водой в течение 5 мин.;

4. Кипячение в изопропиловом спирте (82,4 °C, 5 мин.);

5. Обработка в ультразвуковой ванне (40 кГц, 10 Вт) с дистиллированной водой в течение 5 мин.

После каждой стадии очистки предметные стекла промывали растворителем того же типа, который использовался в предыдущем процессе. Затем электронно-лучевым испарением наносили серебряную пленку. Морфология полученных поверхностей представлена в разделе 4.2 Главы 4.

В качестве аналита использовали раствор миоглобина (Sigma-Aldrich, USA) в концентрации 1 мкг/мл, приготовленный в деионизованной воде 18 МОм (Milli-Q, Merk, Германия). Нанесенные на ГКР-подложку капли аналита объемом 3 мкл высушивали с использованием ультразвукового воздействия на систему капля-подложка. Использовали низкочастотное (47 кГц) и высокочастотное (580 кГц) ультразвуковое воздействие. Выбранные частоты являются резонансными для системы пьезоэлемент-подложка. Для исключения перегрева ГКР-подложки выше 27°С использовали воздушное охлаждение. Схема эксперимента представлена на Рисунке 2.8. Ультразвуковой генератор подключен непосредственно к пьезоэлементу для подачи сигнала, для контроля которого использовали осциллограф, также подключенный непосредственно к пьезоэлементу.

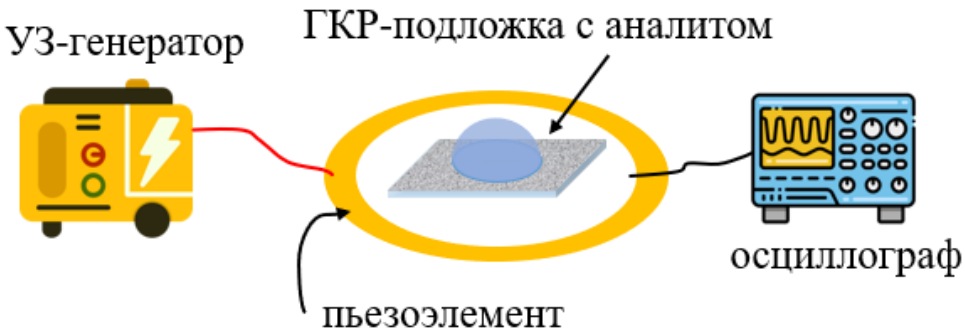

Рисунок 2.8 – Схема эксперимента по проведению пробоподготовки образцов миоглобина с помощью ультразвука

ГКР-спектры измеряли в сформировавшемся после высыхания капель осадке. Измерения проводили с использованием двух длин лазерного излучения - 532 и 785 нм с соответствующей мощностью 2,5 и 54 мВт. Режим съемки - Single Spectrum, время накопления одного спектра 10 сек.

2.5.3. Олигосахариды

Растворы олигосахаридов готовили в деионизированной воде (Milli-Q, Merck group, Дармштадт, Германия) в концентрации 100 пг/мл. Аликвоты объемом 3 мкл наносили на ГКР-подложки Ag#G без предварительной обработки. Капли

высушивали на воздухе (25°C) при нормальных условиях. ГКР-спектры олигосахаридов регистрировали в области сухого осадка. Параметры измерения были следующими: длина волны возбуждающего лазера – 532 нм, мощность лазера – 1,5 мВт, время накопления одного спектра – 0,1 секунды, количество спектральных усреднений – 20. Для каждого образца было получено 50 спектров.

2.6. Математическая обработка данных

Обработку ГКР-спектров миоглобина, приведенных в главе 4, проводили с использованием программного обеспечения OPUS 7.0 (Bruker). Для всех спектров выполняли вычитание базовой линии с применением встроенного алгоритма rubber band correction (в том числе в варианте concave rubberband). Перед анализом спектры обрезали в диапазоне 300–1700 $см^{-1}$ и нормировали по времени накопления, если это требовалось.

2.6.1. Алгоритм обработки и классификации спектров групп олигосахаридов

Предварительную обработку ГКР-спектров олигосахаридов, представленных в главе 5, проводили в несколько этапов:

1. Удаление выбросов методом изолирующего леса (Isolation Forest). Данный метод строит случайные деревья и использует метрики расстояния для обнаружения аномальных значений, что позволяет изолировать выбросы, оценивая, насколько легко можно отличить определенные точки данных от основного набора данных. Для исследуемого набора данных параметр загрязнения был установлен на уровне 0,1, то есть 10% точек данных были признаны выбросами и, соответственно, удалены.
2. Фильтрация спектров с использованием фильтра Савицкого–Голея. Ключевыми параметрами были размер окна 9 (где каждая точка данных усреднялась с соседними точками в пределах 9-точечного окна) и полиномиальный порядок 3, определяющий степень полинома, используемого для сглаживания.

3. Коррекция базовой линии с помощью асимметричной сглаживающей фильтрации методом наименьших квадратов (Asymmetric Least Squares Smoothing, ALS). Этот метод корректирует базовую линию, устраняя систематические колебания интенсивности, не связанные с анализируемыми сигналами. Параметры включают λ, которая определяет степень подавления базовой линии, и p, регулирующий асимметрию для оптимизации сглаживания.
4. Нормализация спектров методом стандартной нормальной вариации (Standard Normal Variation, SNV), который включает в себя расчет среднего значения и стандартного отклонения для каждого спектра, что позволило уменьшить систематические отклонения и повысить однородность данных.

Визуализация. Для уменьшения размерности спектральных данных и учета основных направлений дисперсии в наборе данных использовался метод анализа главных компонент (Principal Component Analysis, PCA). Исходные спектры были организованы в виде матрицы, строки которой соответствовали отдельным измерениям, а столбцы отражали значения интенсивности при различных комбинационных сдвигах.

Оценка перекрытия распределений интенсивностей спектров. Для сравнения спектров разных аналитов и установления статистической значимости наблюдаемых различий использовался бутстрэп-метод (bootstrap). Это непараметрический метод, который оценивает распределение статистического показателя, такого, как среднее значение, путем повторной выборки исходных данных с заменой. Процедура бутстрапирования представлена в работе [205].

Для *классификации* спектров и выбора наиболее информативных спектральных характеристик использовалась модель логистической регрессии (Logistic Regression, LR) с L1 регуляризацией.

Модель LR представлена следующим уравнением:

$$P(y = 1|x) = \frac{1}{1 + e^{-(w^T x + b)}}$$

здесь: x — вектор признаков выборки; w — вектор весовых коэффициентов; b — свободный член.

Функция потерь с L1 регуляризацией выражается следующим образом:

$$L(w,b) = -\sum_{i=1}^{n}[y_i \ln P(y_i|x_i) + (1-y_i)\ln(1-P(y_i|x_i))] + \lambda\sum_{j=1}^{p}|w_j|$$

где: y_i — метка класса для i-го образца ($y_i \in \{0, 1\}$); λ — коэффициент регуляризации; p — количество признаков.

Оптимальное значение гиперпараметра $C = 1/\lambda$ было выбрано методом сеточного поиска (Grid Search) в диапазоне от 10^{-6} до 10^{6}.

Оценка модели проводилась с помощью метрик классификации:

- Точность (Accuracy): общая доля правильных прогнозов, дающая общее представление о производительности модели. Представляет собой долю правильно классифицированных экземпляров от общего числа экземпляров. $A = \frac{\text{ип+ио}}{\text{ип+ио+лп+ло}}$, где: ИП – истинно положительный результат, ИО – истинно отрицательный результат, ЛП – ложноположительный результат, ЛО – ложноотрицательный результат.
- Специфичность (Precision): отношение истинных срабатываний к сумме истинных и ложных срабатываний, указывающее на точность модели при определении целевого класса. Определяет, сколько элементов, идентифицированных как положительные, являются действительно положительными. $P = \frac{\text{ип}}{\text{ип+лп}}$
- Чувствительность (Recall): доля истинных срабатываний от всех реальных срабатываний, измеряющая способность модели фиксировать соответствующие экземпляры целевого класса. Указывает, сколько истинных срабатываний удается обнаружить модели. $R = \frac{\text{ип}}{\text{ип+ло}}$

- F1-Мера (F1-Score): Гармонический показатель точности и запоминания, предлагающий сбалансированный показатель для оценки производительности модели, особенно полезный при неравномерном распределении по классам. $F1 = \frac{2(P \times R)}{P+R}$

Глава 3. Определение высоты локализации ГКР-эффекта над поверхностью подложки

Эффективное расстояние над поверхностью подложки, на которое распространяется ГКР-эффект, согласно существующим экспериментальным работам, составляет от единиц до нескольких десятков нм. Наблюдаемая разница может быть обусловлена отличиями в экспериментальных техниках. В частности, сам спейсер-слой, который активно используют в подобных работах, вносит искажения в оптическую систему, что отражается на результате всего измерения. Чтобы избежать таких искажений, предлагается использовать в качестве анализируемого вещества химически нейтральный газообразный азот воздуха. Это позволит исключить также и потенциальное химическое взаимодействие аналита с поверхностью подложки и сосредоточиться на определении величины только электромагнитного усиления. Для корректной интерпретации полученных результатов была разработана универсальная модель, описывающая ослабление ГКР-сигнала при удалении измерительного объема конфокального микроскопа от поверхности подложки. Результаты данного раздела опубликованы в работе [206].

3.1. Моделирование и интерпретация Z-скана

3.1.1. Базовая модель: свёртка прямоугольных профилей

При Z-сканировании регистрируемая интенсивность сигнала определяется пространственным перекрытием области, содержащей рассеивающие молекулы, и измерительного объёма конфокального микроскопа. В общем случае измеряемый профиль может быть представлен как свёртка пространственного распределения образца с продольной компонентой функции рассеяния точки:

$$I(z) = const \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} Sample(z-\xi) \cdot PSF(\xi) d\xi \qquad (3.1)$$

где Sample(z) – истинное изображение образца (спектр); PSF(z) – профиль функции точечного рассеяния вдоль оси *Z*.

В рамках цилиндрической аппроксимации измерительного объёма (площадь основания S_{PSF}, высота H_{PSF}) и пренебрегая поперечными размерами образца по сравнению с S_{PSF}, задача сводится к свёртке двух прямоугольных функций. Результатом является равнобедренная трапеция с высотой $\min(L, H_{PSF})$ и полусуммой оснований $\max(L, H_{PSF})$, где L — толщина слоя аналита (Рисунок 3.1).

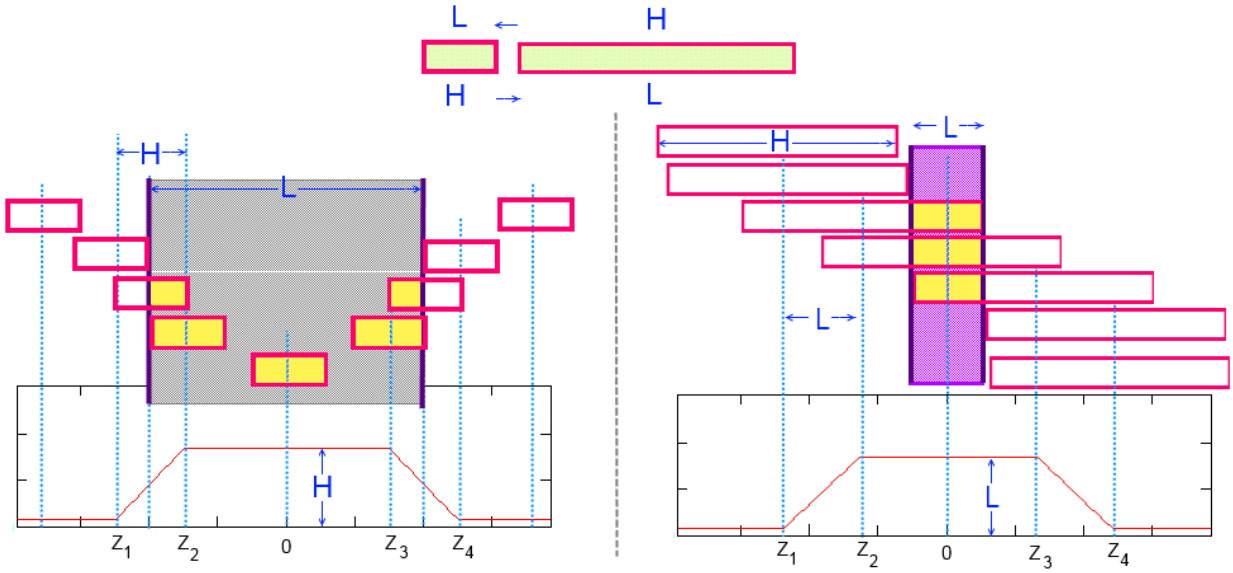

Рисунок 3.1 – Свёртки прямоугольных профилей аппаратной функции (ширина *H*) и образца (ширина *L*) для двух случаев: (i) H<<L (слева) и (ii) H>>L (справа)

Профиль с наименьшей шириной может рассматриваться как аппаратная функция вне зависимости от того, описывает он профиль образца или измерительный цилиндр. Как видно из Рисунка 3.1, наибольшее перекрытие профилей аппаратной функции и образца (максимальная мощность излучения КР) при Z-сканировании достигается в случае, когда один из профилей находится полностью внутри другого. Координаты характерных точек для свертки двух прямоугольных профилей указаны в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Координаты характерных точек для свертки двух прямоугольных профилей

	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	Z_2-Z_1 Z_4-Z_3
H<<L	$-\frac{L+H}{2}$	$-\frac{L-H}{2}$	$\frac{L-H}{2}$	$\frac{L+H}{2}$	H
H>>L	$-\frac{H+L}{2}$	$-\frac{H-L}{2}$	$\frac{H-L}{2}$	$\frac{H+L}{2}$	L

Из анализа формы профиля следуют два частных случая, имеющих методическое значение:

- При $H_{PSF} \ll L$ (толстый образец) удвоенная полуширина на полувысоте (HWHM) убывающего участка профиля определяет высоту измерительного цилиндра, т.е. реальное продольное разрешение микроскопа:

$$H_{psf} = 2 \cdot HWHM_{Z-Scan} \tag{3.2}$$

- При $H_{PSF} \gg L$ (тонкий образец) аналогичная величина даёт толщину слоя аналита:

$$L_{Sample} = 2 \cdot HWHM_{Z-Scan} \tag{3.3}$$

3.1.2. Учёт внефокусного рассеяния

Однако в реальной оптической системе при выходе измерительного цилиндра за пределы образца сигнал не обрывается резко, а спадает постепенно. Это обусловлено расфокусированным излучением возбуждения, распространяющимся за пределы PSF и частично проникающим через конфокальную диафрагму на детектор. Для количественного учёта данного эффекта принята следующая модель.

Предполагается, что слой аналита в объёме измерительного цилиндра даёт сигнал, полностью регистрируемый детектором. Слои, прилегающие к основаниям цилиндра, вносят вклад пропорционально доле рассеянного излучения, попадающей

в апертуру. При этом полная мощность, испускаемая слоем в конусе лазерного пучка, не изменяется при перемещении объектива относительно образца. Доля регистрируемого излучения от тонкого слоя аналита оценивается как отношение мощности, испускаемой из области проекции фокального пятна на данный слой, к мощности, испускаемой из области фокального пятна внутри измерительного цилиндра. Распределение интенсивности в пучке аппроксимируется гауссовым (Рисунок 3.2а):

$$I(\rho) = I_0 \exp\left(\frac{-2\rho^2}{w^2}\right) = \frac{2P}{\pi w^2} \exp\left(\frac{-2\rho^2}{w^2}\right) \quad (3.4)$$

где параметр w(z) изменяется при удалении от фокальной плоскости по закону дивергенции гауссова пучка:

$$w(z) = w_0\sqrt{1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi {w_0}^2}\right)^2} = w_0\sqrt{1 + \left(\frac{ztg\theta}{w_0}\right)^2} \quad (3.5)$$

где z - осевое расстояние от фокуса луча (или "перетяжка"), w_0 – радиус перетяжки, θ – угол расходимости гауссова луча за пределы фокальной точки.

Поскольку распределение интенсивности в пучке близко к гауссову, данное отношение определяется сложнее, чем простое отношение площадей проекций.

Понятие радиуса светового пятна R для гауссова пучка требует уточнения. Традиционно R определяют по падению интенсивности в e^2 раз относительно центра (R=w), однако это не всегда корректно для энергетических оценок. Интегрирование гауссова профиля по кругу радиуса R даёт:

$$\int_0^R e^{-2\left(\frac{r}{w}\right)^2} r dr \int_0^{2\pi} d\varphi = \frac{\pi w^2}{2}\left(1 - e^{-2\left(\frac{R}{w}\right)^2}\right) \quad (3.6)$$

Результат интегрирования приведен на Рисунке 3.2б

Полный интеграл по всей площади пятна (r от 0 до ∞) равен $\pi w^2/2$. При равномерном распределении энергии по площади радиус пятна составил бы $w/\sqrt{2}$. Однако для гауссова профиля пятно радиуса w содержит лишь 86%, т.е. примерно 6/7; остальная 1/7 часть энергии сосредоточена в кольце с радиусами $R_1 = w$ и $R_2 \sim 2w$ (см.

Рисунок 3.2б). При $R = 2w$ практически вся энергия (99.96%) сосредоточена в пятне этого размера. Доля мощности света, приходящаяся на круглую апертуру радиуса R:

$$\delta P(R) = 1 - e^{-2\left(\frac{R}{w}\right)^2} \tag{3.7}$$

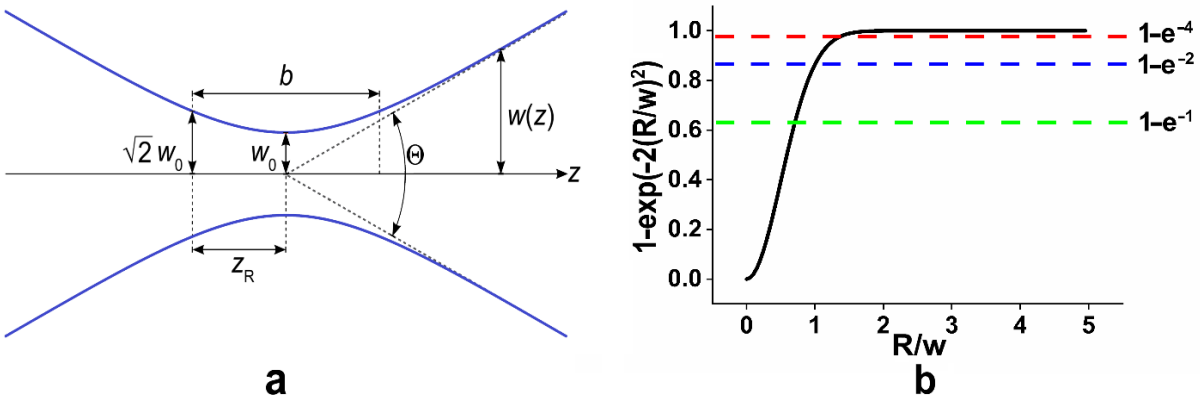

Рисунок 3.2 - (а) Параметры Гауссового пучка; (б) Доля мощности гауссового пучка, содержащаяся в пятне, ограниченном апертурами с различными радиусами

Указанное полностью применимо к размеру фокального пятна сфокусированного гауссова пучка. Если длину каустики гауссова пучка (то есть высоту измерительного цилиндра) принять равной конфокальному параметру $b=2Z_R$ (Z_R – длина зоны Рэлея), то $R_{ZR}=2^{1/2}w_0$, и пятно данного радиуса содержит ~98% общей мощности. Отношение $\rho=R/w_0$ принимается в качестве подгоночного параметра, значение которого может варьироваться для настройки модели.

Угол сходимости пучка после объектива (2θ) определяется числовой апертурой; для воздушного объектива:

$$tg(\theta_0) = \frac{NA}{\sqrt{1-NA^2}} \tag{3.8}$$

Отсюда:

$$tg(\theta_0) = \frac{2R_0}{H_0} = \rho\frac{2w_{00}}{H_0} \tag{3.9}$$

где w_{00} – параметр гауссова пучка в воздухе):

Следовательно, высота измерительного цилиндра в воздухе:

$$H_0 = \frac{2R_0}{tg(\theta_0)} = \rho\frac{2w_{00}}{NA}\cdot\sqrt{1-NA^2} \tag{3.10}$$

Аналогично H_{PSF} в аналите оценивается через диаметр фокального пятна (2R) и числовую апертуру объектива:

$$H_{psf} = \frac{2\mathrm{R}}{NA} \cdot \sqrt{n^2 - NA^2}\,, H_{psf} = \frac{2w_0}{NA} \cdot \rho \cdot \sqrt{n^2 - NA^2} \tag{3.11}$$

Для сравнения мощности, поступающей из различных слоёв аналита, доля излучения от слоя записывается как отношение мощности из проекции фокального пятна на данный слой к полной мощности в тонком слое внутри измерительного цилиндра:

$$\delta E = \frac{\int_0^{2\pi}\int_0^R I_0(z) e^{-\frac{r^2}{w(z)^2}} d\varphi r dr}{\int_0^{2\pi}\int_0^R I_0(z=0) e^{-\frac{r^2}{{w_0}^2}} d\varphi r dr} = \frac{{w_0}^2}{w(z)^2} \cdot \frac{\int_0^R e^{-\frac{r^2}{w(z)^2}} r dr}{\int_0^R e^{-\frac{r^2}{{w_0}^2}} r dr} = \frac{{w_0}^2}{w(z)^2} \frac{w(z)^2}{{w_0}^2} \frac{1 - e^{-\frac{R^2}{w(z)^2}}}{1 - e^{-\frac{R^2}{{w_0}^2}}} = \frac{1 - e^{-\frac{R^2}{w(z)^2}}}{1 - e^{-\frac{R^2}{{w_0}^2}}} \tag{3.12}$$

где R - радиус фокального пятна (может совпадать с w_0, а может и отличаться в общем случае), w_0 - гауссов параметр сфокусированного пучка, а для w(z) определяется формулой 3.5.

Таким образом, только если показатель экспоненты в (3.12) мал и её можно разложить в ряд ($e^{-x} = 1 - x + \cdots$), тогда доля излучения, идущая из слоя, может быть выражена как отношение площадей:

$$\delta E = \frac{1 - e^{-\frac{R^2}{w(z)^2}}}{1 - e^{-\frac{R^2}{{w_0}^2}}} \approx \frac{\frac{R^2}{w(z)^2}}{\frac{R^2}{{w_0}^2}} = \frac{{w_0}^2}{w(z)^2} = \frac{1}{1 + \left(\frac{z tg\theta}{w_0}\right)^2} \tag{3.13}$$

Данный случай соответствует либо равномерно освещённому пятну, либо отдаленным слоям, где радиус пучка становится настолько большим, что освещённость в окрестности центра пятна может считаться постоянной.

Учитывая все вышеизложенные нюансы, при Z-сканировании в зависимость регистрируемого сигнала от Z дают вклады интегралы вида:

$$\int_A^B \frac{w_0^2}{[(w_0 + r) + C \cdot x]^2} \cdot dx = \frac{B - A}{\left(1 + \frac{r}{w_0} + \frac{C}{w_0} B\right) \cdot \left(1 + \frac{r}{w_0} + \frac{C}{w_0} A\right)} \tag{3.14}$$

Пределы интегрирования (A, B) зависят от толщины слоя аналита и расположения измерительного цилиндра относительно него. Параметры r и C определяются так:

$$r = \begin{cases} 0 & , \mathrm{Z} < \mathrm{H}_0 \\ (Z - H_0) \cdot tg\alpha_0, & \mathrm{Z} > \mathrm{H}_0 \end{cases} \qquad C = tg\alpha = \frac{2R}{H} \tag{3.15}$$

Случай $Z>H_0$ соответствует перемещению измерительного цилиндра вверх от поверхности образца (H_0 - высота измерительного цилиндра в воздухе).

3.1.3. Модель толстого слоя (L>H)

Максимальный сигнал из измерительного цилиндра определяется его высотой:

$$E_0 = P_0 \cdot H \cdot \frac{n}{c} \tag{3.16}$$

где P_0 – мощность возбуждающего излучения, c – скорость света в вакууме, n – показатель преломления аналита.

Толщина образца не входит в модель как варьируемый параметр, поскольку вклад слоёв, удалённых более чем на H от основания цилиндра, не превышает 10%. Профиль сигнала описывается кусочной функцией, учитывающей три характерных положения цилиндра относительно поверхности образца, как показано на Рисунке 3.3а: погружение в слой образца, касание нижней границей цилиндра поверхности образца, удаление от поверхности образца.

$$E(Z) = E_0 \cdot \begin{cases} \left(1 + \frac{L/H}{1+2\cdot(L/H)}\right) + \frac{|Z|/H}{1+2\cdot(|Z|/H)}, & -Z_0 \le Z \le 0;\ |Z_0| \ll L \\ \left(1 + \frac{L/H}{1+2\cdot(L/H)}\right) - \frac{Z}{H}, & 0 \le Z \le H \\ \frac{L/H}{(1-2(Z/H))\cdot\left(1-2\frac{Z+L}{H}\right)}, & Z \ge H \end{cases} \tag{3.17}$$

3.1.4. Модель тонкого слоя (L<H)

Максимальный сигнал из измерительного цилиндра пропорционален толщине слоя:

$$E_0 = P_0 \cdot L \cdot \frac{n}{c} \tag{3.18}$$

Формула охватывает все конфигурации взаимного расположения (см. Рисунок 3.3б): погружение цилиндра в слой, касание поверхности, выход за пределы слоя.

$$E(Z) = E_0 \cdot \begin{cases} \dfrac{1}{\left(1-2\left({}^{(Z+L)}/_{H_0}\right)\right)\cdot\left(1-2\left({}^{(Z+L)}/_{H_0}-\frac{L}{H}\right)\right)}, & Z \le -L \\ \dfrac{L+Z}{L} - \dfrac{{}^{Z}/_{L}}{1-2\frac{Z}{H}}, & -L \le Z \le 0; \\ 1, & 0 \le Z \le H_0 - L \\ \left[\dfrac{H_0-Z}{L} + \dfrac{1+{}^{(Z-H_0)}/_{L}}{1+2\cdot\left({}^{(Z-H_0+L)}/_{H}\right)}\right], & H_0 - L \le Z \le H_0 \\ \dfrac{1}{\left(1-2\left({}^{Z}/_{H_0}\right)\right)\cdot\left(1-2\left(\frac{Z}{H_0}+\frac{L}{H}\right)\right)}, & Z \ge H_0 \end{cases} \tag{3.19}$$

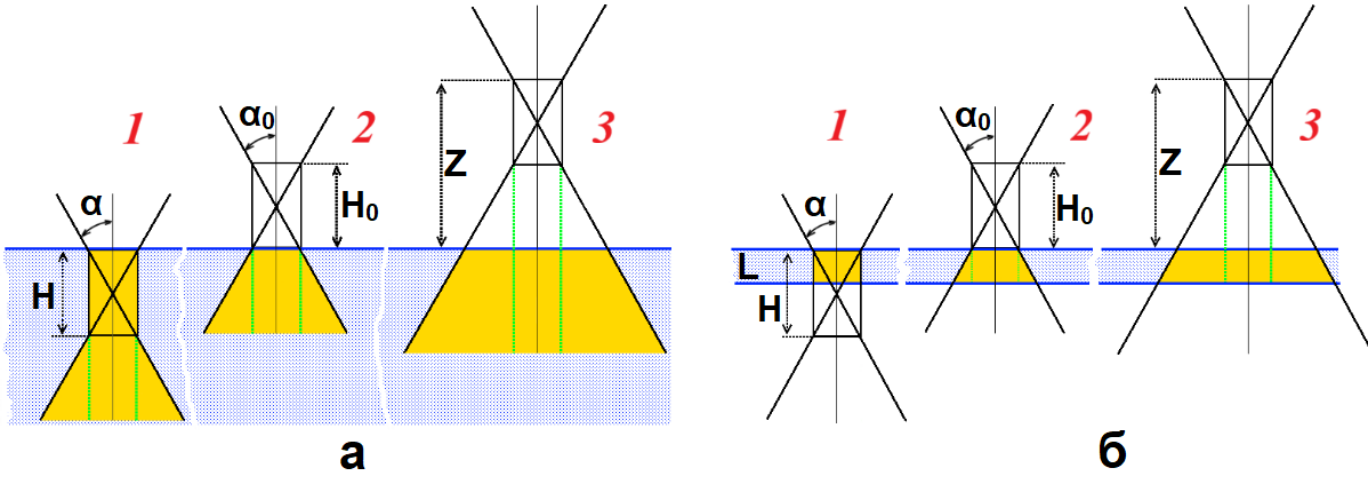

Рисунок 3.3 – Положения измерительного цилиндра относительно образца для модели (а) толстого и (б) тонкого слоя

3.1.5. Итерационный алгоритм варьирования параметров модели

Для интерпретации экспериментальных Z-профилей использована итерационная процедура аппроксимации в среде MathCad. Варьируемые параметры: амплитуда сигнала E_0, высота измерительного цилиндра H, толщина слоя L, отношение радиуса пятна к радиусу перетяжки $\rho=R/w_0$, базовая линия y_0, нулевой дрейф Z_0 (положение максимума профиля). Любой параметр может быть фиксирован. Начальные приближения определяются из предварительного анализа

экспериментального профиля; итерации продолжаются до достижения заданной точности (5%).

Таким образом, разработанная модель позволяет: (i) определять реальное продольное разрешение конфокальной схемы по образцу известной толщины; (ii) оценивать эффективную толщину слоя локализации ГКР-эффекта на наноструктурированной подложке путём сравнения экспериментального профиля Z-скана с модельным с учётом внефокусного рассеяния.

3.1.6. Валидация модели на известных данных

Для валидации модели использованы экспериментальные данные работы [207], полученные на рамановском микроскопе Renishaw при различной конфокальности (комбинация объективов с диафрагмами различного размера, возбуждение 785 нм). Измерения проводились на пластине кремния Si (100) путём погружения перетяжки лазерного пучка в толщу образца с последующим удалением от поверхности. Изменение конфокальности приводило к вариации размера измерительного объёма и, соответственно, продольного разрешения, что отражалось в ширине экспериментальных Z-профилей (Рис. 3.4, а, г, ж, к).

Оцифрованные данные аппроксимировались двумя моделями: крылом контура Лоренца (литературный подход [156–160]) и выражением (3.17) разработанной модели для толстого слоя. Поскольку полная ширина на полувысоте (FWHM) профиля Z-скана в модели толстого слоя равна высоте измерительного цилиндра H, сопоставлялись: экспериментальная FWHM, аппроксимируемый параметр H (предлагаемая модель) и аппроксимируемая FWHM (крыло контура Лоренца).

Результаты аппроксимации представлены на Рисунке 3.4. Разработанная модель удовлетворительно описывает экспериментальные профили во всех случаях; практически всегда (за исключением Рис. 3.4г) значения H оказываются ближе к экспериментальной FWHM, чем параметры аппроксимации контуром Лоренца.

Отмечается тенденция улучшения точности описания экспериментальных данных разработанной моделью с повышением аксиального разрешения.

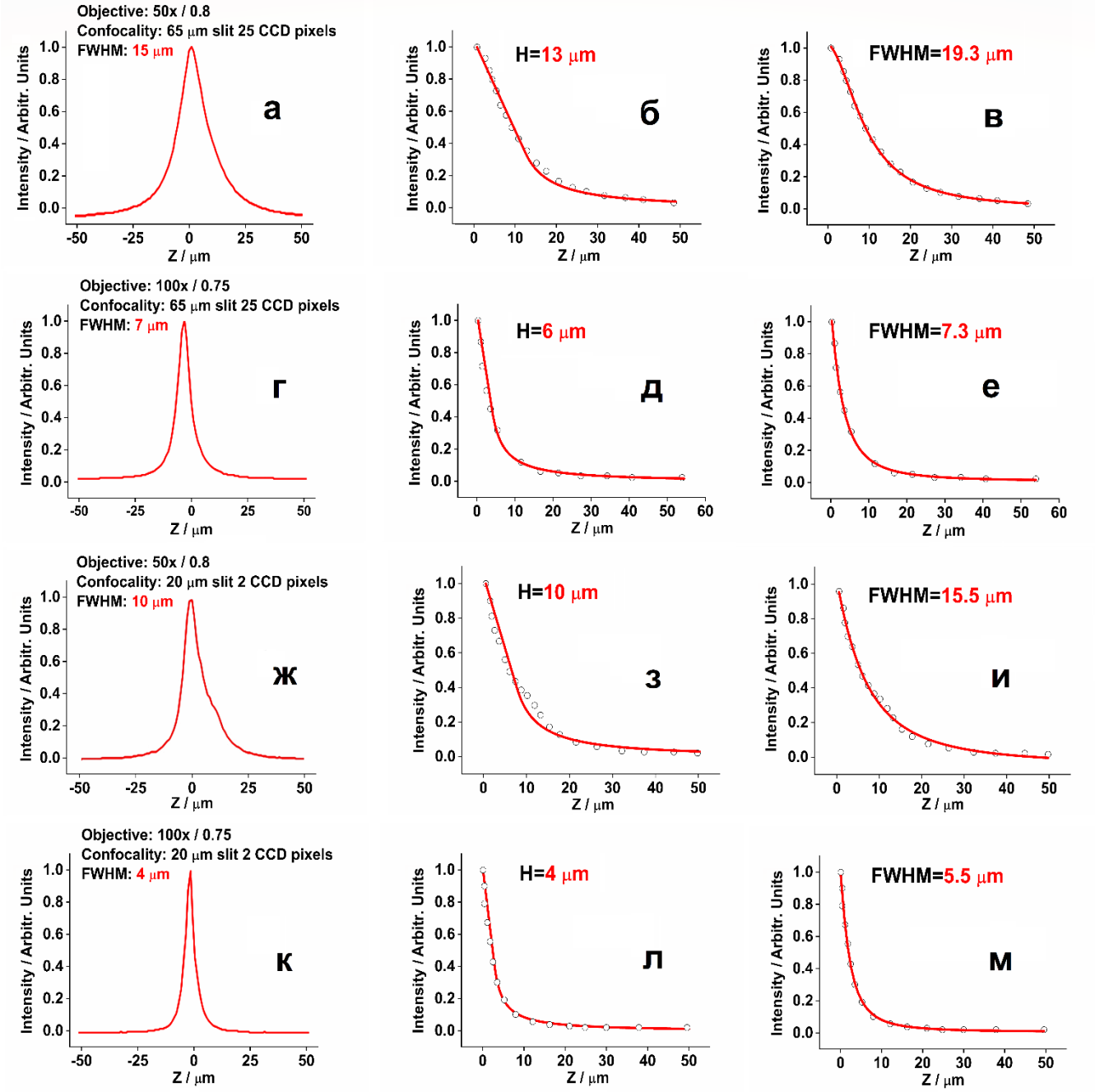

Рисунок 3.4 - Данные RENISHAW [207] (левая колонка: а,г,ж,к), аппроксимация моделью (средняя колонка:б,д,з,л), аппроксимация Лоренцем (правая колонка: в,е,и,м). Длина волны возбуждающего лазера 785 нм, параметры объектива и конфокальность указаны на картинках левой колонки

Проведённая валидация обосновывает применение модели для интерпретации собственных экспериментальных данных.

3.2. Измерение и обработка Z-сканов кремния и азота

На Рисунке 3.5 представлена эволюция спектров кремния и азота при удалении измерительного объема объектива от поверхности подложек. На вставках представлена увеличенная спектральная область с пиком, по которому проводился расчет. Соответственно, для кремния - 530 $см^{-1}$ (характеристический пик кремния), для азота - 2328 $см^{-1}$ (частотная область вблизи максимума Q-ветви молекулярного азота при комнатной температуре [208]).

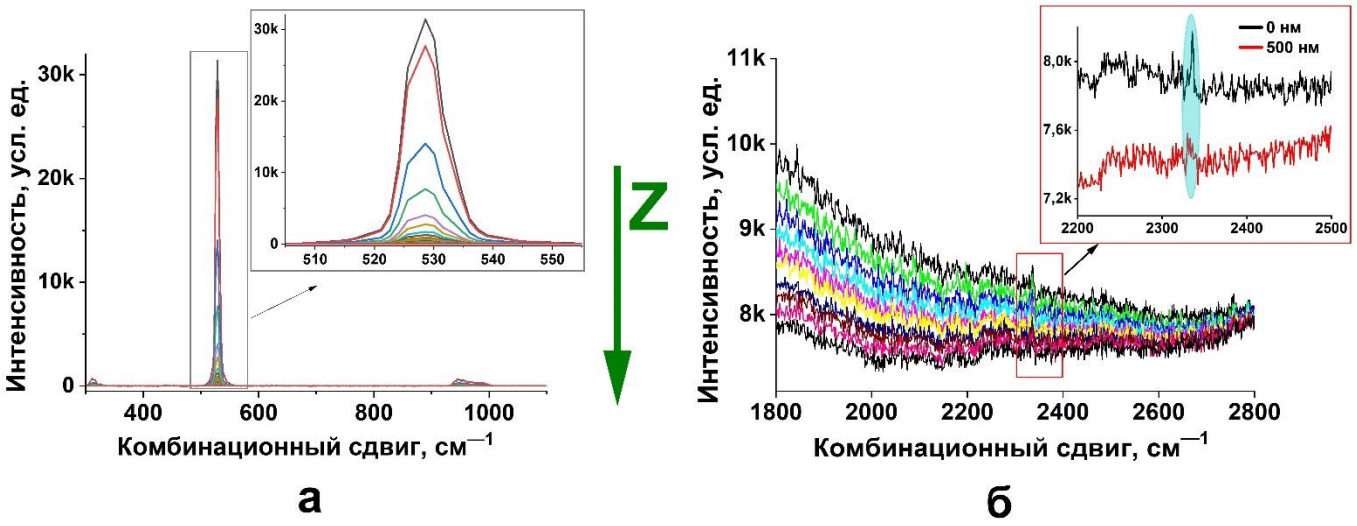

Рисунок 3.5 – (а) Спектры кремния, измеренные при последовательном удалении объектива от кремниевой пластины; (б) спектры азота воздуха, измеренные при последовательном удалении объектива от поверхности ГКР-подложки Ag#G. Зеленой стрелкой показано направление движения вдоль оптической оси микроскопа Z от поверхности подложек

Обработка экспериментальных спектров для всех перемещений Z позволяет построить профили Z-скана (Рисунок 3.6). Профиль Z-скана от толстой кремниевой пластины показан на Рисунке 3.6а. Измерительный цилиндр микроскопа был полностью погружен в материал пластины, и далее фокальная плоскость объектива

перемещалась вверх от поверхности образца. Значение коэффициента детерминации R^2=0.99 указывает, что эксперимент хорошо описывается предложенной моделью для толстого слоя. Из аппроксимации экспериментального профиля Z-скана Si модельным профилем (3.17) получается значение высоты измерительного цилиндра H=1.4 мкм. Учитывая величину показателя преломления кристаллического кремния (n=3.4), получаем значение высоты измерительного цилиндра в воздухе H_0:

$$H_0 = \frac{H}{n} \approx 410 \text{ нм}$$

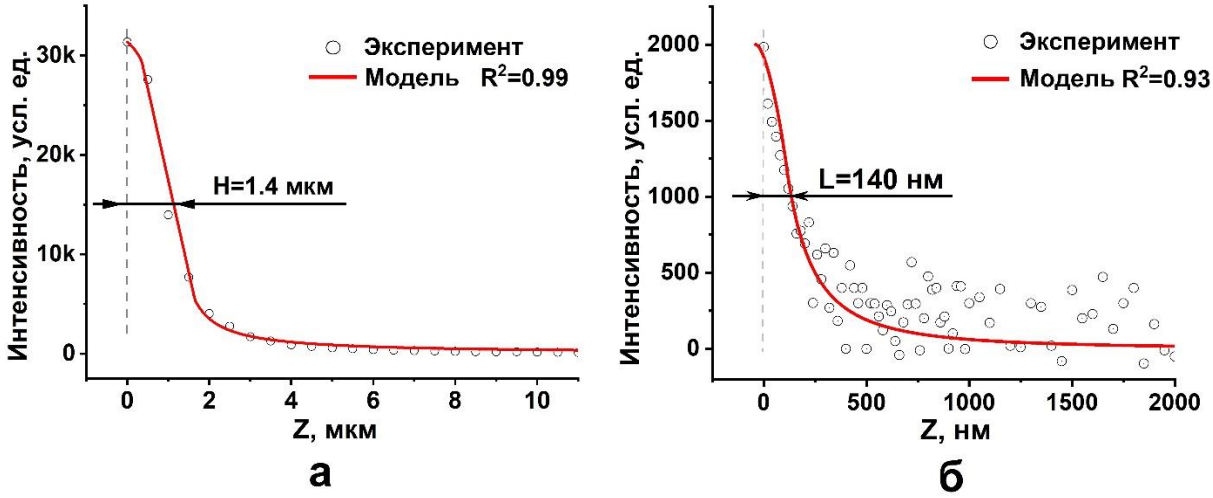

Рисунок 3.6 - Экспериментальные (круги) и модельные (красные линии) профили Z-скана кремния (a) и азота (b)

Профиль Z-скана от ГКР-слоя азота показан на Рисунке 3.7б. В принятой модели измерительный цилиндр частично перекрывал приповерхностный слой воздуха над подложкой. Далее фокальная плоскость объектива перемещалась вверх от поверхности образца. Полученное значение R^2=0.93 также свидетельствует о достаточно хорошем совпадении предлагаемой модели с экспериментом. Из аппроксимации экспериментального профиля Z-скана азота модельным профилем (3.19) получается значение толщины ГКР-слоя порядка 140±10 нм при высоте измерительного цилиндра H_0=410 нм.

Предложенный подход применим к планарным ГКР-активным подложкам, исследуемым в конфокальной геометрии, и позволяет оценивать усиливающие

эффекты подложки по Z-скану сигнала азота воздуха. Показано, что для наноструктурированных серебряных подложек, полученных методом электронно-лучевого напыления в вакууме, область локализации ГКР-эффекта составляет 140±10 нм, что существенно превышает ранее известные теоретические и экспериментальные оценки.

Глава 4. Исследование влияния физических способов пробоподготовки высокомолекулярного аналита на результат ГКР-анализа

Результаты, представленные в данном разделе опубликованы в работах [209,210].

4.1. Лазерное воздействие на водный раствор миоглобина

Согласно литературным данным, воздействие сфокусированного импульсного лазерного излучения на белковые растворы может приводить к формированию белковых кристаллов в объеме. Однако такой эффект ранее не наблюдали для белковых растворов в концентрациях единиц микрограмм и меньше. В силу конфигурации эксперимента объем белкового раствора ограничивался каплей 3 мкл. Поскольку диаметр используемого в работе лазерного луча в фокальной плоскости составляет порядка 1 мкм, для освещения капли диаметром 1.5 - 2 мм использовали расфокусированный лазерный луч.

В результате высушивания капель растворов миоглобина в концентрациях 1 мкг/мл и 10 нг/мл на воздухе и под воздействием лазерного излучения было получено три типа осадков. Осадок типа 1 был принят в качестве контроля; он представляет собой аморфный агломерат белка и является типичным для концентраций белка в растворе менее 100 мкг/мл при высушивании на воздухе. Данный тип осадка наблюдался при высушивании растворов в обеих используемых концентрациях. В отличие от контроля, при лазерном воздействии на каплю аналита наблюдается формирование двух типов структур, которые мы первично обозначим как кристаллические, характер которых зависит от концентрации белка в растворе. Для миоглобина в концентрации 1 мкг/мл характерно формирование ограненных кристаллов - тип 2. В случае понижения концентрации миоглобина до 10 нг/мл наблюдается формирование кристаллических точек, которые обозначены как тип 3. Оптические фотографии, полученные на конфокальном микроскопе, и

соответствующие усредненные ГКР-спектры с учетом среднеквадратичного отклонения для каждого типа представлены на Рисунке 4.1

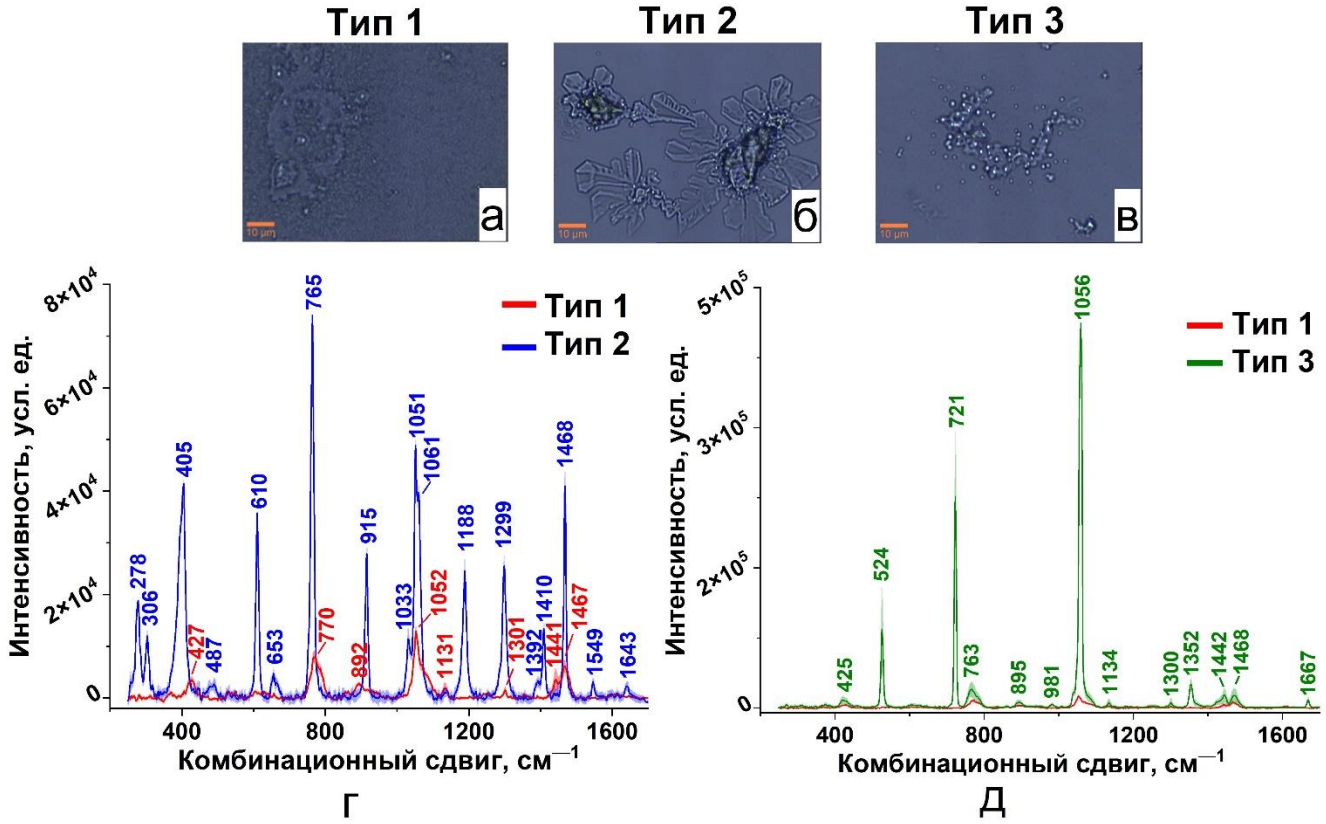

Рисунок 4.1 – Оптическое изображение типов осадков миоглобина: (а) Тип 1 - при высушивании на воздухе; (б) Тип 2 - при высушивании лазером растворов с концентрацией 1 мкг/мл; (в) Тип 3 - при высушивании лазером растворов с концентрацией 10 нг/мл; (г, д) ГКР-спектры, соответствующие каждому типу осадка миоглобина

Спектры типа 2 и 3 демонстрируют усиление на порядок по сравнению с контрольным спектром типа 1. Наблюдаемое сужение и появление новых полос колебаний в типе 2 и 3 указывает на упорядочение структуры белка с формированием кристаллической структуры ближнего порядка [211,212].

В спектрах всех трех типов есть общие полосы: 763–770, 1051–1056, 1299–1301, 1467–1468 $см^{-1}$, которые соответствуют колебанию индольного кольца триптофана [213], растяжению C-N связи в глутамине и лизине [214], деформациии

порфиринового кольца [213] и "ножничковому" колебанию CH_2 в лизине [214]. Можно предположить, что упорядочение пространственной структуры миоглобина происходит именно через данные аминокислоты. Увеличение амплитуды деформационного колебания порфиринового кольца, в типах 2 и 3 по сравнению с 1, указывает на развертывание белковых молекул. Высокоамплитудные колебания спектров 2 и 3 типа в низкочастотной области 200–700 $см^{-1}$ соответствуют деформации гема (heme) в плоскости и растяжению связи Fe-N в порфириновом кольце [215], что указывает на перестройку третичной структуры миоглобина. Появление колебания 915 $см^{-1}$ в типе 2 соответствует растяжению C-C связи глутаминовой кислоты [214]. Интенсивность данной полосы обусловлена большим содержанием глутаминовой кислоты в миоглобине: 21 единица на молекулу [192]. Колебания амида I в области 1640–1678 $см^{-1}$ для типов 2 и 3 указывают на изменения во вторичной структуре белка, а именно изменение ориентации амидных групп относительно поверхности подложки [198].

Известно, что поверхность серебра в воде имеет положительный заряд [214,216]. Поскольку аналитом является водный раствор миоглобина, можно предположить, что молекулы будут ориентироваться отрицательно заряженными частями. В случае миоглобина это глутаминовая и аспарагиновая кислоты, ароматические аминокислоты фенилаланин, тирозин и триптофан с локализацией отрицательного заряда благодаря π-распределенным орбиталям в ароматической системе, а также и серосодержащий метионин. Для оценки ориентации молекулы миоглобина при высушивании аналита на воздухе была использована модель из RCSB Protein Data Bank [217], где цветом обозначены области, где сконцентрированы перечисленные аминокислоты (Рисунок 4.2).

В спектре высушенного на воздухе миоглобина (тип 1) проявляются полосы колебаний всех перечисленных аминокислот: отрицательно заряженных Glu при 1066, 1252, 1352 и Asp при 927 $см^{-1}$, ароматических Phe при 1052 $см^{-1}$, Tyr при 854 и 1607

$см^{-1}$ и Trp при 892 и 1352 $см^{-1}$, а также серосодержащего Met при 627 и 1352 $см^{-1}$. Полоса Met при 627 $см^{-1}$ непосредственно обусловлена колебаниями C-S. Она характеризуется низкой амплитудой из-за малого содержания метионина в молекуле миоглобина, всего 3 единицы на молекулу [192].

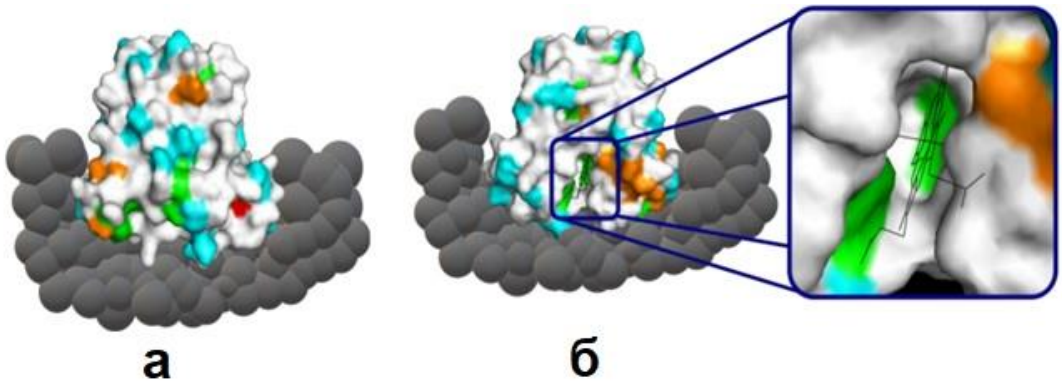

Рисунок 4.2 – Предполагаемая ориентация молекул миоглобина относительно Ag ГКР-активного субстрата при воздушной сушке: (а) вид спереди и (б) вид сзади. Красный — Met; оранжевый — дипептиды Ala–Ala, Leu–Gly, Pro–Leu и Ala–Gln; синий — Asp и Glu; зеленый — Phe, Trp и Tyr. Гем показан в виде скелета

Из рисунка 4.2 видно, что Met и гем определяют поворот молекулы относительно подложки, потому что они расположены однозначно, особенно Met, единственный у поверхности. Два других метионина находятся внутри молекулы и в такой проекции не видны.

Полученные аморфные и кристаллические объекты были охарактеризованы с помощью АСМ и профилометрии. На Рисунке 4.3 представлены типичные изображения и профили поперечного сечения исследуемых объектов. Из профилей сечения видно, что высота аморфных агломератов (тип 1) и кристаллических точек (тип 3) составляет 145±5 нм, кристаллов (тип 2) – 200–250 нм.

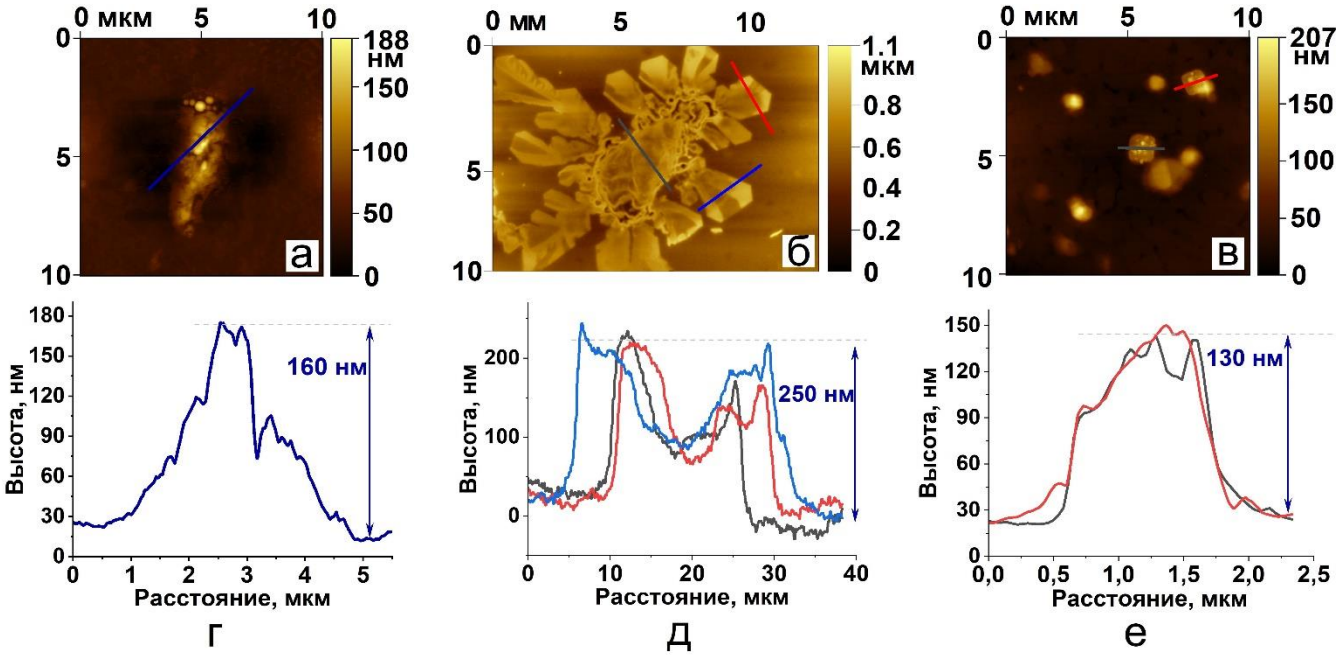

Рисунок 4.3 – Типичные изображения аморфных агломератов: (а) АСМ изображение Типа 1; (б) оптическое изображение кристалла Типа 2; (в) АСМ изображение кристаллических точек Типа 3 и соответствующие профили сечений (г, д, е). На АСМ и оптическом изображениях линиями указаны прямые, вдоль которых извлекался профиль сечения. Цвет линии соответствует цвету профиля

Полученные значения высоты объектов сопоставимы или превышают эффективную область локализации ГКР-эффекта (140±10 нм). Следовательно, увеличение интенсивности сигнала не может быть объяснено исключительно увеличением общего количества вещества в измерительном объеме и связано с изменением распределения молекул, их ориентацией и характером взаимодействия с подложкой. Это позволяет исключить простой геометрический фактор как единственную причину роста сигнала и указывает на более сложный характер изменений в системе.

Полученные данные позволяют предположить, что рост сигнала связан с изменением контакта белковых молекул с серебряной поверхностью при локальном нагреве и управляемом испарении растворителя. Лазерное воздействие может способствовать формированию более плотного контакта молекул с подложкой,

изменению их ориентации относительно поверхности, а также частичной перестройке надмолекулярной организации белка в процессе кристаллизации. Поскольку интенсивность ГКР-усиления резко убывает с расстоянием между молекулой и металлической поверхностью, даже незначительное уменьшение среднего расстояния адсорбированных молекул до подложки может приводить к существенному росту сигнала.

Кроме того, нельзя исключать вклад изменений локального диэлектрического окружения и перераспределения ближнего электромагнитного поля в области контакта белкового кристалла с металлической структурой. Формирование более упорядоченных областей может модифицировать условия возбуждения локальных плазмонных резонансов и тем самым дополнительно усиливать регистрируемый сигнал. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что лазерно-индуцированная сушка является инструментом управления молекулярной организацией и характером адсорбции белка, что отражается на эффективности ГКР-анализа.

4.2. Предварительная обработка стеклянной основы подложек Ag#G

В литературном обзоре было отмечено, что использование ультразвукового воздействия в процессе пробоподготовки аналита для ГКР-анализа может быть сопряжено с особенностями морфологии ГКР-подложки. Для этого была проведена предварительная обработка стеклянной основы по двум технологиям, описанным в разделе 2.5.2 настоящей диссертации. Затем, на обработанные предметные стекла стандартно напыляли слой серебра, который повторял характерные особенности морфологии основы. Параметры шероховатости полученных поверхностей исследовали с помощью АСМ. В качестве контроля принимается ГКР-подложка без предварительной обработки стекла. На Рисунке 4.4 приведены АСМ-изображения поверхности получившихся структур, а в Таблице 4.1 представлены основные параметры шероховатости.

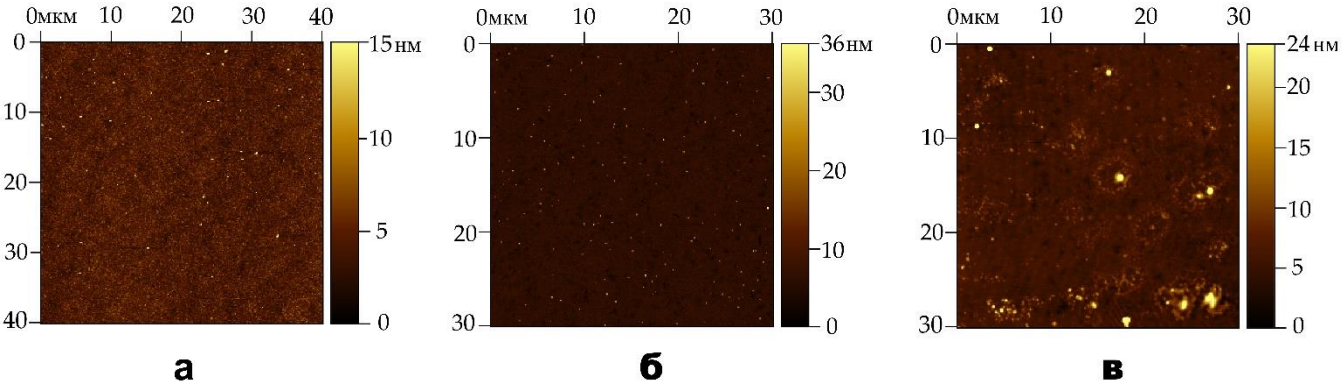

Рисунок 4.4 – АСМ изображения поверхности ГКР-подложек Ag#G (а) без предварительной обработки стеклянной основы и с предварительной обработкой стеклянной основы (б) по методу I, (в) по методу II

Таблица 4.1 – Основные параметры шероховатости ГКР-подложек Ag#G после предварительной обработки стеклянной основы

	R_q, нм	R_{3z}, нм	R_{ku}	R_{sk}	λ_a, нм
Контроль	3.2±0.2	9±3	62±11	4.7±1.3	120±30
Метод I	1.2±0.3	6±1.5	81±18	7.5±1.8	60±20
Метод II	0.9±0.2	5.9±1.2	7.9±2	1.1±0.3	100±30

Поверхность, подвергнутая обработке различными методами очистки, демонстрирует принципиально различный характер морфологии, что отражается в системе статистических параметров шероховатости по ISO 21920-2:2021.

Высокое значение R_{ku} свидетельствует о наличии редких выраженных экстремумов профиля, тогда как снижение R_{ku} сопровождается формированием более сглаженного рельефа с меньшим числом острых локальных выступов.

Контроль характеризуется выраженной положительной асимметрией профиля (R_{sk} = 4.7 ± 1.3 > 0) и аномально высоким эксцессом (R_{ku} = 62 ± 11 >> 3), что свидетельствует о наличии редких выраженных экстремумов профиля с преобладанием острых выступов над впадинами. Значительная величина среднеквадратичного отклонения (R_q = 3.2 ± 0,2 нм) и базовой глубины шероховатости

(R_{3z} = 9 ± 3 нм) указывают на развитый рельеф с выраженной вертикальной дисперсией. Относительно малая средняя длина волны профиля (λ_a = 120 ± 30 нм) обусловливает высокую латеральную плотность неровностей, формирующих псевдопериодическую структуру острых нановыступов.

Метод очистки I индуцирует трансформацию профиля в направлении ещё более контрастной структуры: асимметрия возрастает до R_{sk} = 7.5 ± 1,8, а эксцесс достигает экстремального значения R_{ku} = 81 ± 18. При существенном снижении амплитудных параметров (R_q = 1.2 ± 0,3 нм, R_{3z} = 6 ± 1.5 нм) наблюдается минимизация λ_a = 60 ± 20 нм, что указывает на формирование диспергированной системы изолированных наномасштабных дефектов на гладком фоне.

Метод очистки II обеспечивает качественно иной тип поверхностной структуры. Снижение асимметрии до R_{sk} = 1.1 ± 0,3 и эксцесса до R_{ku} = 7.9 ± 2, близких к параметрам нормального распределения, свидетельствует о переходе к более сглаженному рельефу с меньшим числом острых локальных выступов. Минимальные значения R_q = 0.9 ± 0.2 нм и R_{3z} = 5.9 ± 1.2 нм при увеличенной λ_a = 100 ± 30 нм указывают на формирование плавного волнообразного рельефа с низкой вертикальной дисперсией и повышенной латеральной корреляцией неровностей.

4.3. Ультразвуковое воздействие на водный раствор миоглобина

После того, как морфология подложек была охарактеризована АСМ, на все три типа поверхности наносили раствор миоглобина в концентрации 1 мкг/мл и проводили пробоподготовку с использованием ультразвука. На систему аналит/подложка/пьезоэлемент подавались акустические волны частотой 47 и 580 кГц. После полного высыхания образцов на подложке формировался сухой осадок. В процессе проведения экспериментов было установлено, что ультразвуковое воздействие способствует более быстрому высыханию аналитов – время пробоподготовки сокращается с 30 до 4 – 7 минут. Из сформированных осадков были измерены ГКР-спектры. Оптические изображения осадков и полученные ГКР-

спектры представлены на Рисунке 4.5. Для сравнения спектры приведены в одном масштабе.

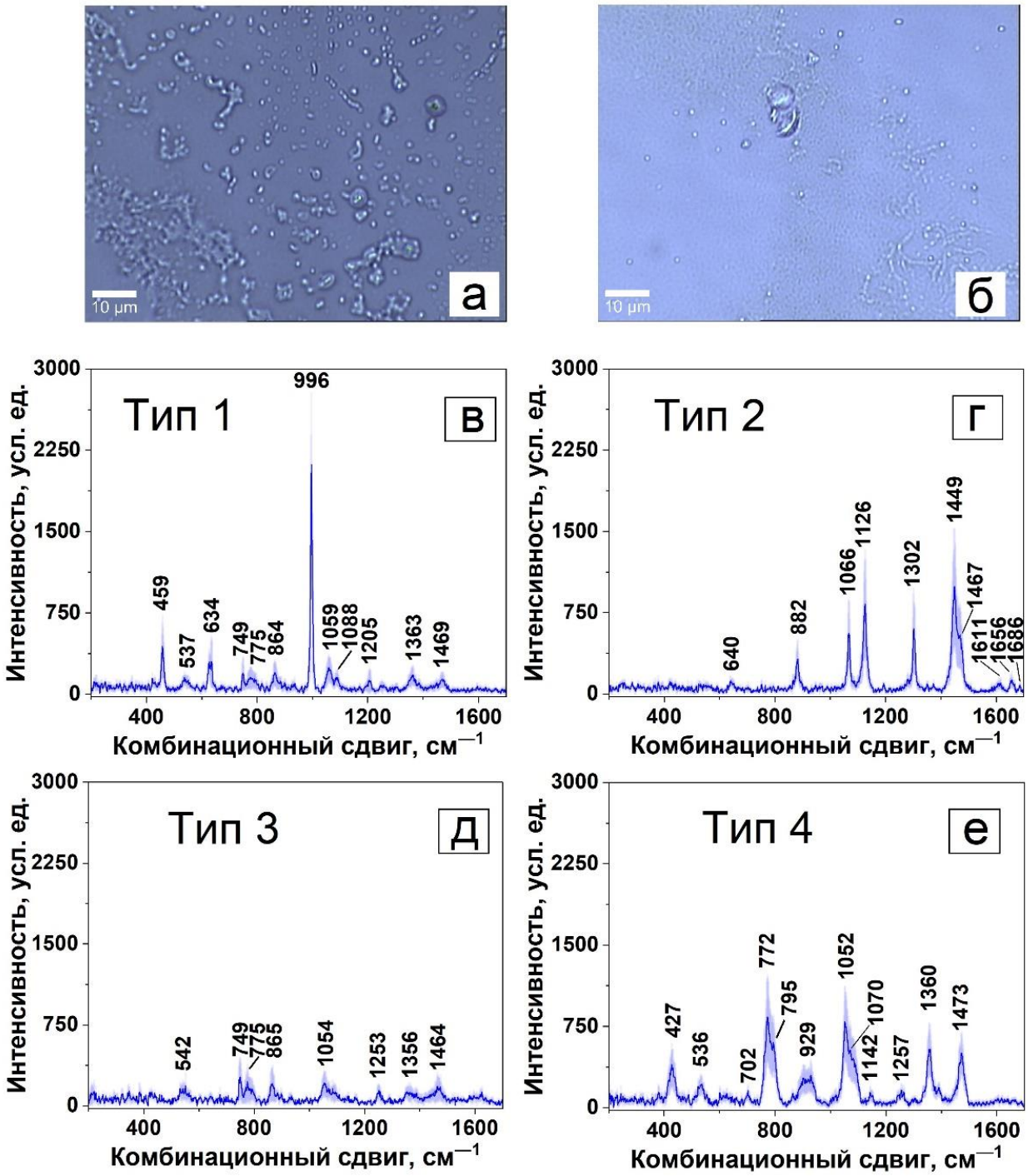

Рисунок 4.5 – Осадок миоглобина после пробоподготовки с использованием ультразвука (47 и 580 кГц). Оптические изображения (а,б); ГКР-спектры: Тип 1 (в), Тип 2 (г), Тип 3 (д), Тип 4 (е)

Внешний вид осадков миоглобина, полученных на разных поверхностях, не отличался в оптический микроскоп. В связи с этим на Рисунке 4.5 (а, б) приведены типичные изображения сформированных осадков. На всех трех типах поверхности наблюдался набор ГКР-спектров, который был разделен на 4 типа по следующим критериям: положению центра масс спектра в диапазоне 300–1700 $см^{-1}$ и соотношению интенсивностей колебательных полос миоглобина.

- Тип 1: центр масс спектра расположен в середине спектрального интервала, все колебательные полосы имеют амплитуду одного порядка, в центре интервала наблюдается интенсивная колебательная полоса на порядок больше остальных.
- Тип 2: центр масс спектра смещен от середины спектрального интервала в высокочастотную область, колебательные полосы имеют интенсивность одного порядка.
- Тип 3: центр масс спектра расположен в середине спектрального интервала, все колебательные полосы имеют амплитуду одного порядка, кратно меньшую, чем для Типов 1 и 2.
- Тип 4: центр масс спектра расположен в середине спектрального интервала, огибающая амплитуд колебательных полос представляет собой колоколообразную кривую, интенсивность колебаний одного порядка, сопоставима с Типом 2.

Сужение и усиление колебательной полосы 996 $см^{-1}$ в Типе 1 указывает на формирование белковых кристаллов, аналогично спектрам после пробоподготовки с использованием лазерного воздействия. Также на оптических изображениях (Рисунок 4.5 а, б) наблюдаются кристаллические точки, в которых наблюдался спектр Типа 1. Аналогичный эффект наблюдался при высушивании с использованием лазера (Рисунок 4.1 в, д). В целом анализ колебательных полос всех 4-х типов спектров указывает на конформацию миоглобина процессе пробоподготовки. Наблюдаются как общие колебания, например на частотах 750–880 и 1050–1070 $см^{-1}$, так и

индивидуальные для каждого типа, например в низкочастотной области 450–700 $см^{-1}$ для типов 1 и 4, и в высокочастотной области 1600–1700 $см^{-1}$ для Типа 2. Возникновение колебаний в низкочастотной области указывает на деформацию гема (порфиринового кольца) внутри молекулы миоглобина в процессе взаимодействия с поверхностью ГКР-подложки. Область 1600–1700 $см^{-1}$ включает колебания Амид I, а также высокочастотные моды порфиринового кольца гема. Эти полосы чувствительны к вторичной структуре белка, ориентации молекулы и взаимодействию с металлической поверхностью.

В качестве контроля измерен КР-спектр миоглобина в концентрации 1 мг/мл на стекле и ГКР-спектр миоглобина в концентрации 1 мкг/мл на подложке Ag#G без ультразвукового воздействия. Результирующие спектры представлены на Рисунке 4.6. КР-спектры стекла содержат полосы при 365, 558 и 1300 $см^{-1}$; КР-спектры миоглобина на стекле – дополнительные пики при 770, 1010 и 1259 $см^{-1}$. Также на Рисунке 4.6в представлен спектр миоглобина в концентрации 1 мкг/мл на ГКР-подложке, который отличается от типов спектров, полученных после ультразвуковой обработки аналита, как общей интенсивностью, так и основным набором полос колебаний.

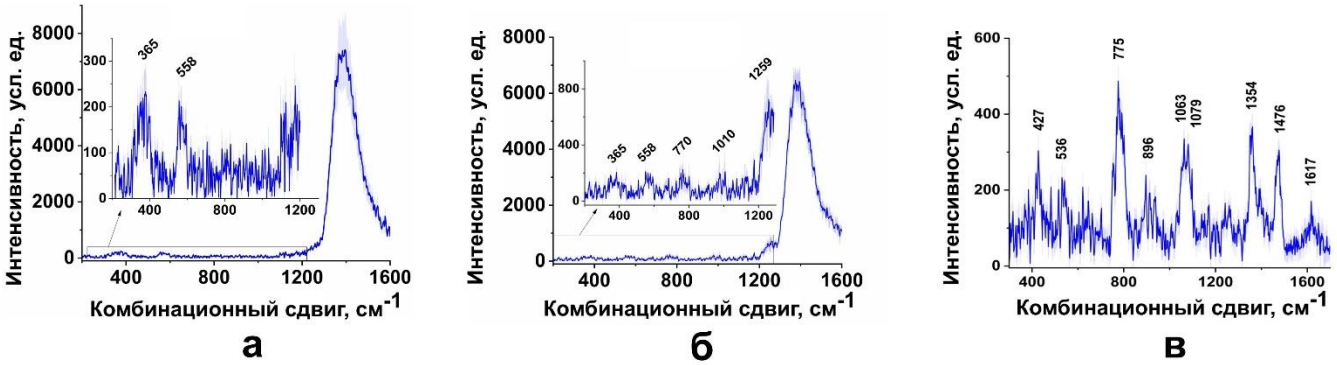

Рисунок 4.6 – (а) КР-спектр покровного стекла, (б) КР-спектр 1 мг/мл миоглобина, высушенного на покровном стекле, (в) ГКР-спектр 1 мкг/мл миоглобина, высушенного без дополнительного воздействия на подложке Ag#G

Для детального анализа составлена Таблица 4.2, в которой представлены основные полосы колебаний ГКР-спектров Типов 1–4, полученные при ультразвуковом воздействии, а также контрольный спектр миоглобина, полученный высушиванием на ГКР-подложке Ag#G без дополнительной обработки и ультразвукового воздействия.

Таблица 4.2 – Основные полосы колебаний ГКР-спектров миоглобина и их интенсивность.

Полоса колебания, $см^{-1}$	**Интенсивность, отн.ед.**				
	Контроль	**Тип 1**	**Тип 2**	**Тип 3**	**Тип 4**
427	303				395
459		441			
536	233				218
542		137		156	
627					130
634		300			
640			122		
703					156
749		195		221	
775	486	157		208	837
794					601
865		199		204	
882			323		
896	239				
929					299
996		2118			
1053				212	790
1059		246			
1063	335				
1066			563		
1071					533

Полоса колебания, $см^{-1}$	**Интенсивность, отн.ед.**				
	Контроль	**Тип 1**	**Тип 2**	**Тип 3**	**Тип 4**
1079	321				
1090		151			
1126			830		
1142					140
1193			97		
1205		127			
1255				140	
1302			603		
1354	362			131	
1362		179			540
1449			991		
1470		140	546	181	503
1476	299				
1609			97		
1617	170				
1625				127	
1656			130		

Сопоставление с контрольным спектром показывает, что ультразвуковая обработка не просто усиливает существующие полосы, а качественно трансформирует спектральный отклик:

- Тип 1: активация новой полосы 996 $см^{-1}$ при одновременном подавлении полос 775 и 1470 $см^{-1}$, присутствующих в спектрах всех типов. Это указывает на строгую ориентационную селекцию определённой моды вследствие кристаллизации молекул миоглобина;
- Тип 2: перераспределение интенсивности в высокочастотную область без экстремальных пиков – умеренное ориентационное упорядочение;

- Тип 3: общее ослабление всех полос – аморфный осадок и случайная ориентация молекул относительно подложки;
- Тип 4: спектр, ближайший к контрольному по набору полос, но с перераспределением интенсивностей – поликристаллический осадок со случайной ориентацией молекул относительно подложки.

В качестве возможного механизма усиления полос 996 $см^{-1}$ в спектре Типа 1 может быть рассмотрена гипотеза о модификации контура плазмонного резонанса ГКР-подложки. Изменение рельефа поверхности в процессе предварительной обработки стеклянной основы подложек модифицирует условия формирования серебряной плёнки при электронно-лучевом напылении: агломераты серебра, образующие плёнку, формируются на подложке с развитой наноразмерной шероховатостью, что может приводить к изменению резонансных свойств металлической поверхности. В частности, спектр плазмонного резонанса, ответственного за электромагнитный механизм усиления ГКР, может претерпевать сдвиг, расщепление или появление дополнительных резонансных структур — плеч или отдельных пиков. Подобные эффекты, связанные с управлением плазмонными свойствами наноструктурированных металлических поверхностей, широко описаны в литературе и используются для создания ГКР-активных подложек со специальными характеристиками [218,219].

Если допустить, что на подложках после предварительной обработки возникает дополнительный плазмонный резонанс на длине волны λ = 851,6 нм, то при возбуждении излучением λ_{ex} = 785 нм данный резонанс попадёт в резонанс с комбинационной полосой при 996 $см^{-1}$ (поскольку $1/785 - 1/851{,}6 \approx 996$ $см^{-1}$ в обратных сантиметрах). В этом случае усиление полосы 996 $см^{-1}$ имело бы чисто электромагнитную природу: оно обусловливалось бы резонансным совпадением длины волны рассеянного излучения с дополнительным плазмонным пиком подложки. Следствием данной гипотезы является обязательная зависимость

усиленных спектров от длины волны возбуждения: при переходе к другой λ_{ex} резонансное условие нарушалось бы, и спектры Типа 1 должны были либо качественно измениться, либо исчезнуть.

Для экспериментальной проверки данной гипотезы ГКР-спектры миоглобина были измерены при двух длинах волны возбуждающего излучения: λ_{ex} = 785 нм и λ_{ex} = 532 нм. Всего получено 263 ГКР-спектра при следующих условиях: (i) две длины волны возбуждающего излучения (532 нм и 785 нм); (ii) три метода подготовки поверхности подложки перед нанесением серебра: без предобработки, метод I, метод II; (iii) две частоты ультразвука при осаждении миоглобина: 47 кГц и 580 кГц. Вся совокупность ГКР-спектров была проанализирована, и процентное содержание спектров каждого типа в общем числе спектров было определено для каждого метода обработки/очистки стеклянных подложек и для каждой частоты ультразвукового воздействия при осаждении капель аналита. Результаты анализа приведены в Таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Процентное содержание спектров каждого типа в общем числе спектров.

Длина волны, нм	**Метод предобработки**	**Частота ультразвукового осаждения**					
		580 кГц				**47 кГц**	
		Тип ГКР-спектра				Тип ГКР-спектра	
		1	2	3	4	1 & 2	3 & 4
785	1	46%	25%	29%	0%	0%	100%
	2	29%	13%	58%	0%	0%	100%
	Без предобработки	44%	0%	56%	0%	17% 83%	0%
532	1	12%	24%	64%	0%	0%	100%
	2	9%	4%	87%	0%	0%	100%
	Без предобработки	22%	78%		0%	50% 50%	0%

Результаты показали, что введённая типология спектров сохраняется при обеих длинах волн: спектры Типа 1 регистрируются как при λ_{ex} = 785 нм, так и при λ_{ex} = 532 нм. Поскольку при λ_{ex} = 532 нм резонансное условие λ = 851,6 нм для полосы 996 $см^{-1}$ не выполняется, сохранение спектров типа 1 при 532 нм не подтверждает гипотезу о резонансном усилении полосы 996 $см^{-1}$ за счет дополнительного плазмонного пика на 851,6 нм.

Совместный анализ Таблиц 4.1 и 4.3 показывает, что для λ_{ex} = 785 нм наблюдается прямая корреляция между величиной параметра эксцесса R_{ku} поверхности ГКР-подложки и вероятностью появления спектров Типа 1 (чем выше R_{ku}, тем выше процентное содержание спектров) и обратная корреляция для спектров Типа 3 (чем выше R_{ku}, тем меньше процентное содержание спектров).

Таким образом, гипотеза о плазмонном происхождении экстраординарных спектров отвергнута. ЭМ усиление ГКР не является определяющим фактором наблюдаемого явления, и происхождение спектров Типа 1 следует искать в неэлектромагнитных механизмах. Увеличение амплитуды отдельной колебательной полосы в спектре можно было бы объяснить за счет ХМ, однако данный механизм усиления ГКР работает преимущественно в приповерхностных субнанометровых слоях аналита. Как было показано (см. Рисунок 4.3) из раствора миоглобина в концентрации 1 мкг/мл даже при высушивании в нормальных условиях формируются агломераты высотой от сотни нанометров, а также с учетом высоты локализации ГКР-эффекта над планарными серебряными подложками порядка 140 нм, ХМ не может объяснить десятикратное усиление спектра всего макроскопического кристалла, поскольку лишь незначительная доля молекул находится в субнанометровой зоне химического усиления. Наряду с этим, работ, демонстрирующих увеличение только одной колебательной полосы за счет ХМ усиления, обнаружено не было.

Ориентационный механизм согласуется со всеми экспериментальными наблюдениями. Известно, что ориентация молекулы относительно поверхности

может усиливать конкретные моды: колебания с изменяемой поляризуемостью, перпендикулярной поверхности, как правило, усиливаются сильнее, тогда как внутриплоскостные моды могут быть подавлены или, наоборот, проявиться при определённой геометрии адсорбции [220]. Так, влияние ориентации молекул относительно ГКР-структуры на форму спектра было продемонстрировано на примере 4-аминобензойной кислоты [221] и молекул-репортеров на основе тиоловых производных [222].

При низкочастотном (47 кГц) воздействии на подложки после предварительной обработки (методы I и II) предположительно происходит кристаллизация белка вне поверхности либо кристаллизация отсутствует. Тесный контакт кристалла миоглобина с поверхностью не достигается, ориентация кристалла произвольна, и усиление отдельных полос в спектре не наблюдаются. Доминирование спектров Типа 3 и 4 на подложках с высоким R_{ku} (методы I и II) при данной частоте указывает на формирование специфической конформации белка, не связанной с ориентационными эффектами.

При высокочастотном (580 кГц) воздействии на всех трёх типах поверхностей кристаллизация белка происходит непосредственно на поверхности; микрокристаллы формируются в углублениях серебряного покрытия в виде монокристаллов. Это определяет иной тип закрепления на подложке и, следовательно, иную конформацию молекул миоглобина. При таких условиях контакт кристалла с поверхностью может быть весьма тесным. Закрепление кристаллов миоглобина на поверхности подложки определенным образом позволяет ориентационному механизму усиления проявляться в ГКР-спектрах.

Различие в поведении подложек с разной морфологией при 580 кГц объясняется характером наноструктур:

- Подложки с высоким R_{ku} (метод I, без предобработки) содержат изолированные острые нановыступы. При высокочастотном воздействии микрокристаллы

миоглобина растут непосредственно в этих локализованных «горячих точках», что обеспечивает фиксацию кристаллической решётки в определённом направлении относительно подложки и приводит к спектрам Типа 1.

- Подложки с низким R_{ku} (метод II) имеют волнообразный рельеф без резких локальных экстремумов. Отсутствие выраженных центров локализации поля препятствует направленной кристаллизации, и доля спектров Типа 1 снижается (29% против 46% для метода I для λ_{ex} = 785 нм).

Таким образом, показано, что физическое воздействие на систему «раствор миоглобина–ГКР-подложка» позволяет управлять условиями формирования белкового осадка и существенно изменять его спектральный отклик. Расфокусированное лазерное воздействие при сушке растворов миоглобина в низких концентрациях приводит к формированию кристаллоподобных объектов, характер которых зависит от исходной концентрации белка. Формирование таких объектов сопровождается изменением относительных интенсивностей и появлением дополнительных колебательных полос в ГКР-спектрах. Сопоставление размеров сформированных объектов с эффективной областью локализации ГКР-эффекта показывает, что наблюдаемое увеличение сигнала не может быть объяснено исключительно увеличением количества аналита в области усиления и, вероятно, связано с изменением его пространственной организации и взаимодействия с металлической поверхностью.

Ультразвуковое воздействие позволяет сократить продолжительность пробоподготовки с ~30 до 4–7 мин и приводит к формированию нескольких воспроизводимых типов ГКР-спектров миоглобина. Характер спектрального отклика зависит от частоты ультразвукового воздействия и морфологических характеристик серебряной подложки. Установлена взаимосвязь между параметром эксцесса профиля поверхности R_{ku} и вероятностью формирования спектров Типа 1, характеризующихся интенсивной полосой при 996 $см^{-1}$.

Экспериментальная проверка зависимости данного спектрального эффекта от длины волны возбуждения не подтвердила гипотезу о его происхождении вследствие дополнительного плазмонного резонанса. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что существенную роль в формировании наблюдаемых спектральных различий играют пространственная организация и ориентация молекул миоглобина относительно наноструктурированной серебряной поверхности. Таким образом, управление морфологией осадка и условиями его взаимодействия с ГКР-подложкой может рассматриваться как перспективный инструмент повышения информативности и воспроизводимости ГКР-анализа белковых аналитов.

Глава 5. ГКР-анализ клинически значимых олигосахаридов – маркеров грибковых и бактериальных инфекций

Результаты данной главы опубликованы в работе [205].

Исследуемые олигосахариды были разделены на две группы: первая включает в себя (1)oligo-a-(1-2)-Man, (2)oligo-b-(1-3)-Glc и (3)oligo-b-(1-6)-Glc, не содержащие галактофуранозного остатка (Galf), вторая представлена образцами (4)oligo-DHG-Ef, (5)oligo-GI-Kp, (6)oligo-GM-Af, содержащими Galf .

На Рисунке 5.1 представлены усредненные спектры для каждого олигосахарида после всех этапов предварительной обработки, представленной в Главе 2, раздел 2.5.1.

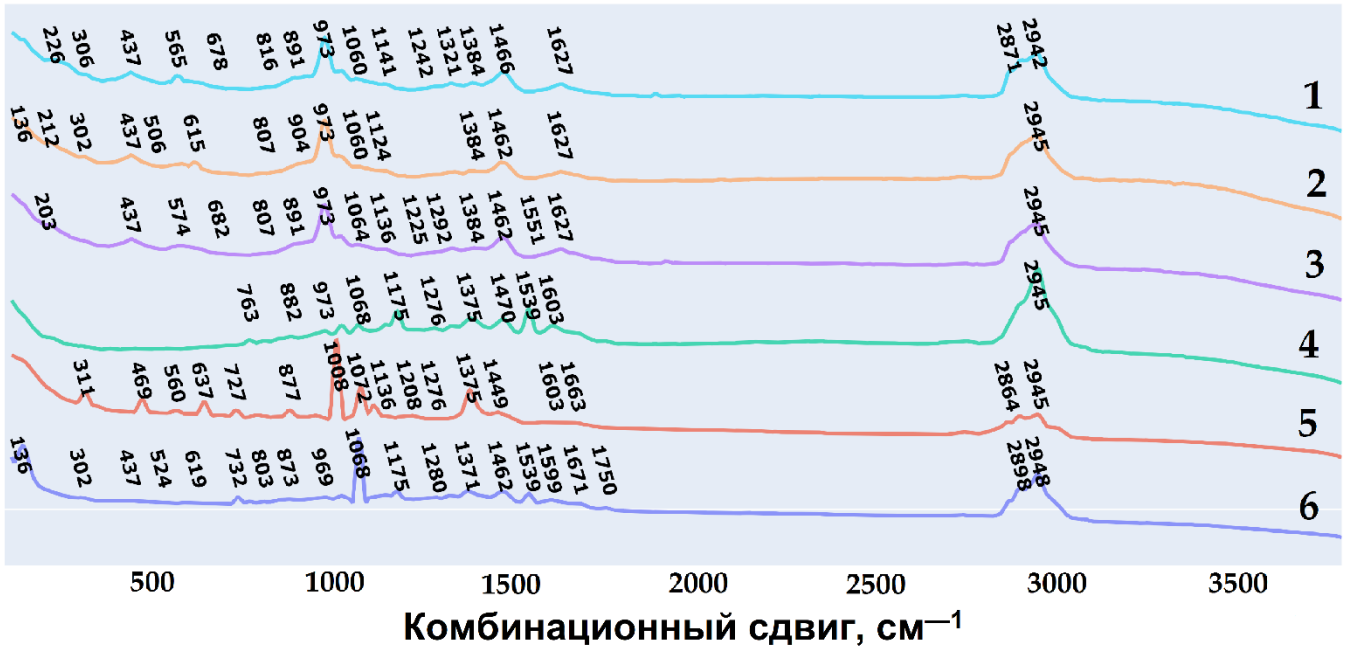

Рисунок 5.1 – Усредненные спектры олигосахаридов после предварительной обработки: (1) oligo-a-(1-2)-Man, (2) oligo-b-(1-3)-Glc, (3) oligo-b-(1-6)-Glc, (4) oligo-DHG-Ef, (5) oligo-GI-Kp, (6) oligo-GM-Af

Предварительный визуальный анализ показывает, что спектры образцов первой группы (1–3) имеют сходные спектральные профили, тогда как образцы второй группы (4–6) существенно различаются как между собой, так и по сравнению с первой группой.

Для более детального анализа применён метод PCA, позволяющий снизить размерность данных и представить спектры в пространстве наиболее информативных признаков. Такая проекция выделяет основные направления вариаций и облегчает выявление скрытых закономерностей и кластерной структуры в спектральных данных.

Как видно из графика проекций первых двух главных компонент (Рисунок 5.2а), спектры олигосахаридов чётко разделяются на два кластера: первый соответствует соединениям без остатка галактофуранозы (1–3), второй — содержащим данный фрагмент (4–6). Полученное разделение свидетельствует о наличии значимых спектральных различий между группами.

PCA позволяет определить нагрузки, отражающие вклад различных спектральных областей в общую дисперсию данных и, соответственно, в различие между анализируемыми группами. С химической точки зрения эти области соответствуют колебательным полосам, определяющим различия спектров. На Рисунке 5.2б представлены нагрузки для всех исследованных олигосахаридов. Для каждой пары соединений показаны их спектры и вклад первых двух главных компонент, формирующих основные различия.

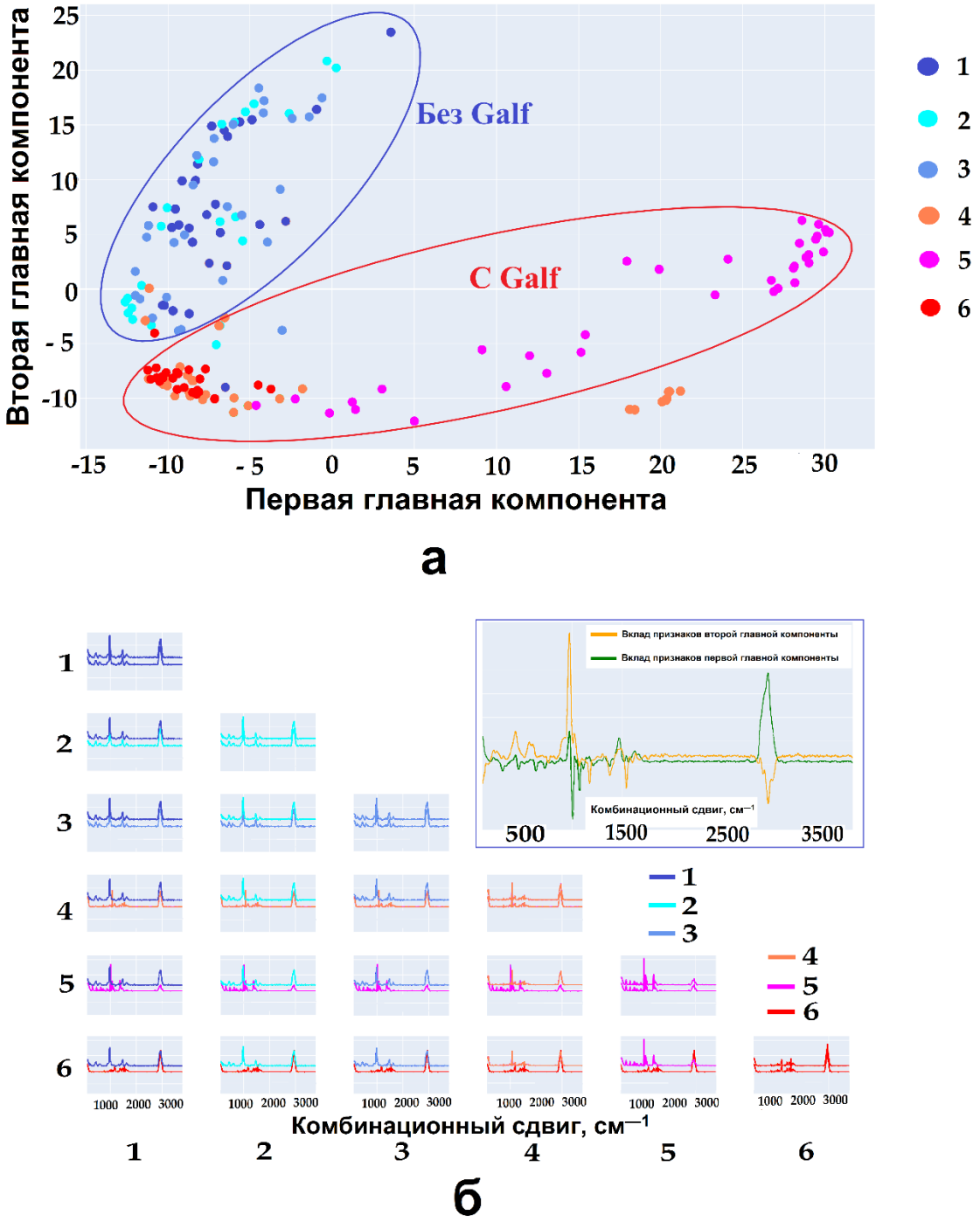

Рисунок 5.2 – (а) Проекции ГКР-спектров олигосахаридов на оси первых двух главных компонент PCA. (б) Сравнение дисперсии, зафиксированной в главных компонентах для каждой пары аналитов. На вставке показаны нагрузки для первой (обозначена зеленым цветом) и второй (обозначена желтым цветом) компоненты, рассчитанные для усредненных спектров олигосахаридов с и без Galf

Показано, что основные различия связаны с наличием или отсутствием отдельных полос, характерных для конкретных соединений. Эти признаки вносят наибольший вклад в первые главные компоненты и являются определяющими при разделении образцов на классы.

Анализ попарных сравнений выявил следующие закономерности: образцы первой группы (1–3) демонстрируют сходные спектральные профили с минимальными различиями, локализованными в областях общих полос. В то же время образцы второй группы (4–6) характеризуются выраженными спектральными отличиями, что указывает на существенное влияние данного фрагмента на колебательные характеристики. При сравнении двух групп образцов основные нагрузки локализуются в следующих спектральных областях: 970–980, 995–1017, 1060–1080, 1367–1380, 2860–3000 $см^{-1}$.

Таким образом, результаты PCA подтверждают наличие устойчивых различий между группами и обосновывают использование выбранных спектральных признаков для дальнейшей классификации. Обнаруженные информативные области спектра требуют дополнительной интерпретации, которая будет проведена с использованием альтернативных методов анализа.

Для подтверждения различий между спектрами анализируемых веществ применяли подход оценки 95%-ных доверительных интервалов интенсивности в выбранных колебательных полосах с использованием бутстрэппинга. Это позволило провести попарное сравнение всех образцов в спектральных областях, предварительно выделенных PCA.

На Рисунке 5.3 показана матрица сравнения, отражающая степень перекрытия доверительных интервалов для каждой пары образцов. Установлено, что олигосахариды без остатка Galf характеризуются высоким перекрытием, что свидетельствует о сходстве их спектральных профилей. В то же время для соединений, содержащих Galf, наблюдается существенно меньшее перекрытие как

между образцами, так и внутри группы, что указывает на выраженные структурные различия и специфические спектральные особенности, обусловленные присутствием данного фрагмента.

Рисунок 5.3 – Матрица сравнения образцов. Значения в каждой ячейке представляют собой процент статистически значимого перекрытия доверительных интервалов для всех проанализированных колебательных полос для каждой пары образцов

Полосы, для которых доверительные интервалы не перекрываются, приведены в Таблице 5.1 и соответствуют ряду характерных частот 140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1110, 1072, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941 и 2944 $см^{-1}$, определяющих различие между группами. Эти полосы могут рассматриваться как информативные признаки для модельной классификации исследуемых синтетических олигосахаридов.

Таблица 5.1 – Результаты анализа различий между колебательными полосами при попарном сравнении образцов.

Образец	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
	Колебательные полосы, $см^{-1}$				
1	140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941	140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1110, 1174, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944	140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944	140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944	1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944
2		140, 1012, 1016, 1110, 1174, 1375, 1538, 2941, 2944, 1461	140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1538, 2894, 2941, 2944	140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944	140, 311, 468, 637, 1012, 1068, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944, 1016
3			140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1538, 2894, 2941, 2944	140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944	140, 311, 468, 637, 1110, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2944
4				311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944	140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944
5					140, 311, 468, 637, 1012, 1016, 1068, 1072, 1110, 1174, 1375, 1461, 1469, 1538, 2894, 2941, 2944

На следующем этапе для построения классификационной модели использована логистическая регрессия с L1-регуляризацией, обеспечивающей одновременную классификацию и отбор наиболее информативных признаков. Применение L1-регуляризации приводит к занулению части коэффициентов модели, что позволяет выделить ограниченный набор спектральных переменных, вносящих наибольший вклад в разделение классов, и тем самым повысить интерпретируемость результатов.

Оптимизация параметра регуляризации C, определяющего баланс между точностью аппроксимации и степенью разреженности модели, проводилась методом перекрёстной проверки в широком диапазоне значений (10^{-6}–10^{6}). Малые значения C соответствуют более жёсткой регуляризации и приводят к отбору минимального числа признаков, тогда как большие значения ослабляют регуляризацию, увеличивая число учитываемых спектральных переменных, но одновременно повышая риск переобучения.

Для каждого значения параметра C последовательно выполнялись обучение модели на обучающей выборке и её тестирование на валидационных подвыборках. При этом оценивались не только стандартные метрики качества классификации, но и количество ненулевых коэффициентов, характеризующее сложность модели, а также степень соответствия выбранных признаков ранее выявленным информативным спектральным полосам, полученным с использованием PCA и анализа доверительных интервалов.

Такой подход позволил не только подобрать оптимальные параметры модели с точки зрения точности, но и обеспечить физико-химическую обоснованность результатов, поскольку предпочтение отдавалось решениям, в которых отобранные признаки соответствуют реальным колебательным модам, а не случайным шумовым вариациям спектра.

Результаты (см. Рисунок 5.4) демонстрируют зависимость точности модели от параметра C и количества итераций обучения. Установлено, что значение C ≈ 0,11

обеспечивает оптимальный баланс: достигается высокая точность классификации при отборе признаков, совпадающих с физически значимыми спектральными полосами, а не с шумом.

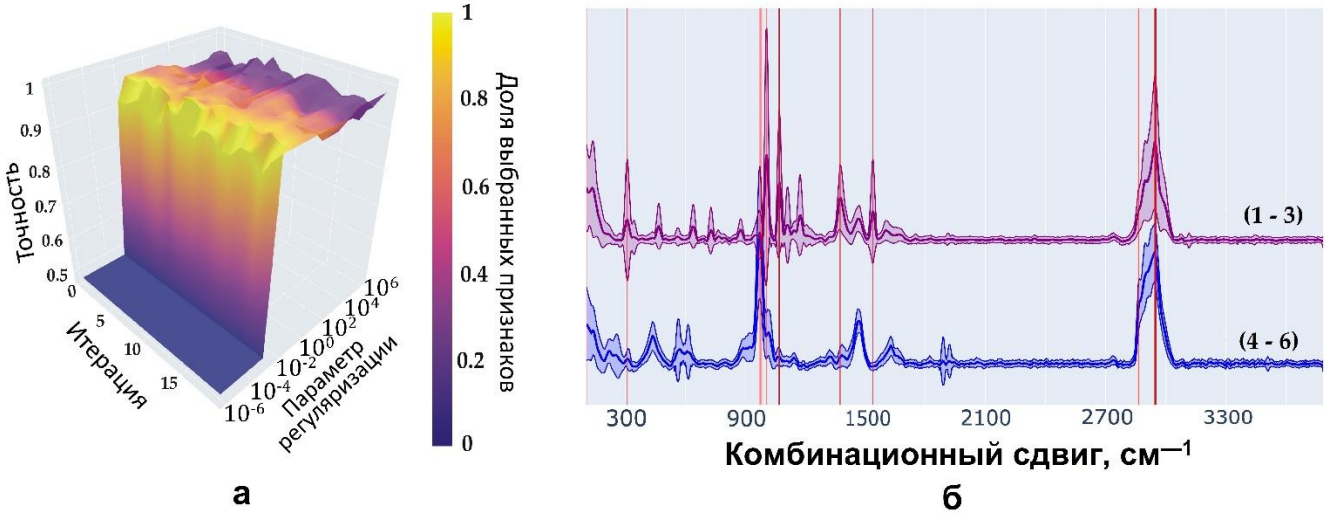

Рисунок 5.4 – (а) График зависимости точности классификации от итерации и параметра L1-регуляризации. Коэффициент регуляризации C по оси X, по оси Y — количество итераций перекрестной проверки с различными разбиениями данных. Высота поверхности отражает точность классификации в зависимости от значений C и количества итераций, цветовой градиент представляет собой долю выбранных признаков, совпадающих с ранее идентифицированными. (б) Усредненные спектры после предварительной обработки для каждой группы со стандартным отклонением и наиболее значимые колебательные полосы (красные вертикальные линии), идентифицированные в ходе вычислительного эксперимента, как ключевые отличия между олигосахаридами с и без Galf

После определения наиболее оптимизированного параметра регуляризации C были определены ключевые особенности, которые отличают спектры анализируемых групп образцов, как показано на Рисунке 5.5. Идентифицированные полосы (306, 973, 982, 1007, 1068, 1371, 1539, 2867, 2945 $см^{-1}$) демонстрируют надежность модели в эффективном различении олигосахаридов с Galf и без Galf. Хотя их меньше, чем

полос, идентифицированных с помощью PCA, эти выбранные полосы точно соответствуют друг другу по частоте колебаний.

Такое сокращение количества признаков стало возможным благодаря точной настройке параметров регуляризации и акценту на сохранении физической и химической интерпретации выделенных колебательных полос.

Стоит обратить особое внимание на колебания в частотном диапазоне 1371–1375 $см^{-1}$, которые, согласно Рисунку 5.1, наблюдаются только для Galf-содержащих образцов. Также полоса 1371 $см^{-1}$ была определена методом LR-L1. Поскольку такой набор олигосахаридов исследован с помощью спектроскопии КР/ГКР впервые, детальная расшифровка колебательных полос представляется на данном этапе затруднительной. Нет полноценных данных, на которые можно было бы сослаться при сопоставлении определенных в эксперименте колебаний со структурными особенностями исследуемых веществ. Однако, можно предположить, что данный частотный диапазон характерен для колебаний фуранозного (пятичленного) кольца Galf, в отличие от пиранозного (шестичленного) кольца образцов без Galf.

Используя выбранный параметр регуляризации $C \approx 0{,}11$ из графика поверхности на рисунке 5.4, была построена оптимальная модель LR для классификации двух групп: олигосахаридов с остатком Galf и без него. В Таблице 5.2 представлены показатели классификации, которые указывают на высокую точность полученной модели.

Таблица 5.2 – Метрики классификации

	Специфичность (Precision)	Чувствительность (Recall)	F1-Мера (F1-Score)	Объем выборки (Quantity)
Образцы 1 – 3	0.97	0.97	0.97	33
Образцы 4 – 6	0.97	0.97	0.97	31
Точность (Accuracy)	0.97			64

Согласно метрикам, представленным в Таблице 5.2, все показатели продемонстрировали высокие результаты. Значения специфичности, чувствительности и F1-Меры для обеих групп составляют 97%. Высокие и сбалансированные значения метрик для обеих групп свидетельствуют об отсутствии систематического смещения модели. Важно отметить, что достижение высоких показателей одновременно по специфичности и чувствительности критично для диагностических приложений: необходима как корректная идентификация истинно положительных случаев, так и истинно отрицательных. В то же время общая точность также высока, что показывает, что предложенная математическая модель эффективно отличает олигосахариды с остатком Galf от олигосахаридов без него.

Так, анализ на базе метода ГКР-спектроскопии на наноструктурированных серебряных планарных подложках с применением методов математической обработки спектральных данных показал свою применимость для регистрации предельно низких концентраций олигосахаридов – маркеров грибковых и бактериальных инфекций. Построенная вычислительная модель продемонстрировала 97% точность при разделении групп олигосахаридов, содержащих и не содержащих Galf остаток.

Заключение

В ходе выполнения работы были достигнуты следующие значимые результаты:

1. Предложен универсальный способ определения высоты измерительного цилиндра конфокального микроскопа и эффективной высоты локализации ГКР-усиления планарных подложек на основе методики Z-сканирования с использованием кремния и газообразного азота воздуха в качестве аналита. Разработана модель для корректной интерпретации регистрируемых профилей Z-сканов. Показано, что на наноструктурированных самоорганизованных серебряных ГКР-подложках, сформированных методом электронно-лучевого напыления в вакууме, эффективная высота локализации ГКР-усиления составляет 140±10 нм, что значительно превышает существующие теоретические (до 10 нм) и экспериментальные (до 60 нм) данные.

2. Впервые показана возможность получения белковых кристаллов при воздействии расфокусированным непрерывным лазерным пучком 785 нм на каплю водного раствора миоглобина низкой концентрации (1 мкг/мл и 10 нг/мл). Обнаружено, что концентрация белка в растворе влияет на форму получаемых кристаллических объектов: при концентрации миоглобина в растворе 1 мкг/мл под действием лазера формируются ограненные кристаллы, с понижением концентрации до 10 нг/мл происходит формирование кристаллических точек.

3. Показано, что воздействие высоко- и низкочастотного ультразвука на водный раствор миоглобина в низкой концентрации (1 мкг/мл) приводит к изменению конформации белковых молекул и появлению 4-х типов спектров, один из которых характеризуется усиленной полосой 996 $см^{-1}$. Обнаружена связь формы и распределения типов спектров с морфологией используемой в эксперименте ГКР-подложкой.

4. Впервые проведен ГКР-анализ синтетических олигосахаридов с галактофуранозным остатком, которые являются маркерами бактериальных и грибковых инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, *E. faecalis* и *A. fumigatus*, в

клинически значимой концентрации 100 пг/мл. Предложен набор методов машинного обучения (PCA, бутстрэп, логистическая регрессия с L1-регуляризацией), позволяющий классифицировать спектры олигосахаридных миметиков, содержащих и не содержащих галактофуранозный остаток, с точностью 97%.

Работа показывает, что воспроизводимость и чувствительность ГКР-анализа биомолекул можно повышать не одним параметром, а согласованием трех аспектов: морфологии ГКР-подложки, пробоподготовки аналита и статистической обработки спектральных данных.

Основные публикации по теме диссертации

Список статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus, Web of Science и Белом списке:

1. Irina A. Boginskaya, Ekaterina A. Slipchenko, Marina V. Sedova, **Julia Yu. Zvyagina**, Alexander D. Maximov, Aleksandr S. Baburin, Ilya A. Rodionov, Alexander M. Merzlikin, Ilya A. Ryzhikov and Andrey N. Lagarkov. Additional Enhancement of Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Myoglobin Precipitated under Action of Laser Irradiation on Self-Assembled Nanostructured Surface of Ag Films // *Chemosensors* – 2023 – V. 11(6) – P. 321 (SJR 0.605; Q2; K2, Белый список)

2. Konstantin A. Vereshchagin, Ekaterina A. Slipchenko, Irina A. Boginskaya, **Julia Yu. Zvyagina**, Konstantin N. Afanasev, Dmitriy A. Dikikh, Marina V. Sedova, Ilya A. Ryzhikov, Alexander M. Merzlikin. Extraordinary SERS on nanostructured self-assembled silver films due to preliminary random nano-profiling of substrate and ultrasonic exposure of analyte during the deposition // *Spectrochim. Acta A* – 2024 – V. 329 – P. 125629 (SJR 0.683; Q1; K1, Белый список)

3. Konstantin Vereshchagin, Ekaterina Slipchenko, Konstantin Afanasev, **Julia Zvyagina**, Victor Polozov, Andrey Naboko, Marina Sedova, Irina Boginskaya, Ilya Ryzhikov, Alexander Merzlikin. Confocal Raman Microscopic Study of the SERS-Effect Spatial Localization Over Nanostructured Self-Assembled Silver Films // *Journal of Raman Spectroscopy* – 2025 – V. 56 – P. 673-685; doi.org/10.1002/jrs.6818\; (SJR 0.439; Q3; K1, Белый список)

4. **Zvyagina J.Y.**, Safiullin R.R., Boginskaya I.A., Slipchenko E.A., Afanas‘ev K.N., Sedova M.V., Krylov V.B., Yashunsky D.V., Argunov D.A., Nifantiev N.E., Ryzhikov I. A., Merzlikin A. M., & Lagarkov A. N. Selective Detection of Fungal and Bacterial Glycans with Galactofuranose (Galf) Residues by Surface-Enhanced Raman Scattering and Machine Learning Methods // *Int. J. Mol. Sci.* – 2025 – V. 26 – P. 4218 (SJR 1.316; Q1; K1, Белый список)

Тезисы докладов в сборниках конференций, индексируемых в РИНЦ:

1. **Ю.Ю. Звягина**, Р.Р. Сафиуллин, И.А. Богинская, Е.А. Слипченко, К.Н. Афанасьев, М.В. Седова, И.А. Рыжиков, А.М. Мерзликин. Спектроскопия ГКР как метод селективного определения грибковых и бактериальных гликанов / Труды 67-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 31 марта–5 апреля 2025 г.

2. **Ю.Ю. Звягина**, К.А. Верещагин, Е.А. Слипченко, К.Н. Афанасьев, И.А. Богинская, И.А. Рыжиков, А.М. Мерзликин. «Определение локализации эффекта ГКР на наноструктурированных самоорганизованных плёнках серебра на примере азота воздуха» / Российская конференция по комбинационному рассеянию света – 8-й Сибирский семинар по спектроскопии комбинационного рассеяния света – Школа молодых ученых по актуальным проблемам комбинационного рассеяния света. Тезисы докладов / Редактор – А.Н. Втюрин. Красноярск: Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН, 2025.

Публикации по смежной тематике:

1. S.D.Varfolomeev, V.Švedas, E.N.Efremenko, A.M.Egorov, M.G.Khrenova, V.I.Tishkov, D.L.Atroshenko, A.A.Pometun, S.S.Savin, N.N.Ugarova, G.Yu.Lomakina, I.V.Gachok, I.V.Lyagin, V.I.Muronetz, A.P.Sinitsyn, O.A.Sinitsyna, A.M.Rojhkova, G.F.Makhaeva, S.O.Bachurin, O.I.Lavrik, D.O.Zharkov, A.V.Yudkina, O.M.Panasenko, A.A.Baykov, P.Masson, T.N.Pashirova, Z.M.Shaihutdinova, E.V.Popova, V.E.Tikhomirova, O.A.Kost, E.V.Kudryashova, N.V.Dobryakova, N.L.Klyachko, M.M.Veselov, A.V.Lopukhov, I.M.Le-Deygen, A.D.Usvaliev, I.V.Chudosai, N.L.Eremeev, M.I.Zvereva, M.Yu.Rubtsova, M.M.Ulyashova, G.V.Presnova, L.V.Sigolaeva, D.V.Pergushov, I.N.Kurochkin, E.G.Evtushenko, I.A.Boginskaya, **J.Yu.Zvyagina**, E.A.Slipchenko, O.V.Kryukova, M.V.Sedova, I.A.Ryzhikov, V.V.Shumyantseva, P.I.Koroleva, T.V.Bulko, L.E.Agafonova, R.A.Masamrekh, T.A.Filippova, A.V.Kuzikov, A.P.Savitsky, M.O.Shleeva, I.D.Solovyev, N.K.Marynich. Biocatalysis: modern problems

and applications // *Russ. Chem. Rev.* – **2024** – V. 93(12) – P. RCR5144; doi.org/10.59761/RCR5144; **Q1**

2. **Ю.Ю. Звягина**, Д.И. Суров, К.А. Маилян, А.В. Киселев, К.Н. Афанасьев, А.В. Гусев, И.А. Богинская, М.В. Седова, И.А. Рыжиков. Технология осаждения из газовой фазы нанокомпозитов на основе ПХПК-AG для формирования ГКР-подложек // Современная электродинамика – **2025** – Т. 3 – №2(16) – С. 4-20; doi.org/10.24412/2949-0553-2025-216-04-20.

3. **Ю.Ю. Звягина**, И.А. Богинская, М.В. Седова, К.Н. Афанасьев, И.А. Рыжиков. Исследование взаимодействия человеческого сывороточного альбумина с поверхностью ГКР-активной наноструктурированной золотой подложки // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции Биокатализ, фундаментальные исследования и применения (2023).

4. **Ю.Ю. Звягина**, И.А. Богинская, Е.А. Слипченко, А.С. Набоко, М.В. Седова, К.Н. Афанасьев, И.А. Рыжиков. Управление эффективностью ГКР анализа высокомолекулярных белковых аналитов на золотых ГКР активных подложках // Тезисы докладов 2-ой Научно-практической конференции Клиническая диагностика и Персонализированная медицина. Центр Событий РБК. Москва (2024).

5. **Ю.Ю. Звягина**, Д.И. Суров. Метод формирования ГКР подложек ПХПК-Ag из газовой фазы для регистрации биологически значимых аналитов //Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2025».

Список литературы

1. Wang Y., Bednarcik M., Ament C., Cheever M.L., Cummings S., Geng T., Gunasekara D.B., Houston N., Kouba K., Liu Z., Shippar J. Immunoassays and Mass Spectrometry for Determination of Protein Concentrations in Genetically Modified Crops // J. Agric. Food Chem.– 2024.– P. acs.jafc.3c09188.

2. Ge K., Hu Y., Li G. Recent Progress on Solid Substrates for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Analysis // Biosensors.– 2022.– Vol. 12, № 11.

3. Liu A., Gao C., Xue J., Xie Y., Miao X., Chen T., Wu A., Lin J. Toward reproducible SERS biosensing: analysing instability origins and mitigation approaches from sample preparation to detection // J. Mater. Chem. B.– 2026.– Vol. 14, № 10.– P. 3071–3092.

4. Yang X., Jiang T., Liu L., Zhao X., Yu X., Yang M., Liu G., Luo Q. Observing single cells in whole organs with optical imaging // J. Innov. Opt. Health Sci.– 2023.– Vol. 16, № 01.– P. 2330002.

5. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I.U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues // Applied Spectroscopy Reviews.– 2007.– Vol. 42, № 5.– P. 493–541.

6. Cho Y.C., Ahn S.I. Fabricating a Raman spectrometer using an optical pickup unit and pulsed power // Sci Rep.– 2020.– Vol. 10, № 1.– P. 11692.

7. Smith E., Dent G. Modern raman spectroscopy: a practical approach. Reprinted.– Chichester: Wiley, 2008.– 210 p.

8. Penney C.M., Goldman L.M., Lapp M. Raman Scattering Cross Sections // Nature Physical Science.– 1972.– Vol. 235, № 58.– P. 110–112.

9. Kneipp K. Surface-enhanced Raman scattering // Physics Today.– 2007.– Vol. 60, № 11.– P. 40–46.

10. Le Ru E.C., Etchegoin P.G. Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy: and related plasmonic effects. 1st ed.– Amsterdam Boston: Elsevier, 2009.

11. Stone M.J., Waterman M.R., Harimoto D., Murray G., Willson N., Platt M.R., Blomqvist G., Willerson J.T. Serum myoglobin level as diagnostic test in patients with acute myocardial infarction. // Heart.– 1977.– Vol. 39, № 4.– P. 375–380.

12. Oldberg K., Stenmark J., Hammarström H. β-D-Glucan Testing in Candidemia: Determinants of Positivity and Association With Mortality // Mycoses.– 2025.– Vol. 68, № 5.– P. e70067.

13. Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode // Chemical Physics Letters.– 1974.– Vol. 26, № 2.– P. 163–166.

14. Jeanmaire D.L., Van Duyne R.P. Surface raman spectroelectrochemistry // Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry.– 1977.– Vol. 84, № 1.– P. 1–20.

15. Albrecht M.G., Creighton J.A. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode // J. Am. Chem. Soc.– 1977.– Vol. 99, № 15.– P. 5215–5217.

16. Palik E.D., Palik E.D. Handbook of Optical Constants of Solids. 1. Aufl.– s.l.: Elsevier professional, 1997.– 31569 p.

17. Maher R.C. SERS Hot Spots // Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization / ed. Kumar C.S.S.R.– Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012.– P. 215–260.

18. Le Ru E.C., Etchegoin P.G. SERS enhancement factors and related topics // Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy.– Elsevier, 2009.– P. 185–264.

19. Lee H.K., Lee Y.H., Koh C.S.L., Phan-Quang G.C., Han X., Lay C.L., Sim H.Y.F., Kao Y.-C., An Q., Ling X.Y. Designing surface-enhanced Raman scattering (SERS) platforms beyond hotspot engineering: emerging opportunities in analyte manipulations and hybrid materials // Chem. Soc. Rev.– 2019.– Vol. 48, № 3.– P. 731–756.

20. Kneipp K. Chemical Contribution to SERS Enhancement: An Experimental Study on a Series of Polymethine Dyes on Silver Nanoaggregates // J. Phys. Chem. C.– 2016.– Vol. 120, № 37.– P. 21076–21081.

21. Jensen L., Aikens C.M., Schatz G.C. Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering // Chem. Soc. Rev.– 2008.– Vol. 37, № 5.– P. 1061.

22. Chaudhry I., Hu G., Ye H., Jensen L. Toward Modeling the Complexity of the Chemical Mechanism in SERS // ACS Nano.– 2024.– Vol. 18, № 32.– P. 20835–20850.

23. Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I., Dasari R.R., Feld M.S. Surface-enhanced Raman scattering and biophysics // J. Phys.: Condens. Matter.– 2002.– Vol. 14, № 18.– P. R597–R624.

24. Bell S.E.J., Charron G., Cortés E., Kneipp J., De La Chapelle M.L., Langer J., Procházka M., Tran V., Schlücker S. Towards Reliable and Quantitative Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS): From Key Parameters to Good Analytical Practice // Angew Chem Int Ed.– 2020.– Vol. 59, № 14.– P. 5454–5462.

25. Kneipp K., Wang Y., Kneipp H., Perelman L.T., Itzkan I., Dasari R.R., Feld M.S. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) // Phys. Rev. Lett.– 1997.– Vol. 78, № 9.– P. 1667–1670.

26. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // Discuss. Faraday Soc.– 1951.– Vol. 11.– P. 55.

27. Munro C.H., Smith W.E., Garner M., Clarkson J., White P.C. Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering // Langmuir.– 1995.– Vol. 11, № 10.– P. 3712–3720.

28. Rivas L., Sanchez-Cortes S., García-Ramos J.V., Morcillo G. Mixed Silver/Gold Colloids: A Study of Their Formation, Morphology, and Surface-Enhanced Raman Activity // Langmuir.– 2000.– Vol. 16, № 25.– P. 9722–9728.

29. Nguyen D.T., Kim D.-J., So M.G., Kim K.-S. Experimental measurements of gold nanoparticle nucleation and growth by citrate reduction of HAuCl4 // Advanced Powder Technology.– 2010.– Vol. 21, № 2.– P. 111–118.

30. Ojea-Jiménez I., Campanera J.M. Molecular Modeling of the Reduction Mechanism in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles // J. Phys. Chem. C.– 2012.– Vol. 116, № 44.– P. 23682–23691.

31. Lee P.C., Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols // J. Phys. Chem.– 1982.– Vol. 86, № 17.– P. 3391–3395.

32. Rivas L., Sanchez-Cortes S., García-Ramos J.V., Morcillo G. Growth of Silver Colloidal Particles Obtained by Citrate Reduction To Increase the Raman Enhancement Factor // Langmuir.– 2001.– Vol. 17, № 3.– P. 574–577.

33. Dong B., Xue N., Mu G., Wang M., Xiao Z., Dai L., Wang Z., Huang D., Qian H., Chen W. Synthesis of monodisperse spherical AgNPs by ultrasound-intensified Lee-Meisel method, and quick evaluation via machine learning // Ultrasonics Sonochemistry.– 2021.– Vol. 73.– P. 105485.

34. Leopold N., Lendl B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride // J. Phys. Chem. B.– 2003.– Vol. 107, № 24.– P. 5723–5727.

35. Novotny J., Brezinova L., Pavelka V., Tycova A. Streamlined Fabrication and Acoustofluidic Purification of Silver-Decorated Polystyrene Microspheres (PS-AgNPs) for SERS Applications // ACS Appl. Nano Mater.– 2026.– Vol. 9, № 1.– P. 721–732.

36. Wang M., Li D., Duan Y., Lin Q., Cao Y., Yi H., Zhang J., Deng S., Hu R., Zhu S., Jiang Y., Xu Q., Feng S., Chen Y. Serum SERS Analysis Reveals Amino Acid- and Protein-Associated Vibrational Features for Subtype Identification in Acute Lymphoblastic Leukemia // Anal. Chem.– 2025.– Vol. 97, № 37.– P. 20453–20465.

37. Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio // Chem. Commun.– 2001.– № 7.– P. 617–618.

38. Mokari T., Rothenberg E., Popov I., Costi R., Banin U. Selective Growth of Metal Tips onto Semiconductor Quantum Rods and Tetrapods // Science.– 2004.– Vol. 304, № 5678.– P. 1787–1790.

39. Zheng G., Bao Z., Pérez-Juste J., Du R., Liu W., Dai J., Zhang W., Lee L.Y.S., Wong K. Tuning the Morphology and Chiroptical Properties of Discrete Gold Nanorods with Amino Acids // Angew Chem Int Ed.– 2018.– Vol. 57, № 50.– P. 16452–16457.

40. Xia Y., Xia X., Peng H.-C. Shape-Controlled Synthesis of Colloidal Metal Nanocrystals: Thermodynamic versus Kinetic Products // J. Am. Chem. Soc.– 2015.– Vol. 137, № 25.– P. 7947–7966.

41. Vigderman L., Zubarev E.R. Starfruit-Shaped Gold Nanorods and Nanowires: Synthesis and SERS Characterization // Langmuir.– 2012.– Vol. 28, № 24.– P. 9034–9040.

42. Balasubramanian S., Sheelam A., Ramanujam K., Dhamodharan R. Green, Seed-Mediated Synthesis of Au Nanowires and Their Efficient Electrocatalytic Activity in Oxygen Reduction Reaction // ACS Appl. Mater. Interfaces.– 2017.– Vol. 9, № 34.– P. 28876–28886.

43. Wang Y., Liu Y., Wu Q., Fu R., Liu H., Cui Y., Zhao Q., Chen A., Zhang Y., Jiao B., He Y. Seed-mediated in situ growth of photothermal reagent gold nanostars: Mechanism study and preliminary assay application // Analytica Chimica Acta.– 2022.– Vol. 1231.– P. 340424.

44. Haber J., Sokolov K. Synthesis of Stable Citrate-Capped Silver Nanoprisms // Langmuir.– 2017.– Vol. 33, № 40.– P. 10525–10530.

45. Wang R., Yao Y., Shen M., Wang X. Green synthesis of Au@Ag nanostructures through a seed-mediated method and their application in SERS // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.– 2016.– Vol. 492.– P. 263–272.

46. Wang C., Rong Z., Wang J., Jiang N., Pang Y., Xiao R., Wang S. Seed-mediated synthesis of high-performance silver-coated magnetic nanoparticles and their use as effective SERS substrates // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.– 2016.– Vol. 506.– P. 393–401.

47. Kumar-Krishnan S., Estevez-González M., Pérez R., Esparza R., Meyyappan M. A general seed-mediated approach to the synthesis of AgM (M = Au, Pt, and Pd) core–shell nanoplates and their SERS properties // RSC Adv.– 2017.– Vol. 7, № 44.– P. 27170–27176.

48. Herrera G., Padilla A., Hernandez-Rivera S. Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Studies of Gold and Silver Nanoparticles Prepared by Laser Ablation // Nanomaterials.– 2013.– Vol. 3, № 1.– P. 158–172.

49. Fazio E., Gökce B., De Giacomo A., Meneghetti M., Compagnini G., Tommasini M., Waag F., Lucotti A., Zanchi C.G., Ossi P.M., Dell'Aglio M., D'Urso L., Condorelli M., Scardaci V., Biscaglia F., Litti L., Gobbo M., Gallo G., Santoro M., Trusso S., Neri F. Nanoparticles Engineering by Pulsed Laser Ablation in Liquids: Concepts and Applications // Nanomaterials.– 2020.– Vol. 10, № 11.– P. 2317.

50. Tien D.-C., Tseng K.-H., Liao C.-Y., Huang J.-C., Tsung T.-T. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method // Journal of Alloys and Compounds.– 2008.– Vol. 463, № 1–2.– P. 408–411.

51. Siegel J., Kvítek O., Ulbrich P., Kolská Z., Slepička P., Švorčík V. Progressive approach for metal nanoparticle synthesis // Materials Letters.– 2012.– Vol. 89.– P. 47–50.

52. Israelsen N.D., Hanson C., Vargis E. Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor: An Introduction // The Scientific World Journal / ed. Zhao X.-F.– 2015.– Vol. 2015, № 1.– P. 124582.

53. Ramirez-Perez J.C., A. Reis T., Olivera C.L.P., Rizzutto M.A. Impact of silver nanoparticles size on SERS for detection and identification of filamentous fungi //

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.– 2022.– Vol. 272.– P. 120980.

54. McLellan J.M., Siekkinen A., Chen J., Xia Y. Comparison of the surface-enhanced Raman scattering on sharp and truncated silver nanocubes // Chemical Physics Letters.– 2006.– Vol. 427, № 1–3.– P. 122–126.

55. Moskovits M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective // J Raman Spectroscopy.– 2005.– Vol. 36, № 6–7.– P. 485–496.

56. Njoki P.N., Lim I.-I.S., Mott D., Park H.-Y., Khan B., Mishra S., Sujakumar R., Luo J., Zhong C.-J. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles // J. Phys. Chem. C.– 2007.– Vol. 111, № 40.– P. 14664–14669.

57. Liu X., Wang X., Zha L., Lin D., Yang J., Zhou J., Zhang L. Temperature- and pH-tunable plasmonic properties and SERS efficiency of the silver nanoparticles within the dual stimuli-responsive microgels // J. Mater. Chem. C.– 2014.– Vol. 2, № 35.– P. 7326–7335.

58. Alvarez-Puebla R.A., Arceo E., Goulet P.J.G., Garrido J.J., Aroca R.F. Role of Nanoparticle Surface Charge in Surface-Enhanced Raman Scattering // J. Phys. Chem. B.– 2005.– Vol. 109, № 9.– P. 3787–3792.

59. Braun G.B., Lee S.J., Laurence T., Fera N., Fabris L., Bazan G.C., Moskovits M., Reich N.O. Generalized Approach to SERS-Active Nanomaterials via Controlled Nanoparticle Linking, Polymer Encapsulation, and Small-Molecule Infusion // J. Phys. Chem. C.– 2009.– Vol. 113, № 31.– P. 13622–13629.

60. Yaffe N.R., Blanch E.W. Effects and anomalies that can occur in SERS spectra of biological molecules when using a wide range of aggregating agents for hydroxylamine-reduced and citrate-reduced silver colloids // Vibrational Spectroscopy.– 2008.– Vol. 48, № 2.– P. 196–201.

61. Mhlanga N., Domfe T., Skepu A. Fabrication of surface enhanced Raman spectroscopy substrates on solid supports // Applied Surface Science.– 2019.– Vol. 476.– P. 1108–1117.

62. Zhu A., Ali S., Xu Y., Ouyang Q., Wang Z., Chen Q. SERS-based Au@Ag NPs Solid-phase substrate combined with chemometrics for rapid discrimination of multiple foodborne pathogens // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.– 2022.– Vol. 270.– P. 120814.

63. Abdelsalam M.E., Bartlett P.N., Baumberg J.J., Cintra S., Kelf T.A., Russell A.E. Electrochemical SERS at a structured gold surface // Electrochemistry Communications.– 2005.– Vol. 7, № 7.– P. 740–744.

64. Zhang R., Lai Y., Zhan J. Enhancing the Activity of Silver Nanowire Membranes by Electrochemical Cyclic Voltammetry as Highly Sensitive Flexible SERS Substrate for On-Site Analysis // Nanomaterials.– 2021.– Vol. 11, № 3.– P. 672.

65. Chin-Heng L., Chun-Hung T., Ding-Zheng L. Optimization of physical vapor deposition process for low background nanoimprinted SERS substrate in quantitative melamine analysis // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.– 2024.– Vol. 306.– P. 123563.

66. Theiss J., Pavaskar P., Echternach P.M., Muller R.E., Cronin S.B. Plasmonic Nanoparticle Arrays with Nanometer Separation for High-Performance SERS Substrates // Nano Lett.– 2010.– Vol. 10, № 8.– P. 2749–2754.

67. Huebner U., Schneidewind H., Cialla D., Weber K., Zeisberger M., Mattheis R., Moeller R., Popp J. Fabrication of regular patterned SERS arrays by electron beam lithography / ed. Popp J., Drexler W., Tuchin V.V., Matthews D.L.– Brussels, Belgium, 2010.– P. 771536.

68. Betz J.F., Yu W.W., Cheng Y., White I.M., Rubloff G.W. Simple SERS substrates: powerful, portable, and full of potential // Phys. Chem. Chem. Phys.– 2014.– Vol. 16, № 6.– P. 2224–2239.

69. Xu K., Zhang C., Zhou R., Ji R., Hong M. Hybrid micro/nano-structure formation by angular laser texturing of Si surface for surface enhanced Raman scattering // Opt. Express.– 2016.– Vol. 24, № 10.– P. 10352.

70. Fang C., Shapter J.G., Voelcker N.H., Ellis A.V. Electrochemically prepared nanoporous gold as a SERS substrate with high enhancement // RSC Adv.– 2014.– Vol. 4, № 37.– P. 19502–19506.

71. Yang S., Slotcavage D., Mai J.D., Guo F., Li S., Zhao Y., Lei Y., Cameron C.E., Huang T.J. Electrochemically created highly surface roughened Ag nanoplate arrays for SERS biosensing applications // J. Mater. Chem. C.– 2014.– Vol. 2, № 39.– P. 8350–8356.

72. Lai Y.-H., Kuo S.-C., Hsieh Y.-C., Tai Y.-C., Hung W.-H., Jeng U.-S. Electrochemically fabricated gold dendrites with underpotential deposited silver monolayers for a bimetallic SERS-active substrate // RSC Adv.– 2016.– Vol. 6, № 16.– P. 13185–13192.

73. Aghili M., Hogan B.T., Chamberland J.P., Barz D.P.J., Docoslis A. Electrochemically Deposited Silver Nanostructures on Reduced Graphene Oxide Aerogels as Sensitive SERS Substrates // ACS Omega.– 2025.– P. acsomega.5c02124.

74. Han E., Zhang M., Pan Y., Cai J. Electrochemical Self-Assembled Gold Nanoparticle SERS Substrate Coupled with Diazotization for Sensitive Detection of Nitrite // Materials.– 2022.– Vol. 15, № 8.– P. 2809.

75. Chen S., Liu B., Zhang X., Mo Y., Chen F., Shi H., Zhang W., Hu C., Chen J. Electrochemical fabrication of pyramid-shape silver microstructure as effective and reusable SERS substrate // Electrochimica Acta.– 2018.– Vol. 274.– P. 242–249.

76. Sauer G., Nickel U., Schneider S. Preparation of SERS-active silver film electrodes via electrocrystallization of silver // J. Raman Spectrosc.– 2000.– Vol. 31, № 5.– P. 359–363.

77. Suresh V., Ding L., Chew A.B., Yap F.L. Fabrication of Large-Area Flexible SERS Substrates by Nanoimprint Lithography // ACS Appl. Nano Mater.– 2018.– Vol. 1, № 2.– P. 886–893.

78. Li H., Liu G., Zhang Y., Hao L., Zou P., Xu Y., Ji M., Yu X., Li J., Ma Y., Ma L. Study of SERS activity of different gold nanostructures prepared by electron beam lithography // J Mater. Sci: Mater Eng.– 2024.– Vol. 19, № 1.– P. 44.

79. Hentschel M., Karst J., Giessen H. Tailored Optical Functionality by Combining Electron-Beam and Focused Gold-Ion Beam Lithography for Solid and Inverse Coupled Plasmonic Nanostructures // Advanced Optical Materials.– 2020.– Vol. 8, № 19.– P. 2000879.

80. Chen Z., Chen Z., Feng K., Zou S., Li H. Exploring SERS from two-dimensional symmetric gold array fabricated by double exposure laser interference lithography // Optics Communications.– 2022.– Vol. 514.– P. 128169.

81. Wu Z., Liu J., Wang Z., Chen L., Xu Y., Ma Z., Kong D., Luo D., Liu Y.J. Nanosphere Lithography-Enabled Hybrid Ag-Cu Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates with Enhanced Absorption of Excitation Light // Biosensors.– 2023.– Vol. 13, № 8.– P. 825.

82. Abu Hatab N.A., Oran J.M., Sepaniak M.J. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates Created *via* Electron Beam Lithography and Nanotransfer Printing // ACS Nano.– 2008.– Vol. 2, № 2.– P. 377–385.

83. Petti L., Capasso R., Rippa M., Pannico M., La Manna P., Peluso G., Calarco A., Bobeico E., Musto P. A plasmonic nanostructure fabricated by electron beam lithography as a sensitive and highly homogeneous SERS substrate for bio-sensing applications // Vibrational Spectroscopy.– 2016.– Vol. 82.– P. 22–30.

84. Cinel N.A., Cakmakyapan S., Butun S., Ertas G., Ozbay E. E-Beam lithography designed substrates for surface enhanced Raman spectroscopy // Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications.– 2015.– Vol. 15.– P. 109–115.

85. Yue W., Gong T., Long X., Kravets V., Gao P., Pu M., Wang C. Sensitive and reproducible surface-enhanced raman spectroscopy (SERS) with arrays of dimer-nanopillars // Sensors and Actuators B: Chemical.– 2020.– Vol. 322.– P. 128563.

86. Hatab N.A., Hsueh C.-H., Gaddis A.L., Retterer S.T., Li J.-H., Eres G., Zhang Z., Gu B. Free-Standing Optical Gold Bowtie Nanoantenna with Variable Gap Size for Enhanced Raman Spectroscopy // Nano Lett.– 2010.– Vol. 10, № 12.– P. 4952–4955.

87. Groves T.R. Electron beam lithography // Nanolithography.– Elsevier, 2014.– P. 80–115.

88. Hulteen J.C., Van Duyne R.P. Nanosphere lithography: A materials general fabrication process for periodic particle array surfaces // Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films.– 1995.– Vol. 13, № 3.– P. 1553–1558.

89. Ho C.-C., Zhao K., Lee T.-Y. Quasi-3D gold nanoring cavity arrays with high-density hot-spots for SERS applications via nanosphere lithography // Nanoscale.– 2014.– Vol. 6, № 15.– P. 8606–8611.

90. Masson J.-F., Murray-Méthot M.-P., Live L.S. Nanohole arrays in chemical analysis: manufacturing methods and applications // Analyst.– 2010.– Vol. 135, № 7.– P. 1483.

91. Saeed S., Eisa M.H., Zia A., Arshad K. Synergistic enhancement of SERS and superhydrophobicity on Si micropatterns fabricated with two-beam laser interference lithography // Results in Physics.– 2025.– Vol. 75.– P. 108365.

92. Liu R., Cao L., Liu D., Wang L., Saeed S., Wang Z. Laser Interference Lithography—A Method for the Fabrication of Controlled Periodic Structures // Nanomaterials.– 2023.– Vol. 13, № 12.– P. 1818.

93. Rodriguez A., Echeverría M., Ellman M., Perez N., Verevkin Y.K., Peng C.S., Berthou T., Wang Z., Ayerdi I., Savall J., Olaizola S.M. Laser interference lithography for nanoscale structuring of materials: From laboratory to industry // Microelectronic Engineering.– 2009.– Vol. 86, № 4–6.– P. 937–940.

94. Gisbert Quilis N., Lequeux M., Venugopalan P., Khan I., Knoll W., Boujday S., Lamy De La Chapelle M., Dostalek J. Tunable laser interference lithography preparation of plasmonic nanoparticle arrays tailored for SERS // Nanoscale.– 2018.– Vol. 10, № 21.– P. 10268–10276.

95. Makhlouf A.S.H. Current and advanced coating technologies for industrial applications // Nanocoatings and Ultra-Thin Films.– Elsevier, 2011.– P. 3–23.

96. Gromov D.G., Dubkov S.V., Savitskiy A.I., Shaman Yu.P., Polokhin A.A., Belogorokhov I.A., Trifonov A.Yu. Optimization of nanostructures based on Au, Ag, AuAg nanoparticles formed by thermal evaporation in vacuum for SERS applications // Applied Surface Science.– 2019.– Vol. 489.– P. 701–707.

97. Oh M.-K., Shin Y.-S., Lee C.-L., De R., Kang H., Yu N.E., Kim B.H., Kim J.H., Yang J.-K. Morphological and SERS Properties of Silver Nanorod Array Films Fabricated by Oblique Thermal Evaporation at Various Substrate Temperatures // Nanoscale Res Lett.– 2015.– Vol. 10, № 1.– P. 259.

98. Gromov D.G., Pavlova L.M., Savitskii A.I., Trifonov A.Yu. Investigation of the early stages of condensation of Ag and Au on the amorphous carbon surface during thermal evaporation under vacuum // Phys. Solid State.– 2015.– Vol. 57, № 1.– P. 173–180.

99. Liu Y.-J., Chu H.Y., Zhao Y.-P. Silver Nanorod Array Substrates Fabricated by Oblique Angle Deposition: Morphological, Optical, and SERS Characterizations // J. Phys. Chem. C.– 2010.– Vol. 114, № 18.– P. 8176–8183.

100. Boginskaya I., Sedova M., Baburin A., Afanas’ev K., Zverev A., Echeistov V., Ryzhkov V., Rodionov I., Tonanaiskii B., Ryzhikov I., Lagarkov A. SERS-Active Substrates Nanoengineering Based on e-Beam Evaporated Self-Assembled Silver Films // Applied Sciences.– 2019.– Vol. 9, № 19.– P. 3988.

101. Boginskaya I., Safiullin R., Tikhomirova V., Kryukova O., Nechaeva N., Bulaeva N., Golukhova E., Ryzhikov I., Kost O., Afanasev K., Kurochkin I. Human

Angiotensin I-Converting Enzyme Produced by Different Cells: Classification of the SERS Spectra with Linear Discriminant Analysis // Biomedicines.– 2022.– Vol. 10, № 6.– P. 1389.

102. Boginskaya I., Nechaeva N., Tikhomirova V., Kryukova O., Evdokimov V., Bulaeva N., Golukhova E., Ryzhikov I., Kost O., Afanasev K., Vereshchagin K., Kurochkin I. Human angiotensin I-converting enzyme study by surface-enhanced Raman spectroscopy // J Raman Spectroscopy.– 2021.– Vol. 52, № 9.– P. 1529–1539.

103. Slipchenko E.A., Boginskaya I.A., Safiullin R.R., Ryzhikov I.A., Sedova M.V., Afanasev K.N., Nechaeva N.L., Kurochkin I.N., Merzlikin A.M., Lagarkov A.N. SERS Sensor for Human Glycated Albumin Direct Assay Based on Machine Learning Methods // Chemosensors.– 2022.– Vol. 10, № 12.– P. 520.

104. Durmanov N.N., Guliev R.R., Eremenko A.V., Boginskaya I.A., Ryzhikov I.A., Trifonova E.A., Putlyaev E.V., Mukhin A.N., Kalnov S.L., Balandina M.V., Tkachuk A.P., Gushchin V.A., Sarychev A.K., Lagarkov A.N., Rodionov I.A., Gabidullin A.R., Kurochkin I.N. Non-labeled selective virus detection with novel SERS-active porous silver nanofilms fabricated by Electron Beam Physical Vapor Deposition // Sensors and Actuators B: Chemical.– 2018.– Vol. 257.– P. 37–47.

105. Kho K.W., Shen Z.X., Zeng H.C., Soo K.C., Olivo M. Deposition Method for Preparing SERS-Active Gold Nanoparticle Substrates // Anal. Chem.– 2005.– Vol. 77, № 22.– P. 7462–7471.

106. Bizzarri A.R., Cannistraro S. Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy Signals from Single Myoglobin Molecules // Appl Spectrosc.– 2002.– Vol. 56, № 12.– P. 1531–1537.

107. Frauenfelder H., Parak F., Young R.D. Conformational Substates in Proteins // Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.– 1988.– Vol. 17, № 1.– P. 451–479.

108. Puravankara V., Manjeri A., Kulkarni M.M., Kitahama Y., Goda K., Dwivedi P.K., George S.D. A Wettability Contrast SERS Droplet Assay for Multiplexed Analyte Detection // Anal. Chem.– 2024.– Vol. 96, № 22.– P. 9141–9150.

109. Brezestean I.A., Tosa N., Falamas A., Cuibus D., Muntean C.M., Bende A., Cozar B., Berghian-Grosan C., Farcău C. Silver Nanoparticle Films Obtained by Convective Self-Assembly for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Analyses of the Pesticides Thiabendazole and Endosulfan // Front. Chem.– 2022.– Vol. 10.– P. 915337.

110. Peksa V., Lebrušková P., Šípová H., Štěpánek J., Bok J., Homola J., Procházka M. Testing gold nanostructures fabricated by hole-mask colloidal lithography as potential substrates for SERS sensors: sensitivity, signal variability, and the aspect of adsorbate deposition // Phys. Chem. Chem. Phys.– 2016.– Vol. 18, № 29.– P. 19613–19620.

111. Xu B., Gonella G., DeLacy B.G., Dai H.-L. Adsorption of Anionic Thiols on Silver Nanoparticles // J. Phys. Chem. C.– 2015.– Vol. 119, № 10.– P. 5454–5461.

112. Porter L.A., Ji D., Westcott S.L., Graupe M., Czernuszewicz R.S., Halas N.J., Lee T.R. Gold and Silver Nanoparticles Functionalized by the Adsorption of Dialkyl Disulfides // Langmuir.– 1998.– Vol. 14, № 26.– P. 7378–7386.

113. Rong H.-T., Frey S., Yang Y.-J., Zharnikov M., Buck M., Wühn M., Wöll C., Helmchen G. On the Importance of the Headgroup Substrate Bond in Thiol Monolayers: A Study of Biphenyl-Based Thiols on Gold and Silver // Langmuir.– 2001.– Vol. 17, № 5.– P. 1582–1593.

114. Nechaeva N.L., Boginskaya I.A., Ivanov A.V., Sarychev A.K., Eremenko A.V., Ryzhikov I.A., Lagarkov A.N., Kurochkin I.N. Multiscale flaked silver SERS-substrate for glycated human albumin biosensing // Analytica Chimica Acta.– 2020.– Vol. 1100.– P. 250–257.

115. Morel A.-L., Volmant R.-M., Méthivier C., Krafft J.-M., Boujday S., Pradier C.-M. Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.– 2010.– Vol. 81, № 1.– P. 304–312.

116. Mondal R., Semwal S., Kumar P.L., Thampi S.P., Basavaraj M.G. Patterns in Drying Drops Dictated by Curvature-Driven Particle Transport // Langmuir.– 2018.– Vol. 34, № 38.– P. 11473–11483.

117. Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F., Huber G., Nagel S.R., Witten T.A. Publisher Correction: Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops // Nature.– 2021.– Vol. 592, № 7855.– P. E12–E12.

118. López-Castaños K.A., Méndez-Albores A., Quiroga-González E. SERS strategy for quantifying transparent dry analytes at ultra-low concentrations utilizing the coffee ring effect // Microchemical Journal.– 2025.– Vol. 215.– P. 114192.

119. Larson R.G. Re-Shaping the Coffee Ring // Angew Chem Int Ed.– 2012.– Vol. 51, № 11.– P. 2546–2548.

120. Larson R.G. Transport and deposition patterns in drying sessile droplets // AIChE Journal.– 2014.– Vol. 60, № 5.– P. 1538–1571.

121. Talbot E.L., Yow H.N., Yang L., Berson A., Biggs S.R., Bain C.D. Printing Small Dots from Large Drops // ACS Appl. Mater. Interfaces.– 2015.– Vol. 7, № 6.– P. 3782–3790.

122. Talbot E.L., Yang L., Berson A., Bain C.D. Control of the Particle Distribution in Inkjet Printing through an Evaporation-Driven Sol–Gel Transition // ACS Appl. Mater. Interfaces.– 2014.– Vol. 6, № 12.– P. 9572–9583.

123. Foucault R., Birke R.L., Lombardi J.R. SERS of Surfactants in Monolayer and Multibilayer Forms on an Electrified Ag Surface // Langmuir.– 2003.– Vol. 19, № 21.– P. 8818–8827.

124. Бабурин А.С., Богинская И.А., Курочкин И.Н., Родионов И.А., Рыжиков И.А., Седова М.В., Тонанайский Б.Д., Ушаков Н.Д. Исследование влияния ультразвука при осаждении миоглобина из растворов на активные ГКР-подложки // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Сер. Приборостроение.– 2018.– № 4.– P. 97–111.

125. Acharya B.S., George S.D., Abdul Salam A.A. Laser-Induced Crystallization of Standard Proteins on Ultra-Hydrophobic Surface and Characterization Using Raman Spectroscopy // J-BPE.– 2023.– P. 030312.

126. Korede V., Nagalingam N., Penha F.M., Van Der Linden N., Padding J.T., Hartkamp R., Eral H.B. A Review of Laser-Induced Crystallization from Solution // Crystal Growth & Design.– 2023.– Vol. 23, № 5.– P. 3873–3916.

127. Garetz B.A., Aber J.E., Goddard N.L., Young R.G., Myerson A.S. Nonphotochemical, Polarization-Dependent, Laser-Induced Nucleation in Supersaturated Aqueous Urea Solutions // Phys. Rev. Lett.– 1996.– Vol. 77, № 16.– P. 3475–3476.

128. Sun X., Garetz B.A., Myerson A.S. Polarization Switching of Crystal Structure in the Nonphotochemical Laser-Induced Nucleation of Supersaturated Aqueous L -Histidine // Crystal Growth & Design.– 2008.– Vol. 8, № 5.– P. 1720–1722.

129. Ward M.R., Jamieson W.J., Leckey C.A., Alexander A.J. Laser-induced nucleation of carbon dioxide bubbles // The Journal of Chemical Physics.– 2015.– Vol. 142, № 14.– P. 144501.

130. Lee I.S., Evans J.M.B., Erdemir D., Lee A.Y., Garetz B.A., Myerson A.S. Nonphotochemical Laser Induced Nucleation of Hen Egg White Lysozyme Crystals // Crystal Growth & Design.– 2008.– Vol. 8, № 12.– P. 4255–4261.

131. Yennawar N., Denev S., Gopalan V., Yennawar H. Laser-improved protein crystallization screening // Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun.– 2010.– Vol. 66, № 8.– P. 969–972.

132. Chen T., Hiramatsu H., Toyouchi S., Sugiyama T. Laser-Polarization-Induced Anisotropy Enhances Protein Crystallization // Angewandte Chemie.– 2025.– Vol. 137, № 21.– P. e202501827.

133. Keshmiri A., Keshavarzi B., Eftekhari M., Heitkam S., Eckert K. The impact of an ultrasonic standing wave on the sorption behavior of proteins: Investigation of the role

of acoustically induced non-spherical bubble oscillations // Journal of Colloid and Interface Science.– 2024.– Vol. 660.– P. 52–65.

134. Breitbach M., Bathen D., Schmidt-Traub H. Effect of Ultrasound on Adsorption and Desorption Processes // Ind. Eng. Chem. Res.– 2003.– Vol. 42, № 22.– P. 5635–5646.

135. Jiang J., Song Z., Wang Q., Xu X., Liu Y., Xiong Y.L. Ultrasound-mediated interfacial protein adsorption and fat crystallization in cholesterol-reduced lard emulsion // Ultrasonics Sonochemistry.– 2019.– Vol. 58.– P. 104641.

136. Doering U., Grigoriev D., Tapio K., Rosencrantz S., Rosencrantz R.R., Bald I., Böker A. About the mechanism of ultrasonically induced protein capsule formation // RSC Adv.– 2021.– Vol. 11, № 27.– P. 16152–16157.

137. Su J., Cavaco-Paulo A. Effect of ultrasound on protein functionality // Ultrasonics Sonochemistry.– 2021.– Vol. 76.– P. 105653.

138. Hong Z., Kong Y., Guo R., Huang Q. Stabilizing effect of silver carp myofibrillar protein modified by high intensity ultrasound on high internal phase emulsions: Protein denaturation, interfacial adsorption and reconfiguration // International Journal of Biological Macromolecules.– 2024.– Vol. 265.– P. 130896.

139. Афанасьев К. Н, Богинская И. А, Седова М. В, Слипченко Е. А, Аверьянова А. Д, Рыжиков И. А. Эффект дополнительного усиления амплитуды ГКР спектров миоглобина, осажденного под воздействием ультразвука на предварительно наноструктурированную поверхность пленок Ag – Современная электродинамика, 2023.

140. Lee C., Robertson C.S., Nguyen A.H., Kahraman M., Wachsmann-Hogiu S. Thickness of a metallic film, in addition to its roughness, plays a significant role in SERS activity // Sci Rep.– 2015.– Vol. 5, № 1.– P. 11644.

141. Liszewska M., Stefaniak M., Firak J., Bartosewicz B., Budner B., Wojciechowski T., Jankiewicz B.J., Nyga P. Influence of silver thickness on optical properties of metal island films fabricated by physical vapour deposition // 2014 16th

International Conference on Transparent Optical Networks (ICTON).– Graz, Austria: IEEE, 2014.– P. 1–3.

142. Fu C.Y., Koh Z.Y., Kho K.W., S D.U., Praveen T., Olivo M. The effect of design parameters of metallic substrate on the reproducibility of SERS measurement for biosensing // Biosensing II.– SPIE, 2009.– Vol. 7397.– P. 240–249.

143. Schneidewind H., Weber K., Zeisberger M., Hübner U., Dellith A., Cialla-May D., Mattheis R., Popp J. The effect of silver thickness on the enhancement of polymer based SERS substrates // Nanotechnology.– IOP Publishing, 2014.– Vol. 25, № 44.– P. 445203.

144. Kassu A., Farley C., Sharma A., Kim W., Guo J. Effect of Pore Size and Film Thickness on Gold-Coated Nanoporous Anodic Aluminum Oxide Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor // Sensors.– Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2015.– Vol. 15, № 12.– P. 29924–29937.

145. Kassu A., Farley C., Sharma A., Kim W., Guo J. Effect of film thickness on localized surface plasmon enhanced chemical sensor / ed. Vo-Dinh T., Lieberman R.A., Gauglitz G.G.– Baltimore, Maryland, USA, 2014.– P. 910605.

146. Puente C., Pineda Aguilar N., Gómez I., López I. Morphology Effect of Photoconverted Silver Nanoparticles on the Performance of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates // ACS Omega.– 2023.– Vol. 8, № 14.– P. 12630–12635.

147. Wei H., McCarthy A., Song J., Zhou W., Vikesland P.J. Quantitative SERS by hot spot normalization – surface enhanced Rayleigh band intensity as an alternative evaluation parameter for SERS substrate performance // Faraday Discuss.– 2017.– Vol. 205.– P. 491–504.

148. Schlücker S. Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications. 1st ed.– Weinheim: John Wiley & Sons, Incorporated, 2013.– 1 p.

149. Pilot R., Signorini R., Durante C., Orian L., Bhamidipati M., Fabris L. A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering // Biosensors.– 2019.– Vol. 9, № 2.– P. 57.

150. Stiles P.L., Dieringer J.A., Shah N.C., Van Duyne R.P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // Annual Rev. Anal. Chem.– 2008.– Vol. 1, № 1.– P. 601–626.

151. Aroca R. Surface enhanced vibrational spectroscopy.– Hoboken, NJ: Wiley, 2006.– 233 p.

152. Kumari G., Kandula J., Narayana C. How Far Can We Probe by SERS? // J. Phys. Chem. C.– 2015.– Vol. 119, № 34.– P. 20057–20064.

153. Liu F.M., Köllensperger P.A., Green M., Cass A.E.G., Cohen L.F. A note on distance dependence in surface enhanced Raman spectroscopy // Chemical Physics Letters.– 2006.– Vol. 430, № 1–3.– P. 173–176.

154. Kukushkin V.I., Van'kov A.B., Kukushkin I.V. Long-range manifestation of surface-enhanced Raman scattering // Jetp Lett.– 2013.– Vol. 98, № 2.– P. 64–69.

155. Nardou E., Vouagner D., Jurdyc A.-M., Berthelot A., Pillonnet A., Sablonière V., Champagnon B. Distance dependence of the Surface Enhanced Raman Scattering effect observed in amorphous TiO2 on nanostructured gold // Optical Materials.– 2011.– Vol. 33, № 12.– P. 1907–1910.

156. Tabaksblat R., Meier R.J., Kip B.J. Confocal Raman Microspectroscopy: Theory and Application to Thin Polymer Samples // Appl Spectrosc.– 1992.– Vol. 46, № 1.– P. 60–68.

157. De Grauw C.J., Sijtsema N.M., Otto C., Greve J. Axial resolution of confocal Raman microscopes: Gaussian beam theory and practice // Journal of Microscopy.– 1997.– Vol. 188, № 3.– P. 273–279.

158. Everall N.J. Modeling and Measuring the Effect of Refraction on the Depth Resolution of Confocal Raman Microscopy // Appl Spectrosc.– 2000.– Vol. 54, № 6.– P. 773–782.

159. Everall N., Lapham J., Adar F., Whitley A., Lee E., Mamedov S. Optimizing Depth Resolution in Confocal Raman Microscopy: A Comparison of Metallurgical, Dry

Corrected, and Oil Immersion Objectives // Appl Spectrosc.– 2007.– Vol. 61, № 3.– P. 251–259.

160. Chakraborty S., Kahan T.F. A model for interpreting depth profiles of confocal Raman measurements in reflective and transmitting materials // J Raman Spectroscopy.– 2019.– Vol. 50, № 11.– P. 1763–1776.

161. Dos Santos D.P., Sena M.M., Almeida M.R., Mazali I.O., Olivieri A.C., Villa J.E.L. Unraveling surface-enhanced Raman spectroscopy results through chemometrics and machine learning: principles, progress, and trends // Anal Bioanal Chem.– 2023.– Vol. 415, № 18.– P. 3945–3966.

162. Zhang Z.-M., Chen S., Liang Y.-Z. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares // Analyst.– 2010.– Vol. 135, № 5.– P. 1138.

163. Ye J., Tian Z., Wei H., Li Y. Baseline correction method based on improved asymmetrically reweighted penalized least squares for the Raman spectrum // Appl. Opt.– 2020.– Vol. 59, № 34.– P. 10933.

164. Eilers P.H.C. Parametric Time Warping // Anal. Chem.– 2004.– Vol. 76, № 2.– P. 404–411.

165. Xi Y., Li Y., Duan Z., Lu Y. A Novel Pre-Processing Algorithm Based on the Wavelet Transform for Raman Spectrum // Appl Spectrosc.– 2018.– Vol. 72, № 12.– P. 1752–1763.

166. Rojalin T., Antonio D., Kulkarni A., Carney R.P. Machine Learning-Assisted Sampling of Surfance-Enhanced Raman Scattering (SERS) Substrates Improve Data Collection Efficiency // Appl Spectrosc.– 2022.– Vol. 76, № 4.– P. 485–495.

167. Yaltaye M.W., Zhao Y., Zhan K., Bozo E., Xin P.-L., Farrahi V., De Angelis F., Huang J.-A. Single-Molecule SERS Detection of Phosphorylation in Serine and Tyrosine Using Deep Learning-Assisted Plasmonic Nanopore // J. Phys. Chem. Lett.– 2025.– Vol. 16, № 33.– P. 8418–8426.

168. Ciloglu F.U., Caliskan A., Saridag A.M., Kilic I.H., Tokmakci M., Kahraman M., Aydin O. Drug-resistant Staphylococcus aureus bacteria detection by combining surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and deep learning techniques // Sci Rep.– 2021.– Vol. 11, № 1.– P. 18444.

169. Savitzky Abraham., Golay M.J.E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. // Anal. Chem.– 1964.– Vol. 36, № 8.– P. 1627–1639.

170. Wartewig S. IR and Raman Spectroscopy: Fundamental Processing. 1. Auflage.– Weinheim: Wiley-VCH, 2006.– 1 p.

171. Brown C.D., Wentzell P.D. Hazards of digital smoothing filters as a preprocessing tool in multivariate calibration // J. Chemometrics.– 1999.– Vol. 13, № 2.– P. 133–152.

172. Wang Y.-P., Wang Y., Spencer P. Fuzzy Clustering of Raman Spectral Imaging Data with a Wavelet-Based Noise-Reduction Approach // Appl Spectrosc.– 2006.– Vol. 60, № 7.– P. 826–832.

173. Hu Q., Sellers C., Kwon J.S.-I., Wu H.-J. Integration of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and machine learning tools for coffee beverage classification // Digital Chemical Engineering.– 2022.– Vol. 3.– P. 100020.

174. Gao N., Wang Q., Tang J., Lv X., Li H., Yue X., Zhong F., Fu J., Wang T. Serum SERS spectroscopy combined with classification algorithm in the non-destructive identification of cervical cancer // Appl. Phys. A.– 2023.– Vol. 129, № 12.– P. 822.

175. Li S.X., Zhang Y.J., Zeng Q.Y., Li L.F., Guo Z.Y., Liu Z.M., Xiong H.L., Liu S.H. Potential of cancer screening with serum surface-enhanced Raman spectroscopy and a support vector machine // Laser Phys. Lett.– 2014.– Vol. 11, № 6.– P. 065603.

176. Küster T., Bothun G.D. *In situ* SERS detection of dissolved nitrate on hydrated gold substrates // Nanoscale Adv.– 2021.– Vol. 3, № 14.– P. 4098–4105.

177. Zhang P., Liu B., Mu X., Xu J., Du B., Wang J., Liu Z., Tong Z. Performance of Classification Models of Toxins Based on Raman Spectroscopy Using Machine Learning Algorithms // Molecules.– 2023.– Vol. 29, № 1.– P. 197.

178. Yan C. A review on spectral data preprocessing techniques for machine learning and quantitative analysis // iScience.– 2025.– Vol. 28, № 7.– P. 112759.

179. Kobayashi S., Kaneko S., Tamaki T., Kiguchi M., Tsukagoshi K., Terao J., Nishino T. Principal Component Analysis of Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra Revealing Isomer-Dependent Electron Transport in Spiropyran Molecular Junctions: Implications for Nanoscale Molecular Electronics // ACS Omega.– 2022.– Vol. 7, № 6.– P. 5578–5583.

180. Kongklad G., Chitaree R., Taechalertpaisarn T., Panvisavas N., Nuntawong N. Discriminant Analysis PCA-LDA Assisted Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Direct Identification of Malaria-Infected Red Blood Cells // MPs.– 2022.– Vol. 5, № 3.– P. 49.

181. Qian Y., Wang Q., Pan S., Yang Z., Yang D. Surface enhanced substrate simulation optimized coupled PLS model for quantitative detection of acetone in transformer oil // Opt Rev.– 2024.– Vol. 31, № 1.– P. 65–74.

182. Khristoforova Y., Bratchenko L., Bratchenko I. Combination of Raman spectroscopy and chemometrics: A review of recent studies published in the Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Journal.– arXiv, 2022.

183. Guo S., Bocklitz T., Neugebauer U., Popp J. Common mistakes in cross-validating classification models // Anal. Methods.– 2017.– Vol. 9, № 30.– P. 4410–4417.

184. International Organization for Standardization. ISO 21920-2:2021. Geometrical product specifications (GPS): International Standard.– Edition 1, 2021.

185. Liu L., Li X., Nonaka K. Light depolarization in off-specular reflection on submicro rough metal surfaces with imperfectly random roughness // Review of Scientific Instruments.– 2015.– Vol. 86, № 2.– P. 023107.

186. Cole R.W., Jinadasa T., Brown C.M. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control // Nat Protoc.– 2011.– Vol. 6, № 12.– P. 1929–1941.

187. Basic Confocal Microscopy / ed. Price R.L., Jerome W.G.– New York, NY: Springer New York, 2011.

188. Kottwitz J., Bruno K.A., Berg J., Salomon G.R., Fairweather D., Elhassan M., Baltensperger N., Kissel C.K., Lovrinovic M., Baltensweiler A., Schmied C., Templin C., Lima J.A.C., Landmesser U., Lüscher T.F., Manka R., Heidecker B. Myoglobin for Detection of High-Risk Patients with Acute Myocarditis // J. of Cardiovasc. Trans. Res.– 2020.– Vol. 13, № 5.– P. 853–863.

189. Rebalka I.A., Hawke T.J. Potential Biomarkers of Skeletal Muscle Damage // Biomarkers Med.– 2014.– Vol. 8, № 3.– P. 375–378.

190. Chen-Levy Z., Wener M.H., Toivola B., Daum P., Reyes M., Fine J.S. Factors Affecting Urinary Myoglobin Stability In Vitro // Am J Clin Pathol.– 2005.– Vol. 123, № 3.– P. 432–438.

191. Kendrew J.C., Bodo G., Dintzis H.M., Parrish R.G., Wyckoff H., Phillips D.C. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis // Nature.– 1958.– Vol. 181, № 4610.– P. 662–666.

192. Romero-Herrera A.E., Lehmann H. The amino acid sequence of human myoglobin and its minor fractions // Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences.– 1974.– Vol. 186, № 1084.– P. 249–279.

193. Hubbard S.R. Crystal Structure of Human Myoglobin Mutant K45R: 3rgk.– 2011.

194. Branden C.I., Tooze J. Introduction to Protein Structure. 0 ed.– Garland Science, 2012.

195. Perutz M.F. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins // Quart. Rev. Biophys.– 1989.– Vol. 22, № 2.– P. 139–237.

196. Zhu L., Sage J.T., Champion P.M. Quantitative structural comparisons of heme protein crystals and solutions using resonance Raman spectroscopy // Biochemistry.– 1993.– Vol. 32, № 41.– P. 11181–11185.

197. El-Said W.A., Fouad D.M., El-Safty S.A. Ultrasensitive label-free detection of cardiac biomarker myoglobin based on surface-enhanced Raman spectroscopy // Sensors and Actuators B: Chemical.– 2016.– Vol. 228.– P. 401–409.

198. Kurouski D., Postiglione T., Deckert-Gaudig T., Deckert V., Lednev I.K. Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens // Analyst.– 2013.– Vol. 138, № 6.– P. 1665.

199. Krylov V.B., Nifantiev N.E. Synthetic Oligosaccharides Mimicking Fungal Cell Wall Polysaccharides // The Fungal Cell Wall / ed. Latgé J.-P.– Cham: Springer International Publishing, 2019.– Vol. 425.– P. 1–16.

200. Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Grachev A.A., Chizhov A.O., Nifantiev N.E. Synthesis of 3-aminopropyl glycosides of linear β-(1→3)-d-glucooligosaccharides // Carbohydrate Research.– 2016.– Vol. 419.– P. 8–17.

201. Yashunsky D.V., Karelin A.A., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. Synthesis of 3-aminopropyl β-(1 → 6)-d-glucotetraoside and its biotinylated derivative // Carbohydrate Research.– 2018.– Vol. 455.– P. 18–22.

202. Krylov V.B., Gerbst A.G., Argunov D.A., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Kaczynski Z., Huebner J., Holst O., Nifantiev N.E. Definitive Structural Assessment of Enterococcal Diheteroglycan // Chemistry A European J.– 2015.– Vol. 21, № 4.– P. 1749–1754.

203. Argunov D.A., Trostianetskaia A.S., Krylov V.B., Kurbatova E.A., Nifantiev N.E. Convergent Synthesis of Oligosaccharides Structurally Related to Galactan I and Galactan II of *Klebsiella Pneumoniae* and their Use in Screening of Antibody Specificity // Eur J Org Chem.– 2019.– Vol. 2019, № 26.– P. 4226–4232.

204. Krylov V.B., Argunov D.A., Solovev A.S., Petruk M.I., Gerbst A.G., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Latgé J.-P., Nifantiev N.E. Synthesis of oligosaccharides related to galactomannans from *Aspergillus fumigatus* and their NMR spectral data // Org. Biomol. Chem.– 2018.– Vol. 16, № 7.– P. 1188–1199.

205. Zvyagina J.Yu., Safiullin R.R., Boginskaya I.A., Slipchenko E.A., Afanas‘ev K.N., Sedova M.V., Krylov V.B., Yashunsky D.V., Argunov D.A., Nifantiev N.E., Ryzhikov I.A., Merzlikin A.M., Lagarkov A.N. Selective Detection of Fungal and Bacterial Glycans with Galactofuranose (Galf) Residues by Surface-Enhanced Raman Scattering and Machine Learning Methods // IJMS.– 2025.– Vol. 26, № 9.– P. 4218.

206. Vereshchagin K., Slipchenko E., Afanasev K., Zvyagina J., Polozov V., Naboko A., Sedova M., Boginskaya I., Ryzhikov I., Merzlikin A. Confocal Raman Microscopic Study of the SERS-Effect Spatial Localization Over Nanostructured Self-Assembled Silver Films // J Raman Spectroscopy.– 2025.– Vol. 56, № 8.– P. 673–685.

207. Qiuming Y. Confocal Raman Microscopy. Part II. Renishaw Confocal Raman Microscope.– 2009.– P. 19.

208. Vereschagin K.A., Smirnov V.V., Stelmakh O.M., Fabelinsky V.I., Sabelnikov V.A., Ivanov V.V., Clauss W., Oschwald M. Temperature measurements by coherent anti-Stokes Raman spectroscopy in hydrogen-fuelled scramjet combustor // Aerospace Science and Technology.– 2001.– Vol. 5, № 5.– P. 347–355.

209. Boginskaya I.A., Slipchenko E.A., Sedova M.V., Zvyagina J.Yu., Maximov A.D., Baburin A.S., Rodionov I.A., Merzlikin A.M., Ryzhikov I.A., Lagarkov A.N. Additional Enhancement of Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Myoglobin Precipitated under Action of Laser Irradiation on Self-Assembled Nanostructured Surface of Ag Films // Chemosensors.– 2023.– Vol. 11, № 6.– P. 321.

210. Vereshchagin K.A., Slipchenko E.A., Boginskaya I.A., Zvyagina J.Yu., Afanasev K.N., Dikikh D.A., Sedova M.V., Ryzhikov I.A., Merzlikin A.M. Extraordinary SERS on nanostructured self-assembled silver films due to preliminary random nano-

profiling of substrate and ultrasonic exposure of analyte during the deposition // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.– 2025.– Vol. 329.– P. 125629.

211. Gouadec G., Colomban P. Raman Spectroscopy of nanomaterials: How spectra relate to disorder, particle size and mechanical properties // Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials.– 2007.– Vol. 53, № 1.– P. 1–56.

212. Компан М.Е., Баранов М.А., Малышкин В.Г., Цыбин О.Ю. Спектры комбинационного рассеяния в диапазоне 75-1200 cm-1 аминокислот L-триптофана, дифенил-L-аланина и глицина в водном растворе и в дегидратированных пленках // Физика твёрдого тела.– 2024.– Vol. 66, № 8.– P. 1445–1449.

213. Drescher D., Büchner T., McNaughton D., Kneipp J. SERS reveals the specific interaction of silver and gold nanoparticles with hemoglobin and red blood cell components // Phys. Chem. Chem. Phys.– 2013.– Vol. 15, № 15.– P. 5364.

214. Stewart S., Fredericks P.M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.– 1999.– Vol. 55, № 7–8.– P. 1641–1660.

215. Desbois A., Lutz M., Banerjee R. Low-frequency vibrations in resonance Raman spectra of horse heart myoglobin. Iron-ligand and iron-nitrogen vibrational modes // Biochemistry.– 1979.– Vol. 18, № 8.– P. 1510–1518.

216. McNay G., Eustace D., Smith W.E., Faulds K., Graham D. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance raman scattering (SERRS): A review of applications // Applied Spectroscopy.– 2011.– Vol. 65, № 8.

217. Murshudov G.N., Krzywda S., Brzozowski A.M., Jaskolski M., Scott E.E., Klizas S.A., Gibson Q.H., Olson J.S., Wilkinson A.J. V68N MET MYOGLOBIN: 1m6m.– 1998.

218. Chu Y., Banaee M.G., Crozier K.B. Double-Resonance Plasmon Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering with Enhancement at Excitation and Stokes Frequencies // ACS Nano.– 2010.– Vol. 4, № 5.– P. 2804–2810.

219. Saha S., Ghosh M., Chowdhury J. Infused self-assembly on Langmuir–Blodgett Film: Fabrication of highly efficient SERS active substrates with controlled plasmonic aggregates // J Raman Spectroscopy.– 2019.– Vol. 50, № 3.– P. 330–344.

220. Moskovits M., Suh J.S. Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver // J. Phys. Chem.– 1984.– Vol. 88, № 23.– P. 5526–5530.

221. Akbali B., Yagmurcukardes M., Peeters F.M., Lin H.-Y., Lin T.-Y., Chen W.-H., Maher S., Chen T.-Y., Huang C.-H. Determining the Molecular Orientation on the Metal Nanoparticle Surface through Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Density Functional Theory Simulations // J. Phys. Chem. C.– 2021.– Vol. 125, № 29.– P. 16289–16295.

222. Neupane G.P., Salaria R.K. Improving SERS sensitivity *via* hot spots and control of molecular orientation // J. Mater. Chem. C.– 2026.– Vol. 14, № 3.– P. 1244–1252.

Приложение А. Акт об использовании результатов работы.

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и прикладной электродинамики Российской академии наук (ИТПЭ РАН)

125412, Москва, ул. Ижорская, д. 13, стр. 6
ОКПО 29012159, ОГРН 1027739263441
ИНН 7713020549, КПП 771301001

тел. +7 (495) 484 2383
факс. +7 (495) 484 2633
e-mail: itae@itae.ru

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИТПЭ РАН, д.ф.-м.н.
Розанов К.Н.
« 30 » сентября 20 26 г.

АКТ

Об использовании результатов диссертационной работы Звягиной Юлии Юрьевны

«Разработка методик определения белков и олигосахаридов с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния на поверхности наноструктурированных пленок Ag»

Настоящим актом подтверждается, что при выполнении научно-исследовательских работ по теме «Разработка физико-химических методов синтеза функциональных оптических материалов и методов спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния для создания молекулярно-диагностической платформы, обеспечивающей мониторинг биологических рисков и предотвращения связанных с ними угроз» (Государственное задание Министерства науки и высшего образования Российской Федерации FFUR-2024-0010 «Разработка физико-химических методов синтеза функциональных оптических материалов и методов спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния»), в период с 2024 по 2026 год использовались результаты по селективному определению олигосахаридов с галактофуранозным остатком (Galf), которые были получены Звягиной Ю.Ю. при выполнении диссертационной работы.

Определение бактериальных и грибковых антигенов в крови имеет решающее значение для ранней диагностики, мониторинга и прогноза инвазивных микозов. Одной из приоритетных задач в данной области является разработка таких подходов и методов определения патогенов, в частности, на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), обеспечивающих высокие значения чувствительности, специфичности и точности.

В диссертационной работе Звягиной Ю.Ю. для решения данной задачи была разработана и апробирована методика ГКР-анализа синтетических олигосахаридов с галактофуранозным остатком, которые являются маркерами бактериальных и грибковых инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, *E. faecalis* и *A. fumigatus*. Данная методика основана на оптимальном выборе ГКР-подложки, способе пробоподготовки аналита и подборе необходимой совокупности методов машинного обучения для обработки спектров.

Полученные в диссертационной работе результаты позволили впервые разработать синтетический подход для определения грибковых и бактериальных антигенов с высокой точностью, а также открывают перспективы к исследованию других более сложных бактериальных и грибковых образцов.

Руководитель НИР
Зам. директора ИТПЭ РАН по науке,
член-корр. РАН, д.ф.-м.н. _____ А.М. Мерзликин
(подпись)

Отв. исполнитель НИР,
зав. лаб. №4, к.т.н., доцент _____ И.А. Рыжиков
(подпись)