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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата технических наук

Москва, 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт теоретической и прикладной электродинамики Российской академии наук (ИТПЭ РАН).

Научный руководитель: Богинская Ирина Анатольевна
Кандидат технических наук,
Ведущий научный сотрудник ИТПЭ РАН

Официальные оппоненты:
Доктор физико-математических наук, Макаров Сергей Владимирович
Директор инжинирингового центра фотоники и оптоэлектроники, главный научный сотрудник физического факультета ФГАОУ ВО «НИУИТМО» (Университет ИТМО)

Доктор физико-математических наук, Тарасов Юрий Игоревич
Заведующий кафедрой физики и технической механики института перспективных технологий и индустриального программирования ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский технологический университет»

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова Российской академии наук

Защита диссертации состоится « 5 » февраля 2027 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.029.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт аналитического приборостроения Российской академии науки (ИАП РАН) по адресу: 198095, а/я 140, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте в сети Интернет по ссылке: https://iairas.ru/.

Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 198095, а/я 140, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А, ИАП РАН, диссертационный совет.

Автореферат разослан « _____ » _____ 202 ___ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук А.Л. Буляница

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы определяется необходимостью создания новых аналитических подходов, способных обеспечить высокочувствительное, селективное и воспроизводимое детектирование и количественный анализ как отдельных биологических молекул, так и сложных матриц (сыворотка крови, лизаты). Белки и углеводные структуры, включая олигосахариды, являются основными маркерами различных патологических состояний. 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, использование меток и реагентов, а также характеризуются ограниченными возможностями по одновременному структурному анализу и длительностью анализа.

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.

ГКР-активные структуры реализуются в виде коллоидных наночастиц или планарных подложек. Коллоидные системы обеспечивают высокий коэффициент усиления, но характеризуются ограниченной воспроизводимостью и агрегацией. Планарные подложки обладают большей стабильностью, что делает их использование при рутинном анализе более рациональным. Обзор литературы показал, что усложнение технологии производства не приводит к пропорциональному росту усиления. Одновременно с этим, при рутинном анализе важны воспроизводимость морфологии, стабильность сигнала и масштабируемость. В этом контексте перспективны наноструктурированные серебряные плёнки, полученные методом электронно-лучевого испарения [1–4].

Осаждение аналита на поверхность подложки может осуществляться методом инкубации либо капельным способом. При инкубации подложка погружается в раствор аналита, что обеспечивает относительно равномерную адсорбцию молекул, однако требует большего объема пробы и ограничена способностью аналитов к хемосорбции. Капельное осаждение предполагает нанесение малого объема раствора на поверхность подложки и последующее высыхание. Несмотря на возможность получения неравномерного осадка, именно этот способ является предпочтительным при работе с биологическими образцами в ограниченном объеме. Процесс высыхания капли сопровождается формированием сложных гидродинамических потоков, определяющих конечную морфологию осадка и распределение аналита. В частности, адсорбция белков является многофакторным процессом и может приводить к различным ориентациям

молекулы относительно поверхности, а также к формированию неоднородных по структуре и составу приповерхностных слоёв [5]. Отсутствие системного подхода в пробоподготовке через управление процессом адсорбции, несмотря на десятилетия использования метода, ограничивает применение ГКР в задачах количественного анализа и клинической диагностики. В связи с этим особую актуальность приобретает исследование и разработка методов контролируемого осаждения аналита на ГКР-подложку, позволяющих представлять физику его взаимодействия с подложкой и формировать выгодные с точки зрения усиления, воспроизводимости и удобства измерений морфологии осадка аналита в низких концентрациях (менее 100 мкг/мл).

Одновременно фундаментальной задачей является определение дальнодействия ГКР-эффекта над поверхностью подложки, поскольку именно эта величина определяет эффективность вклада молекул, удалённых от поверхности, в формирование спектра. Существующие оценки демонстрируют значительный разброс значений, что связано с различиями в используемых моделях и экспериментальных подходах. Отсутствие универсальной методики оценки дальнодействия затрудняет оптимизацию толщины и морфологии осадка аналита и ограничивает интерпретацию спектральных данных.

Все озвученные выше задачи сопровождаются большими массивами спектральных данных для обеспечения статистического качества эксперимента, требующими применения многомерных статистических методов и методов машинного обучения. В совокупности эти подходы позволяют выявлять скрытые закономерности и ключевые спектральные признаки, но требуют оптимизации всего конвейера обработки – от очистки спектров до выбора моделей классификации.

Часто исследования фокусируются на отдельных элементах анализа, подложках или обработке данных, реже на пробоподготовке. Тогда как комплексный взгляд и выработка общих рекомендаций могут быть полезны для продвижения метода в сфере клинической диагностики.

Таким образом, несмотря на значительный объем исследований, направленных на развитие ГКР-спектроскопии, **задача обеспечения воспроизводимости ГКР-анализа остается актуальной** и требует комплексного подхода. Ее решение позволит существенно повысить надежность и информативность анализа биомолекул и приблизить внедрение ГКР-анализа в практику клинической диагностики.

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 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, 2023 г.); 2-я Научно-практическая конференция «Клиническая диагностика и Персонализированная медицина» (Москва, 2024 г.); 67-я Всероссийская научная конференция МФТИ (Москва, 2025 г); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2025». (Москва, 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, 2025 г.); X Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIX Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 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, приложения и списка использованных источников литературы (222 наименования). Диссертация изложена на 146 страницах, содержит 29 рисунков и 9 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы его цель и задачи. Описаны научная новизна и практическая значимость работы, представлены основные выводы и положения, выносимые на защиту. Приведены сведения о структуре диссертации и апробации результатов.

В **первой главе** диссертационной работы представлен обзор литературы по теме диссертации. Рассмотрены основные физические, экспериментальные и методические аспекты ГКР-спектроскопии применительно к анализу биологических объектов. Обобщены современные представления о ключевых параметрах ГКР-анализа, выявлены основные проблемы и ограничения метода, а также сформулированы направления, требующие дальнейшего исследования, что определяет постановку цели и задач диссертационной работы.

Во **второй главе** описаны используемые материалы, экспериментальные методики, оборудование и математические подходы к обработке спектральных данных. Представлено описание установок электронно-лучевого напыления, с помощью которых осуществлялось изготовление ГКР-подложек. В работе использовались два типа подложек: тонкая (100 нм) серебряная пленка (Ag) на предметном стекле (G, Glass) – Ag#G и на слюде (M, Mica) – Ag#M. Показаны результаты исследования поверхности ГКР-подложек методом атомносиловой микроскопии. Описана спектрометрическая система на базе конфокального микроскопа WiTec Alpha 300R и её параметры, включая аппаратную функцию, определяющую измерительный объём. Описаны объекты исследования: белки (миоглобин человека) и олигосахариды (маркеры грибковых и бактериальных инфекций). Приведены условия пробоподготовки и измерений, включая параметры лазерного и ультразвукового воздействия, влияющие на формирование осадка аналита. Описаны методы математической обработки и алгоритм классификации спектров олигосахаридов.

В **третьей главе** показаны результаты определения высоты локализации усиливающего эффекта планарной наноструктурированной серебряной подложки для спектров азота воздуха, а также представлена математическая модель для интерпретации результатов измерений.

Традиционно считается, что эффективная область усиления ГКР-сигнала локализуется непосредственно на поверхности планарной подложки или в зазоре между наночастицами металла. Поскольку именно там формируется локализованное электромагнитное (ЭМ) поле, которое распространяется не дальше, чем на единицы нанометров от области локализации. Теоретическое описание пространственного затухания усиления было предложено в ряде работ, основанных на решении уравнений Максвелла для металлических наноструктур [6]. Экспериментальное исследование дальнодействия ГКР обычно проводят с использованием диэлектрических промежуточных слоев контролируемой толщины (спейсер-слоев), позволяющих изменять расстояние между молекулами аналита и металлической поверхностью. Как правило, в результате получается линейная зависимость между интенсивностью ГКР-сигнала (или коэффициентом усиления) и толщиной спейсер-слоя. Данные, полученные в экспериментах разных исследовательских групп, существенно разнятся. Так, расстояние, на котором действует ГКР-эффект от поверхности планарной подложки, оценивается от сотен ангстрем [7] до десятков нанометров [8]. Наблюдаемая разница может быть объяснена отличиями в условиях экспериментов. В частности, сам спейсер-слой вносит искажения в оптическую схему, что отражается на результате измерения.

Чтобы избежать таких искажений, предлагается использовать в качестве аналита химически нейтральный газообразный азот воздуха. Это позволит исключить так же и

потенциальное химическое взаимодействие аналита с поверхностью подложки и сосредоточиться на определении величины только электромагнитно усиления и других эффектов влияния подложки. Для корректной интерпретации полученных результатов была разработана универсальная модель, описывающая ослабление ГКР-сигнала азота воздуха при удалении измерительного объема конфокального микроскопа от поверхности подложки.

Суть метода заключается в регистрации ГКР-сигнала при поступательном перемещении фокальной плоскости объектива вдоль оптической оси (ось Z) микроскопа, перпендикулярно к поверхности подложки. На Рисунке 1 представлена эволюция спектров кремния и азота при удалении измерительного объема объектива от поверхности подложек. На вставках представлена увеличенная спектральная область с полосой колебания, по которой проводился расчет. Соответственно, для кремния – 530 см$^{-1}$, для азота – 2328 см$^{-1}$.

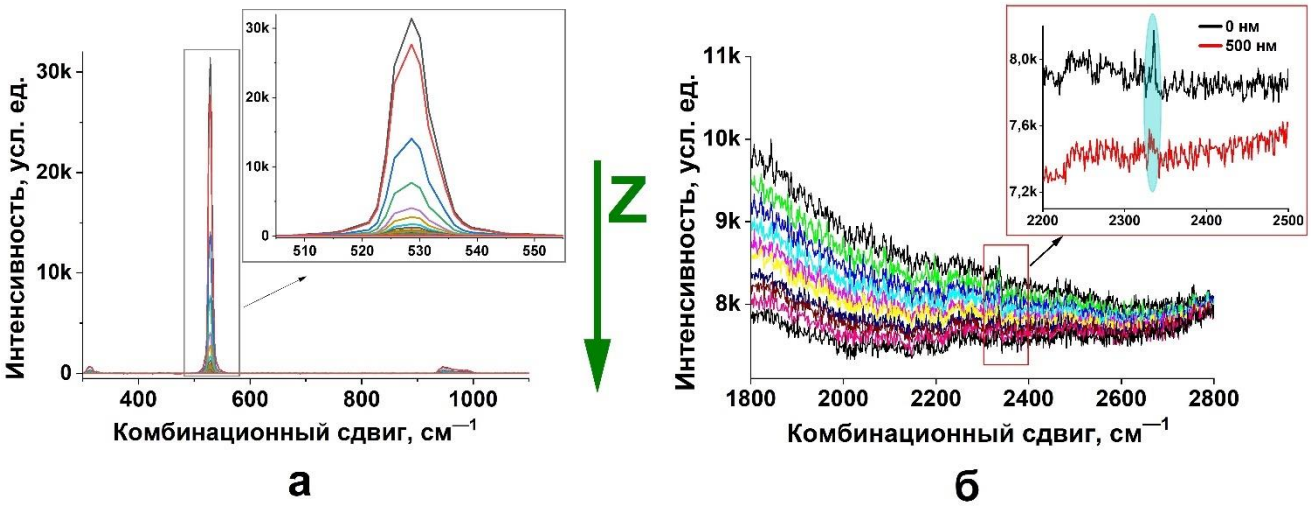


Рисунок 1. (а) Спектры кремния, измеренные при последовательном удалении объектива от кремниевой пластины; (б) спектры азота воздуха, измеренные при последовательном удалении объектива от поверхности ГКР-подложки Ag#G. Зеленой стрелкой показано направление движения вдоль оптической оси микроскопа Z от поверхности подложек

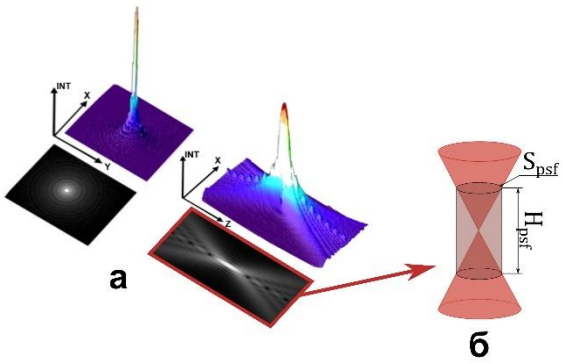


Рисунок 2. (а) PSF конфокального микроскопа в латеральном и аксиальном направлениях; (б) схематичное представление измерительного цилиндра конфокального микроскопа

В конфокальной микроскопии пространственное разрешение определяется функцией рассеяния точки (PSF). Для сфокусированного лазерного пучка PSF в поперечном сечении имеет вид диска Эйри, а вдоль оптической оси Z — форму песочных часов с минимумом в фокусе (Рис. 2а). В конфокальной схеме апертурная диафрагма (пинхол) отсекает расфокусированный свет, преобразуя PSF в сплюснутый эллипсоид, который можно аппроксимировать цилиндром с площадью основания S_{psf} и высотой H_{psf} (Рис. 2б).

Предлагаемая для интерпретации экспериментальных данных математическая модель основана на свертке профилей измерительного цилиндра и образца, как показано на Рисунке 3.

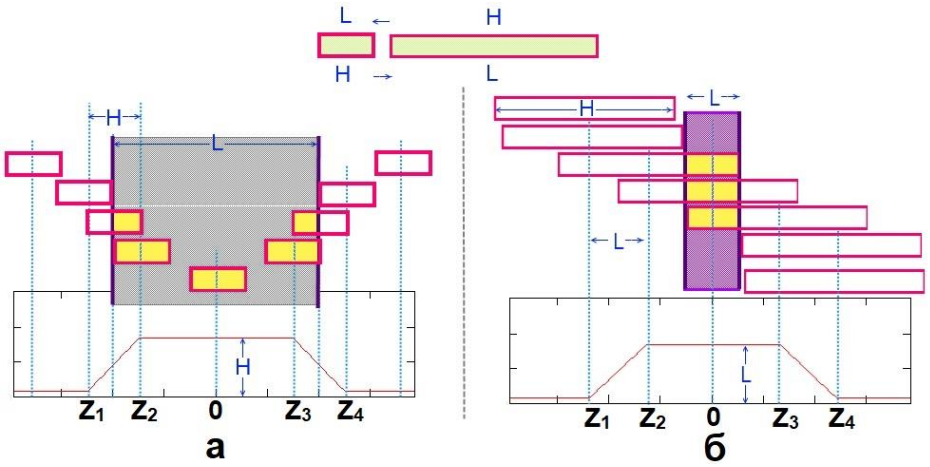


Рисунок 3. Свёртки прямоугольных профилей измерительного цилиндра (ширина H) и образца (ширина L) для двух случаев: (а) H<<L и (б) H>>L

Профиль с наименьшей шириной может рассматриваться как аппаратная функция вне зависимости от того, описывает он профиль образца или измерительный цилиндр (см. Таблицу 1). Как видно из Рисунка 3, 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 1.

Таблица 1. Координаты характерных точек для свертки двух прямоугольных профилей (Рисунок 3)

	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

Во всех случаях уменьшение площади перекрытия профилей вдвое от максимальной (мощности излучения КР в половину от максимальной) происходит на масштабе $\Delta Z1/2$ половины ширины наиболее узкого из двух профилей: при H<<L $\Delta Z1/2$=H/2, при H>>L $\Delta Z1/2$=L/2. Здесь имеется ввиду не полный профиль IR(z), а его спадающая часть (боковые стороны трапеции на Рисунке 3) на интервале $z \in [Z3,Z4]$. Так, для толстых образцов удвоенная полуширина профиля Z-скана соответствует высоте измерительного цилиндра, тогда как для тонких слоев — толщине исследуемого слоя, которой является высота локализации усиливающего эффекта подложки.

PSF генерируется из серии оптических сечений вдоль оси Z до тех пор, пока имеет место перекрытие измерительного цилиндра с толщей образца. Будем считать, что образец имеет толщину L и поперечные размеры (в плоскости XOY), много больше S_{psf}. На рисунке 4 приведены положения измерительного цилиндра для моделей толстого (L>>H) и тонкого (L<<H) слоев.

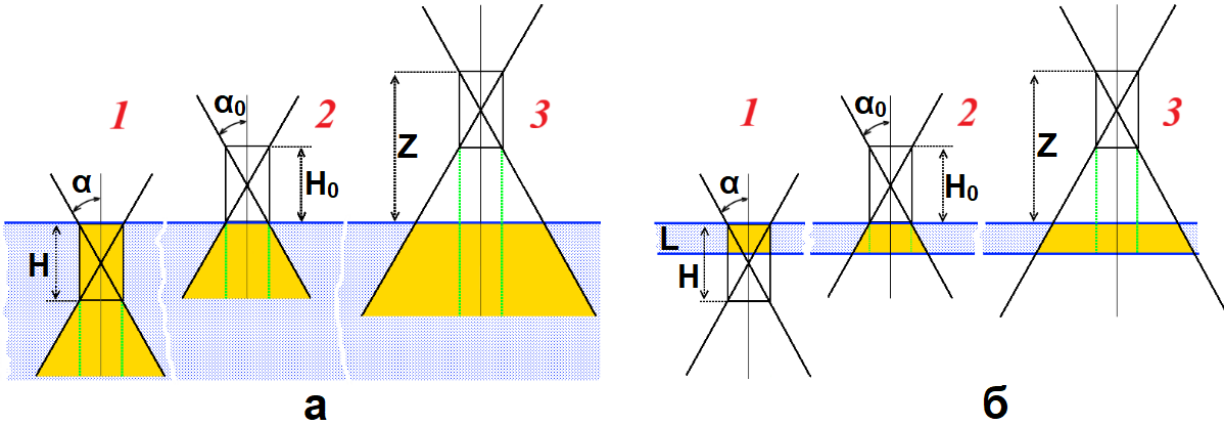


Рисунок 4. (а) Толстый слой (L>>H); (б) тонкий слой (L<<H)

При L>>H максимальный сигнал E_0 из измерительного цилиндра будет равен

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

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

Тогда все положения измерительного цилиндра описываются следующим образом:

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

При L<<H не весь измерительный цилиндр заполнен аналитом и E_0 определяется как:

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

Для всех положений измерительного цилиндра получаем:

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

Данные модельные профили использовались для интерпретации экспериментальных результатов с помощью итерационного алгоритма, реализованного в программной среде MathCad. В качестве первого приближения в (i+1)-ой итерации использовался набор параметров подгонки в i-ой итерации. В 1-й итерации использовались значения параметров, полученные на основе анализа экспериментальных профилей Z-скан. Итерации выполнялись до тех пор, пока набор варьируемых параметров в (i+1)-ой итерации отличался от соответствующего набора в i-ой итерации с заданной точностью, равной 5%.

Результаты экспериментальных профилей для кремния и азота приведены на Рисунке 5.

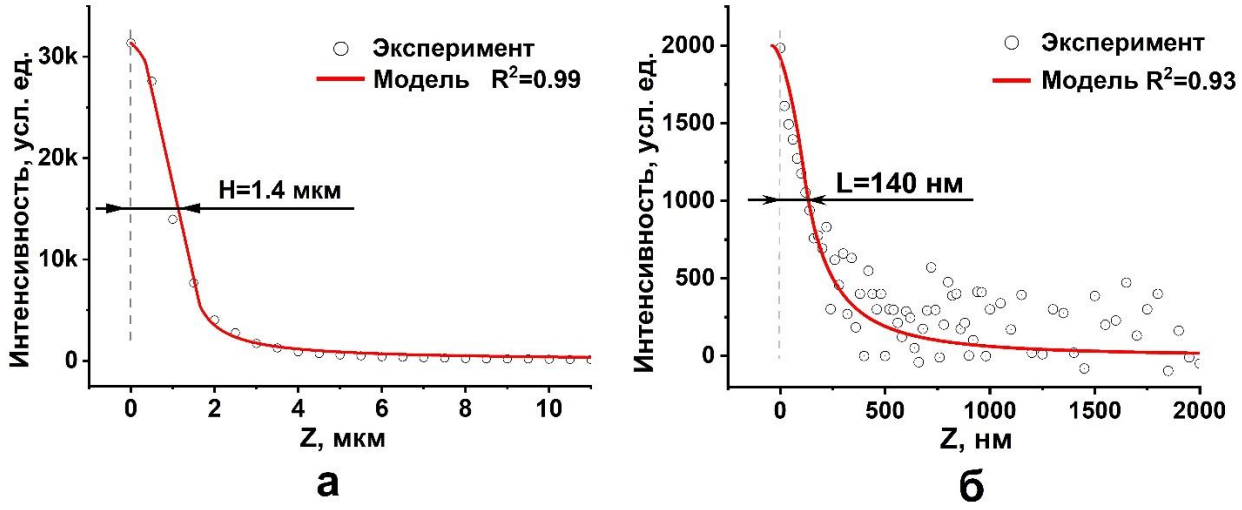


Рисунок 5. Экспериментальные и модельные профили Z-скана кремния (a) и азота (b)

При описании экспериментального профиля Z-скана кремния модельным профилем (1) получается значение высоты измерительного цилиндра H=1.4 мкм. Учитывая величину показателя преломления кристаллического кремния (n=3.416), получаем значение высоты измерительного цилиндра в воздухе $H_0 = \frac{H}{n} \approx 410$ нм.

При описании экспериментального профиля Z-скана азота модельным профилем (2) получается значение толщины слоя 140±10 нм при высоте измерительного цилиндра H_0=410 нм. Соответственно, высота локализации усиливающего эффекта планарной наноструктурированной серебряной подложки составляет 140±10 нм.

В **четвертой главе** представлены результаты исследований влияния различных способов пробоподготовки при осаждении на ГКР-активные серебряные подложки анализируемого вещества – водного раствора миоглобина – на модификацию его микроструктуры и ГКР-спектров.

Лазерное воздействие на каплю водного раствора миоглобина было выбрано в качестве самостоятельного способа пробоподготовки. В работе были использованы свежеприготовленные растворы белка миоглобина в концентрации 1 мкг/мл и 10 нг/мл в деионизированной воде Milli-Q. Образцы высушивали на воздухе без дополнительных воздействий (контроль) и под действием расфокусированного p-поляризованного луча лазера с длиной волны 785 нм и мощностью 100 мВт, встроенного в используемую спектрометрическую систему. Измерения ГКР-спектров проводили в образовавшемся после высушивания осадке. Полученные осадки по морфологическим признакам можно однозначно разделить на три типа. Осадок Типа 1, полученный при высушивании растворов обеих концентраций на воздухе, представляет собой аморфный агломерат белка и является типичным для концентраций белка в растворе менее 100 мкг/мл. При лазерном воздействии на каплю аналита наблюдается формирование двух типов структур в зависимости от концентрации белка в растворе. Для миоглобина при концентрации 1 мкг/мл характерно формирование ограненных кристаллов – Тип 2. В случае понижения концентрации миоглобина до 10 нг/мл наблюдается формирование кристаллических точек – Тип 3. Оптические фотографии, полученные на конфокальном микроскопе, и соответствующие усредненные ГКР-спектры с учетом среднеквадратичного отклонения для каждого типа представлены на Рисунке 6.

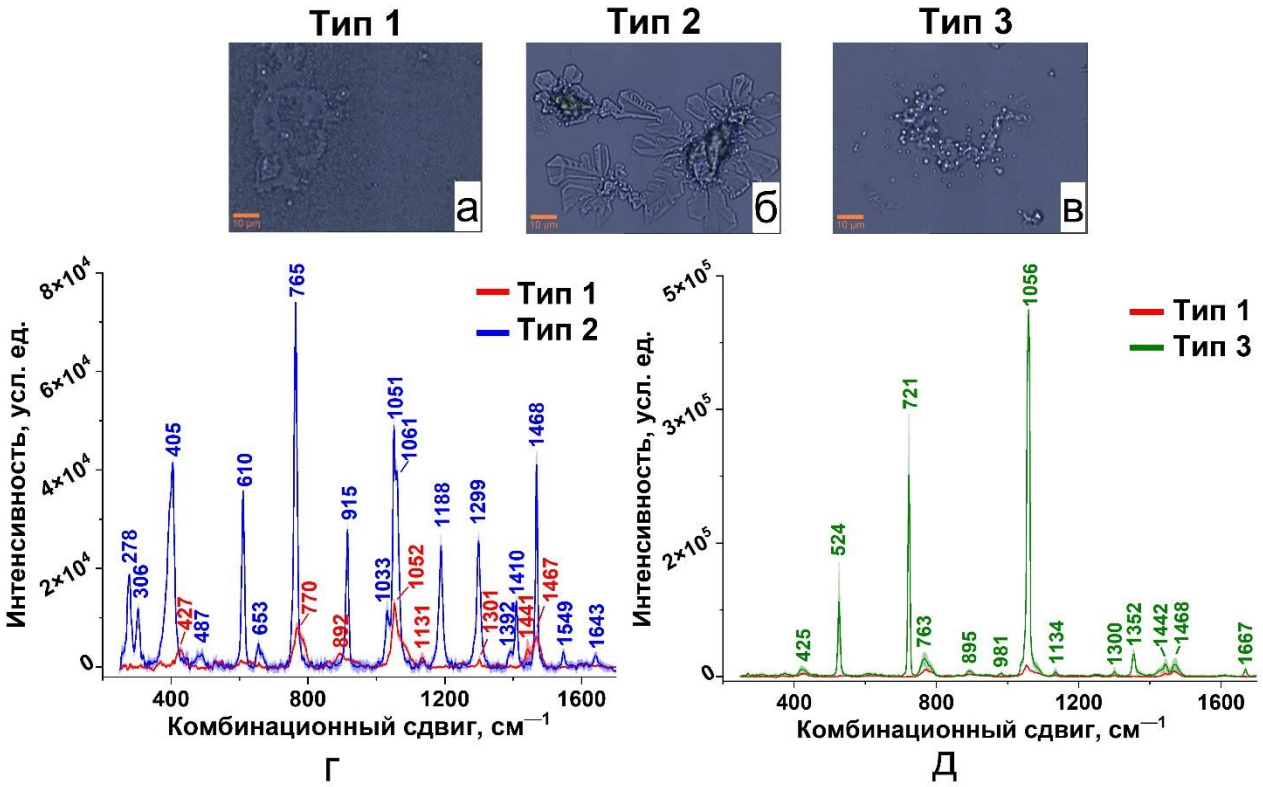


Рисунок 6. Оптическое изображение осадков миоглобина: (а) Тип 1 – при высушивании на воздухе; (б) Тип 2 – при высушивании лазером растворов с концентрацией 1 мкг/мл; (в) Тип 3 – при высушивании лазером растворов с концентрацией 10 нг/мл; (г, д) ГКР-спектры, соответствующие каждому типу осадка миоглобина

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 (наличие ближнего порядка) [9,10]. Анализ колебательных полос позволяет предположить, что упорядочение кристаллической структуры происходит через триптофан, глутамин и лизин, поскольку у всех трех типов спектров наблюдаются общие колебания при 763–770, 1051–1056, 1299–1301, 1467–1468 $см^{-1}$, характерные именно для этих аминокислот.

Полученные аморфные и кристаллические объекты были охарактеризованы с помощью АСМ и интерференционной микроскопии/профилометрии. На Рисунке 7 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 130–160 нм, кристаллов (Тип 2) – 200–250 нм.

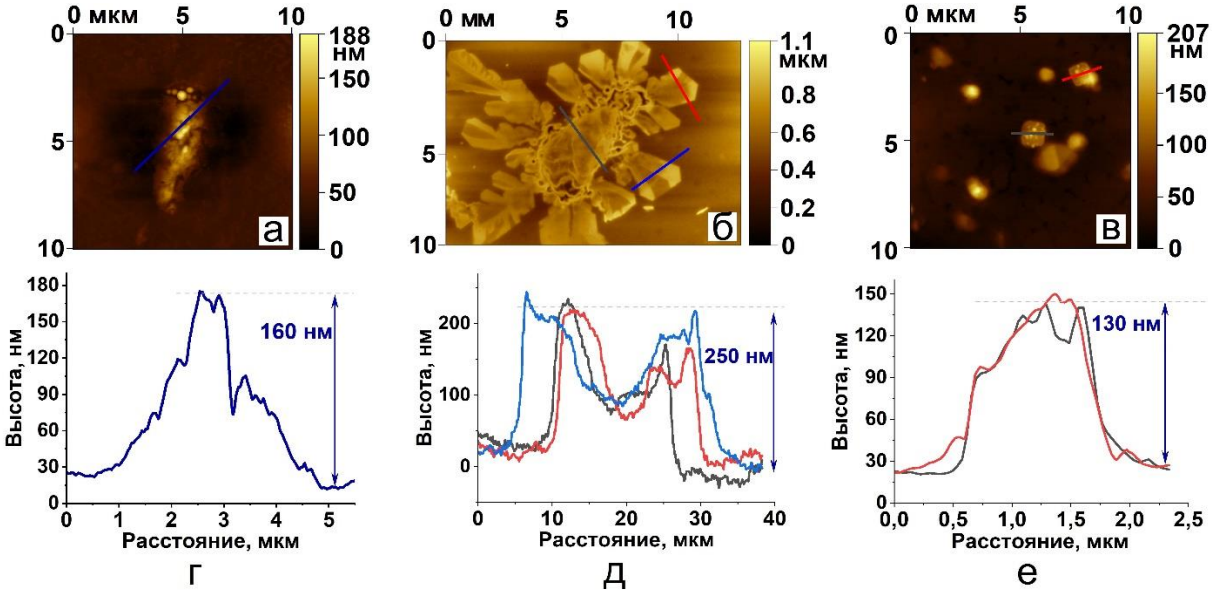


Рисунок 7. Типичные АСМ изображения аморфных агломератов (а) Тип 1 (а), оптическое изображение кристалла Тип 2 (б), кристаллических точек Тип 3 (в) и соответствующие профили сечений (г, д, е). На АСМ и оптическом изображениях линиями указаны прямые, вдоль которых извлекался профиль сечения. Цвет линии соответствует цвету профиля

Все исследуемые объекты полностью заполняют определенную ранее высоту локализации ГКР-эффекта над подложкой. Следовательно, наблюдаемые изменения в спектрах миоглобина после лазерного воздействия объясняются изменением его структуры в процессе формирования осадка, а не общим увеличением количества вещества в области измерительного объема микроскопа. Это позволяет исключить геометрический фактор как единственную причину роста сигнала.

Высушивание с использованием ультразвука в совокупности с разной отмывкой основы подложек использовалось в качестве альтернативного способа пробоподготовки. Перед напылением серебра стеклянную основу обрабатывали в органических растворителях с использованием ультразвуковой ванны в несколько этапов двумя разными методами для формирования различной морфологии. В Таблице 2 представлены параметры морфологии трех типов получившихся поверхностей после нанесения на них серебра.

Таблица 2. Параметры морфологии подложек после нанесения серебряной пленки

	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

Видно, что предварительная очистка стеклянной основы ведет преимущественно к уменьшению шероховатости ГКР-подложек. Параметры шероховатости, а именно, среднеквадратическое отклонение профиля R_q, средняя высота от третьего самого высокого пика до третьей самой низкой впадины R_{3z} и средняя квадратическая длина волны профиля λ_q в

результате предобработки стали меньше. Эксцесс R_{ku} довольно заметно меняется при каждой очистке, и это изменение означает, что сама морфология существенно различается для трех случаев. Известно, что изменение морфологии поверхности в наномасштабе оказывает влияние на адсорбцию белков из растворов [11]. В связи с этим ожидается, что на полученных поверхностях будет наблюдаться различная адсорбция миоглобина из водного раствора. Миоглобин наносили на ГКР-подложки из водного раствора в концентрации 1 мкг/мл и осаждали при низкочастотном (47 кГц) и высокочастотном (580 кГц) ультразвуковом воздействии. На выбранных частотах наблюдался резонанс в системе пьезоэлемент/подложка с аналитом. Для исключения перегрева подложки использовалось воздушное охлаждение. Температура подложки контролировалась с помощью термопары и в процессе ультразвукового воздействия не превышала 27°C. ГКР спектры измеряли в высушенном осадке на длинах волн возбуждения 785 и 532 нм в случайных местах осадка. Оптические изображения осадка и полученные ГКР-спектры представлены на Рисунке 8. На всех морфологиях ГКР-подложек был получен набор спектров, который был разделен на 4 типа (Рисунок 7 в - е). Критерием для разделения послужило положение центра масс спектров на рассматриваемом интервале (200–1700 $см^{-1}$).

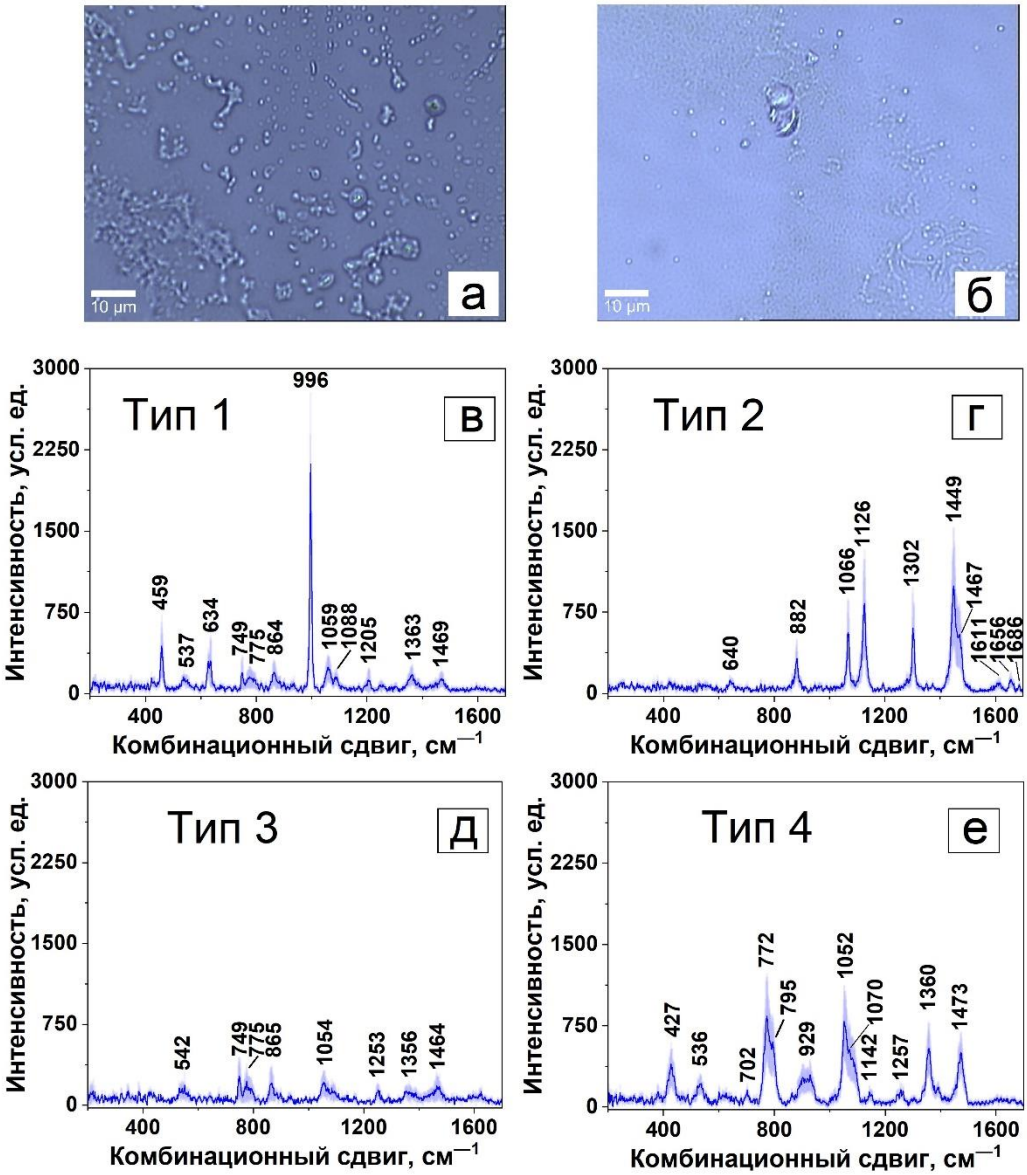


Рисунок 8. Осадок миоглобина после пробоподготовки с использованием ультразвука (47 и 580 кГц). Оптические изображения (а, б); ГКР-спектры: Тип 1 (в), Тип 2 (г), Тип 3 (д), Тип 4 (е)

Всего было получено 263 ГКР-спектра при двух разных длинах волн возбуждающего излучения, трех разных способах подготовки поверхности подложки перед напылением серебра (два разных способа с предварительной очисткой, а также без нее) и двух ультразвуковых частотах осаждения миоглобина. 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 3.

Таблица 3. Процентное содержание спектров каждого типа в общем числе спектров

Длина волны, нм	Метод предварительной обработки	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%
	нет*	44%	0%	56%	0%	17%	83%	0%
532	1	12%	24%	64%	0%	0%		100%
	2	9%	4%	87%	0%	0%		100%
	нет*	22%	78%		0%	50%	50%	0%

*нет – без предварительной очистки основы подложек

Из таблицы 3 видно, что при использовании низкочастотного ультразвука доминируют спектры Типа 3 и 4, в то же время при высокочастотном ультразвуке в большей степени наблюдаются спектры Типа 1 и 3. Анализ распределения типов спектров показывает, что оптимальными условиями пробоподготовки для получения кристаллов миоглобина с усиленными спектром Типа 1 являются ультразвуковое осаждение при частоте 580 кГц и измерение спектров с использованием лазера 785 нм на любой из представленных морфологиях ГКР-подложек.

В **пятой главе** представлен пример комплексного ГКР-анализа клинически значимых веществ – олигосахаридов, являющихся маркерами бактериальных и грибковых инфекций. Впервые были исследованы и охарактеризованы с помощью метода ГКР синтетические олигосахариды, содержащие и не содержащие остаток β-D-галактофуранозида (Galf). Возможность обнаружения данного остатка методом ГКР в физиологически значимых концентрациях позволит определять наличие заражения грибковыми или бактериальными инфекциями, поскольку Galf входит в состав полисахаридных антигенов грибковых и бактериальных патогенов, но не содержится в гликанах человека и млекопитающих. Анализируемыми веществами являются синтетические олигосахариды, не содержащие Galf: (1) oligo-a-(1-2)-Man, (2) oligo-b-(1-3)-Glc, (3) oligob-(1-6)-Glc, и содержащие Galf: (4) oligo-DHG-Ef, (5) oligo-GI-Kp, (6) oligo-GM-Af (Рисунок 9).

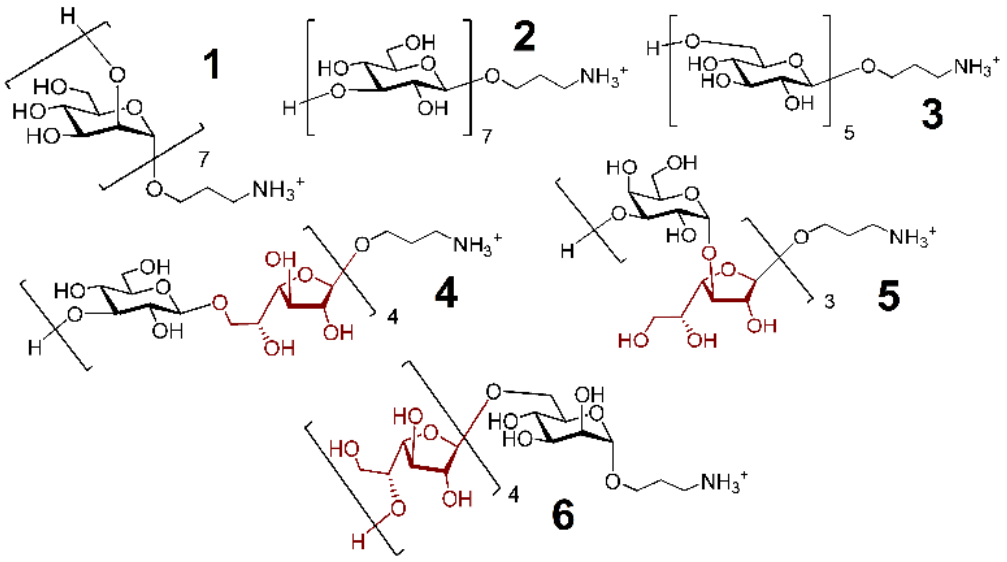
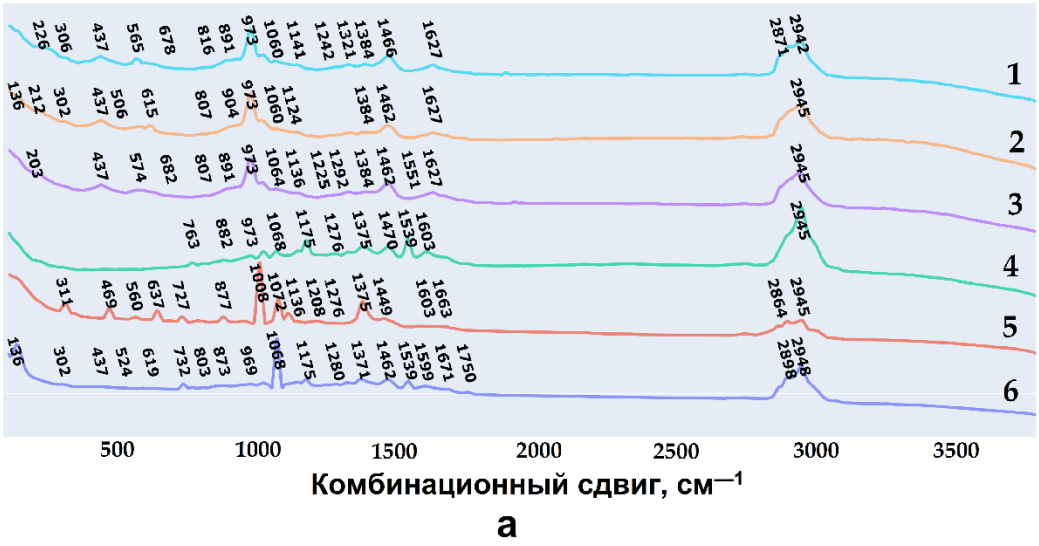


Рисунок 9. Структура олигосахаридных миметиков, соответствующих бактериальным и грибковым гликанам. Galf остаток в структурах выделен красным цветом

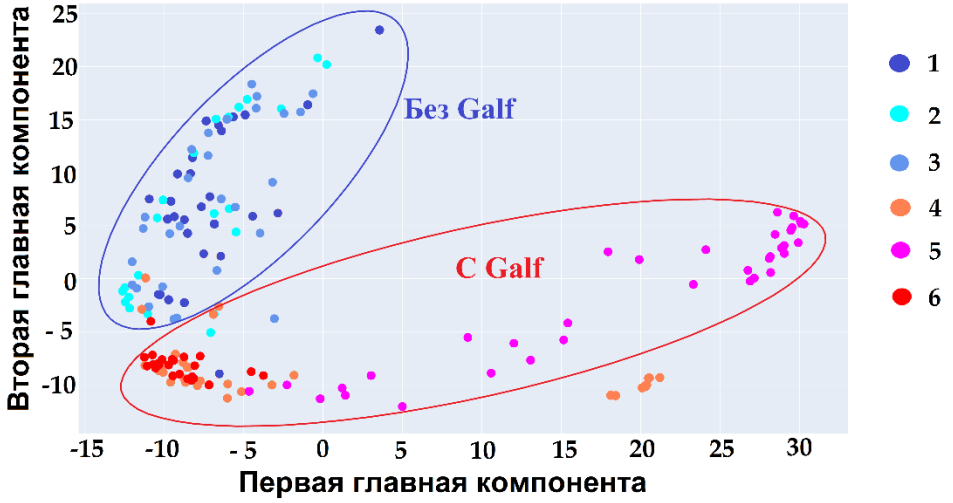
Олигосахариды 1–3 соответствуют фрагментам грибкового α-(1→2)-маннана, β-(1→3)-глюкана и β-(1→6)-глюкана соответственно, которые являются компонентами клеточной стенки патогенных грибов рода *Candida*. Олигосахариды 4–6 представляют собой фрагменты дигетерогликана *Enterococcus faecalis*, галактозана I *Klebsiella pneumoniae* и галактоманнана *Aspergillus spp*. соответственно.

Использовались водные растворы олигосахаридов в клинически значимой концентрации 100 пг/мл. Аликвоты по 3 мкл наносили на серебряные ГКР-подложки Ag#G. Капли были высушены на воздухе при нормальных условиях. Спектры олигосахаридов измеряли в области сухого осадка.

Усредненные спектры каждого вещества после предварительной обработки представлены на Рисунке 10а. Сложность спектров олигосахаридов предполагает, что для улучшения качества и скорости их обработки, а также с учетом перспективы автоматизации анализа, потребуется использовать сочетание метода ГКР с методами параметрической статистики и машинного обучения. Для анализа спектров в работе апробирован и показал наилучшие результаты следующий набор методов: метод главных компонент (Principal Component Analysis, PCA), бутстрэп-оценка, логистическая регрессия (Logistic Regression, LR) с L1 регуляризацией. PCA выбран в качестве первого этапа анализа, поскольку ГКР-спектры представляют собой многомерные данные с сильной корреляцией между соседними спектральными точками. При построении первых двух главных компонент наблюдается явное разделение на две группы (Рисунок 10б), что создает предпосылки для их успешной классификации с использованием метода логистической регрессии.



а



б

Рисунок 10. (а) Усредненные спектры олигосахаридов 1–6 после предварительной обработки; (б) Проекции ГКР-спектров олигосахаридов на оси первых двух главных компонент PCA

Для статистического подтверждения различий между группами спектров применялась бутстрэп-оценка 95% доверительных интервалов интенсивностей признаков, выбранных на основе результатов PCA. Из матрицы сравнений образцов на Рисунке 11а видно, что образцы без остатка Galf (1–3) показывают более высокие проценты перекрытия. Напротив, образцы с остатком Galf (4–6) демонстрируют более низкие значения перекрытия, подчеркивая более четкие различия их спектральных профилей.

LR с L1-регуляризацией использовалась для построения классификационной модели и отбора наиболее информативных спектральных признаков. L1-регуляризация приводит к разреженности коэффициентов модели, автоматически исключая малозначимые признаки и уменьшая риск переобучения при высокой размерности спектральных данных.

Модель LR представлена следующим уравнением:

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

где 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/λ, выбранное методом сеточного поиска (Grid Search) в диапазоне от 10^{-6} до 10^{6}, составляло 0.11. На его основании была построена модель LR для классификации групп аналитов. С помощью модели были определены основные полосы колебаний в спектрах олигосахаридов, содержащих и не содержащих остаток Galf, по которым они устойчиво отличаются друг от друга (Рисунок 11б): 306, 973, 1007, 1068, 1371, 1359, 2867, 2945 $см^{-1}$. Построенная вычислительная модель продемонстрировала 97% точность в определении олигосахаридов, содержащих и не содержащих Galf остаток.

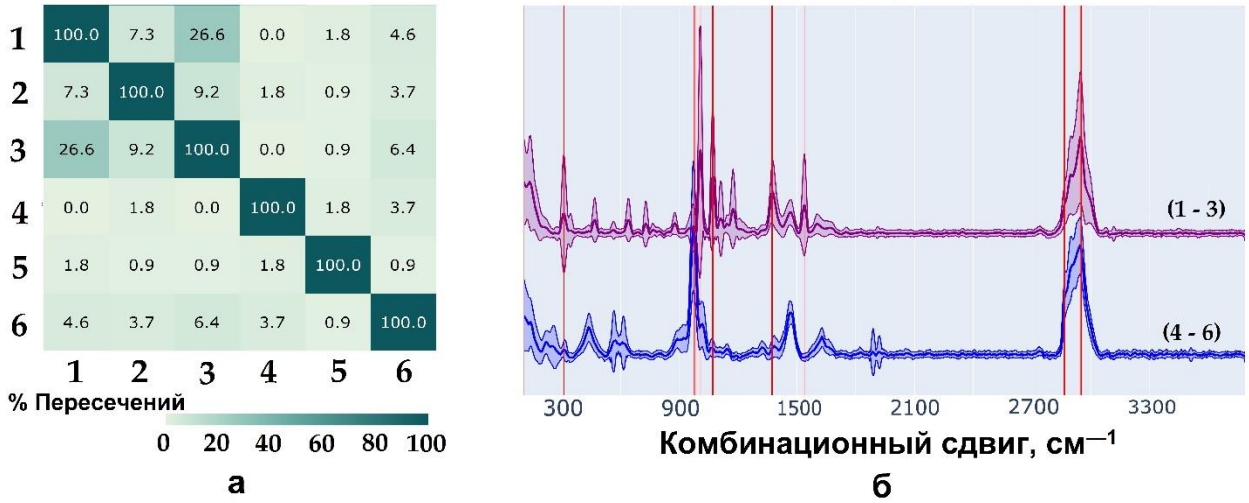


Рисунок 11. (а) Матрица сравнения образцов. Значения в каждой ячейке представляют собой процент статистически значимого перекрытия доверительных интервалов для всех проанализированных пиков для каждой пары образцов; (б) Усредненные спектры после предварительной обработки для каждой группы со стандартным отклонением и наиболее значимые колебательные полосы (красные вертикальные линии)

Выводы

В работе предложен универсальный подход к определению высоты локализации усиливающего эффекта на наноструктурированных самоорганизованных серебряных подложках для КР-спектров азота воздуха с использованием конфокальной микроскопии, позволяющий исключить вклад химического механизма усиления. Показано, что для наноструктурированных серебряных подложек, полученных методом электронно-лучевого напыления в вакууме, область локализации усиливающего эффекта составляет 140±10 нм, что существенно превышает ранее известные теоретические и экспериментальные оценки.

Впервые продемонстрирована возможность формирования белковых кристаллов под действием расфокусированного непрерывного лазерного излучения с длиной волны 785 нм в капле водного раствора миоглобина при низких концентрациях (1 мкг/мл и 10 нг/мл). Установлено, что концентрация белка влияет на морфологию формируемых структур: при более высокой концентрации образуются огранённые кристаллы, тогда как при снижении концентрации формируются локализованные кристаллические образования.

Показано, что воздействие ультразвука различной частоты на водные растворы миоглобина приводит к изменению конформационного состояния белка и формированию

нескольких типов спектральных откликов, один из которых характеризуется выраженной полосой в области 996 $см^{-1}$.

Впервые проведён ГКР-анализ синтетических олигосахаридов, содержащих галактофуранозный остаток и являющихся маркерами бактериальных и грибковых инфекций. Предложен комплекс методов машинного обучения, включающий анализ главных компонент, бутстрэп-оценку и LR с L1-регуляризацией, обеспечивающий классификацию олигосахаридов по наличию галактофуранозного фрагмента с точностью до 97%.

Основные публикации по теме диссертации

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

A1. 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)

A2. 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)

A3. 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)

A4. **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. Раздел в обзоре: S.D.Varfolomeev, et.al. 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.

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 используемых источников

1. Durmanov N. N. и др. 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. Т. 257. С. 37–47.

2. Boginskaya I. и др. Human angiotensin I-converting enzyme study by surface-enhanced Raman spectroscopy // J Raman Spectroscopy. 2021. Т. 52, № 9. С. 1529–1539.

3. Boginskaya I. и др. Human Angiotensin I-Converting Enzyme Produced by Different Cells: Classification of the SERS Spectra with Linear Discriminant Analysis // Biomedicines. 2022. Т. 10, № 6. С. 1389.

4. Slipchenko E. A. и др. SERS Sensor for Human Glycated Albumin Direct Assay Based on Machine Learning Methods // Chemosensors. 2022. Т. 10, № 12. С. 520.

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

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

7. Otto A. и др. Surface-enhanced Raman scattering // J. Phys.: Condens. Matter. 1992. Т. 4, № 5. С. 1143–1212.

8. Nardou E. и др. Distance dependence of the Surface Enhanced Raman Scattering effect observed in amorphous TiO2 on nanostructured gold // Optical Materials. 2011. Т. 33, № 12. С. 1907–1910.

9. 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. Т. 53, № 1. С. 1–56.

10. Компан М. Е. и др. 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. Т. 66, № 8. С. 1445–1449.

11. Scopelliti P. E. и др. The Effect of Surface Nanometre-Scale Morphology on Protein Adsorption // PLoS ONE / под ред. Zhang S. 2010. Т. 5, № 7. С. e11862.