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

На правах рукописи

-34

# Зюбин Андрей Юрьевич

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

Специальность 1.5.2 - Биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук

Калининград – 2025

Работа выполнена в образовательно-научном кластере «Институт высоких технологий» федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Научный консультант	Лаврова Анастасия Игоревна
	доктор физико-математических наук, ведущий научный
	ипремления "Санкт-Петербургский наушно-исследора-
	учреждения санкт-петероургекии научно-исследова-
	ства здравоохранения Российской Федерации
Официальные оппоненты	Горин Дмитрий Александрович, доктор химических
	наук, профессор, профессор центра фотоники и фотон-
	ных технологий, автономная некоммерческая образова-
	тельная организация высшего образования «Сколков-
	ский институт науки и технологий» (Сколтех)
	Кистенев Юрий Владимирович, доктор физико-мате-
	матических наук, профессор, заведующий лабораторией
	лазерного молекулярного имиджинга и машинного обу-
	чения, федеральное государственное автономное образо-
	вательное учреждение высшего образования «Нацио-
	нальный исследовательский Томский государственный
	университет»
	Салмин Владимир Валерьевич, доктор физико-мате-
	матических наук, доцент, профессор кафедры общей фи-
	зики, федеральное государственное автономное образо-
	вательное учреждение высшего образования «Москов-
	ский физико-технический институт (национальный ис-
	следовательский университет)»
Ведущая организация	Федеральное государственное автономное образователь-
	ное учреждение высшего образования «Самарский наци-
	ональный исследовательский университет имени акаде-
	мика С.П. Королева»

Защита состоится «23» октября 2025 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.06 при ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 10, ауд. 511.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. В.А. Артисевич ФГБОУ ВО "СГУ имени Н.Г. Чернышевского" и на официальном сайте ФГБОУ ВО "СГУ имени Н.Г. Чернышевского" по электронному aдресу: https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-06/doktorskaya-dissertaciya-zyubina-andreya-yuevicha

Автореферат разослан « » 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.2.392.06 д.ф.-м.н.

Генина Элина Алексеевна

#### Общая характеристика работы

#### Актуальность и степень разработанности темы.

В настоящее время существует значительный интерес к разработке и практическому использованию плазмонных сенсоров на базе поверхностно-функционализированных частиц металлов в коллоидных растворах<sup>1</sup> и на поверхностях<sup>2</sup>. Настраиваемые оптические свойства наночастиц металлов, способных к генерации плазмонного резонанса<sup>3</sup>, используются в исследованиях разнообразных биологических субстанций средствами спектроскопии, задачах биовизуализации и фототермической терапии<sup>4</sup>. Оптические свойства плазмонных наночастиц, вблизи которых может индуцироваться эффект плазмонного резонанса, позволяют эффективно применять их в методах флуоресцентной и колебательной спектроскопии, в том числе для неинвазивного безметочного анализа биологических молекул<sup>5</sup>. В последние десятилетия спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) и гигантского комбинационного рассеяния света (ГКРС) активно применяется в мировой науке для экспресс-диагностики и безметочного исследования структурных особенностей биомолекул. Такие подходы позволяют исследователям быстро, неинвазивно, с высокой степенью чувствительности и точности, получать спектральную информацию, в том числе от исследуемых объектов макроскопического масштаба, например, бактериальных клеток и клеток крови. Методы, основанные на металл-усиленной флуоресценции и колебательной спектроскопии, успешно используются для целей лекарственного мониторинга, анализа раковых клеток, анализа клеточных механизмов<sup>6</sup>. В последнее время ведутся исследования широкого спектра бактериальных клеток, успешно реализуются методики дифференциации различных культур бактерий. Спектроскопия ГКРС применяется для анализа бактериальных клеток: К. pneumonia, E. coli, S. cohnii, Brucella, S. typhimurium, S. aureus и других. Наблюдаются попытки применения ГКР-спектроскопии и для исследований и бактериальных клеток микобактерий туберкулеза. В подавляющем большинстве данные исследования направлены на

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Li W., Huberman-Shlaes J., Tian B. Perspectives on Multiscale Colloid-Based Materials for Biomedical Applications //Langmuir. – 2023. – T. 39. – №. 39. – C. 13759-13769

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Beeram R., Vepa K. R., Soma V. R. Recent trends in SERS-based plasmonic sensors for disease diagnostics, biomolecules detection, and machine learning techniques //Biosensors. – 2023. – T. 13. – № 3. – C. 328

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Хлебцов Н. Г., Дыкман Л. А., Хлебцов Б. Н. Синтез и плазмонная настройка золотых и золотосеребряных наночастиц //Russian Chemical Reviews. – 2022. – Т. 91. – С. 10.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Jin, Xiulong, et al. "Rational design of ultrabright SERS probes with embedded reporters for bioimaging and photothermal therapy." *ACS applied materials & interfaces* 9.36 (2017): 30387-30397.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Miller H. et al. Single-molecule techniques in biophysics: a review of the progress in methods and applications //Reports on Progress in Physics. – 2017. – T. 81. – №. 2. – C. 024601

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Dina N. E. et al. SERS-based antibiotic susceptibility testing: Towards point-of-care clinical diagnosis // Biosensors and Bioelectronics. – 2023. – T. 219. – C. 114843.

дифференциацию видов туберкулезных бактерий, выявление межвидовых различий штаммов туберкулеза или сравнение туберкулезных и нетуберкулезных штаммов. С другой стороны работы по применению ГКР-спектроскопии проводятся и в сфере сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), которые остаются ведущей причиной смертности на глобальном уровне в течение последних двух десятилетий во всем мире. Общее количество случаев ССЗ удвоилось с 271 млн. в 1990 г. до 523 млн. в 2019 г., а число смертей<sup>7</sup> от ССЗ увеличилось с 12,1 млн. в 1990 г. до 20,5 млн. в 2023 г. Процесс тромбообразования играет важнейшую роль в выявлении, диагностике и лечении ССЗ и является объектом пристального внимания ученых всего мира. Исследование тромбоцитов и их структурных изменений под влиянием внутренних и внешних факторов на сегодняшний день является и остается актуальной задачей. Активация тромбоцитов считается ключевым моментом в патогенезе ССЗ и его осложнений; поэтому ингибирование рецепторов, ответственных за агрегацию тромбоцитов, является важнейшей задачей в процессе лечения и профилактики ССЗ. Спектроскопия комбинационного рассеяния света и ГКРС могут быть очень информативными для исследования молекулярной структуры тромбоцитов, в частности для анализа молекулярных компонентов, таких как аминокислоты<sup>8</sup>, белки<sup>9</sup>, липиды<sup>10</sup>, могут дать представление о структуре тромбоцитов и их спектральном ответе на антитромбоцитарную терапию, которая является ключом к подходам персонализированной медицины.

Целью диссертационной работы является выявление биомаркеров социально-значимых заболеваний на основе биофизического анализа клеток человека и патогенов с использованием плазмонных наноструктур, ГКРС, спектрофлуорометрии и методов машинного обучения.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

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

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Tsao C. W. et al. Heart disease and stroke statistics—2023 update: a report from the American Heart Association //Circulation. – 2023. – T. 147. – №. 8. – C. e93-e621.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Zhu G. et al. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2011. – T. 78. – №. 3. – C. 1187-1195.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Rygula A. et al. Raman spectroscopy of proteins: a review //Journal of Raman Spectroscopy. – 2013. – T. 44. – № 8. – C. 1061-1076.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Czamara K. et al. Raman spectroscopy of lipids: a review //Journal of Raman spectroscopy. – 2015. – T. 46. – №. 1. – C. 4-20.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Уточнены молекулярно-биологические характеристики выявленных биомаркеров, связанных с антибиотикорезистентностью и механизмами связывания лекарственных препаратов с мишенями. Данные характеристики были определены на основе интеграции экспериментальных результатов и математического моделирования колебательных спектров комбинационного рассеяния света (КРС) биомолекул, входящих в состав клеточной стенки микобактерий и рецептора тромбоцита.

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

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

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные экспериментальные и теоретические результаты представляют собой новые подходы анализу молекулярной структуры рецепторов тромбоцитов, маркеров антибиотикорезистентности клеток *E.coli* и *M.tuberculosis*. Полученные новые фундаментальные результаты с применением КРС- и ГКРС-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии (в том числе с временным разрешением) для исследований комплексов НЧ со сложными объектами на примере тромбоцитов, которые могут быть положены в основу разработки оптических сенсоров для целей диагностики состояния клеток крови человека.

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

О востребованности результатов свидетельствуют публикации в рецензируемых научных журналах российских и зарубежных издательств. Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись при поддержке следующих проектов: проект государственного задания Минобрнауки "Спектрально-кинетические исследования плазмонного взаимодействия наночастиц металлов с органическими молекулами и квантовыми точками в различных средах", проект ФЦП № 14.575.21.0073 "Исследования и разработки" по теме "Разработка тест-систем для индивидуализации лекарственной терапии острых лимфобластных лейкозов у детей на основе профилирования протеома лимфобластов и генетических детерминант системы детоксикации", грант для молодых исследователей в рамках программы повышения конкурентоспособности ведущих университетов «Программа 5-100», № 2016-01/5-100 "Исследование механизмов возникновения раннего апоптоза методом конфокальной спектроскопии комбинационного рассеяния", проект базовой части государственного задания № 3.5022.2017/БЧ "Исследование фотофизических процессов с участием молекул органолюминофоров и наночастиц в испаряющейся капле биологической жидкости" (2017-2019), инициатив-"Исследование штаммов деактивированных Mycobacterium ный проект tuberculosis оптико-спектральными методами" № 7.52.634.2017, в коллаборации с СПбГУ, НИИ Фтизпульмунологии Минздава РФ, грант РНФ № 19-72-00004 "Фундаментальные основы создания нового метода экспресс-оценки лекарственной чувствительности бактерий туберкулеза на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния", грант РНФ № 19-15-00132 "Оценка возможности использования спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния тромбоцитов периферической крови для персонализации антиагрегантной терапии сердечно-сосудистых заболеваний", грант Совета по грантам Президента РФ для молодых кандидатов наук № МК-1056.2019.2 "Разработка физических основ создания биосовместимых и биодеградируемых «умных» нанокомплексов для антитромбоцитарной терапии", проект по созданию центров математического превосходства НОМЦ «Северо-Западный центр математических исследований имени Софьи Ковалевской» (2021-2024 гг.).

### Положения, выносимые на защиту

1. Изменения биохимического состава клеточной мембраны тромбоцитов могут быть установлены на основе спектрального анализа с применением метода гигантского комбинационного рассеяния света на длине волны возбуждения 532 нм по изменениям в установленном наборе линий комбинационного рассеяния света – биохимических маркеров, специфичных для белков, липидов и аминокислот.

2. Биомаркеры метилированных ДНК и РНК, а также резистентности глутатиона и 5-метилцитозина могут служить потенциальными биомаркерами антибиотикорезистенстности, идентифицируемыми посредством спектрального анализа с применением метода гигантского комбинационного рассеяния света на длине волны возбуждения 785 нм.

3. Биомолекулярная интерпретация результатов спектральных экспериментальных данных по комбинационному рассеянию света может быть улучшена с применением квантово-механического расчета методом DFT спектров, отражающих связывание элементов рецептора P2Y12 и фермента COX-1 с тиоловым метаболитом клопидогреля и аспирином соответственно, а составляющих клеточной стенки микобактерии.

4. Биохимические маркеры антибиотикорезистентности, в том числе на уровне одиночных клеток, могут быть установлены методом спектральной дифференциации микобактерий туберкулеза с применением комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света при возбуждении на линиях 532 нм и 785 нм.

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

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

Апробация результатов работы. Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на международных научно-технических конференциях и симпозиумах: SPIE Photonics Europe 2020 (Digital Forum, Страсбург, Франция, 2020), The International Society for Optical Engineering (Ханчжоу, Китай, 2019, 2021, 2022, 2023), IV международный Балтийский морской форум (Калининград, 2016, 2017, 2020), VI Международная молодежная научная школаконференция, посвященная 75-летию НИЯУ МИФИ и 95-летию академика Н.Г.

Басова (Москва, 2017), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2019), XXX Симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2018,2021,2022), 23-я ежегодная конференция Saratov Fall Meeting SFM'19 (Саратов, 2019, 2021, 2022), XXXI Международная школа-симпозиум по голографии, когерентной оптике и фотонике (Екатеринбург, 2019), 7 Урало-Сибирский семинар «Спектроскопия комбинационного рассеяния света» (Екатеринбург, 2021), XXXII международная школа-симпозиум по голографии, когерентной оптике и фотонике (Санкт-Петербург, 2022).

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

**Личный вклад автора**. Автором диссертационной работы лично было получено большинство экспериментальных результатов, в том числе в рамках сотрудничества при реализации грантов и научных проектов. Автор принимал непосредственное участие при выдвижении научных гипотез и их проверки, а также получал, обрабатывал, анализировал полученные данные, готовил публикации в рецензируемых научных изданиях. Экспериментальные исследования проводились на базе научно-образовательного центра «Фундаментальная и прикладная фотоника», ресурсного центра «Оптические и лазерные методы исследования вещества» Санкт-Петербургского государственного университета. Теоретические исследования проводились на базе лаборатории математического моделирования оптических свойств наноструктур НОМЦ «Северо-Западный математический центр имени Софьи Ковалевской». Подготовка биологических образцов микобактерий осуществлялась на базе лаборатории экспериментального туберкулеза Минздрава РФ, а тромбоцитов на базе Центра клинических исследований БФУ им. И. Канта.

**Публикации**. По результатам исследований в рамках темы диссертации опубликованы 56 исследовательских работ, из них 22 – статей в изданиях, входящих в международные базы данных Web of Science/Scopus, 19 работ опубликованы в сборниках трудов международных и всероссийских научных конференций и симпозиумов. Зарегистрировано 4 патента РФ на изобретение, 11 свидетельств о государственной регистрации программ ЭВМ и баз данных.

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

#### Содержание работы

Во введении представлена актуальность проведённых исследований, сформулирована цель, поставлены задачи и отражена научная новизна диссертационной работы. Установлены объект и предмет исследования, перечислены методы исследований. Приведены основные положения, выносимые на защиту, показана практическая ценность достигнутых результатов, а также обоснована степень их достоверности и надежности. Во введении также представлена информация о личном вкладе автора, апробации проведённых работ, а также благодарности.

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

Во второй главе работы представлены методы исследования, детально описан инструментарий, примененный для выполнения данной диссертационной работы. Приведена методология пробоподготовки тромбоцитов и микобактерий, методы исследований их оптических свойств. Описаны эксперименты спектральной флуоресцентной и время-разрешенной спектроскопии. В главе приведена методология исследования с применением методов комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света тромбоцитарной массы, клеток *E.coli*, а также клеток микобактерий туберкулеза, в том числе одиночных. Также детально описан математический инструментарий для обработки спектральных данных и выделения биомаркеров на базе машинного обучения, корреляционного анализа. Детально описаны подходы к DFT моделированию рецепторов и ферментов тромбоцитов, клеточных стенок микобактерий.

В третьей главе представлены результаты исследований фотофизических свойств и биофизических характеристик тромбоцитов, зарегистрированных с применением коллоидных и планарных оптических сенсоров. В частности, сначала были проведены исследования спектральной однородности тромбоцитов, что являлось основополагающим для дальнейшего анализа колебательных спектров тромбоцитов. Был использован комбинированный подход, основанный на применении спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света и методах анализа многомерных данных, таких как метод главных компонент и алгоритмы парной корреляции для исследования однородности спектров тромбоцитов. Рассчитаны коэффициенты корреляции для каждой выборки и оценен средний коэффициент детерминации. Выявлена высокая степень спектральной однородности внутри одной пробы и между ними посредством проведения статистического (метод главных компонент) и корреляционного анализа (метод парных корреляций). Выходные переменные (ГК1, ГК2, ГК3) использовали для описания спектральных различий в спектральных данных тромбоцитов. Рисунок 1 иллюстрирует весь набор данных комбинационного рассеяния, скорректированный и отфильтрованный по базовой линии. Показана хорошая спектральная однородность, за исключением трех аномальных спектров, вызванных артефактами на поверхности ГКР структуры. Усредненные спектры комбинационного рассеяния отмечены красной линией и изображены на рисунке 1.



Рисунок 1. Набор спектральных данных комбинационного рассеяния света (б) и трехмерный график РСА набора тромбоцитов (а).

Для определения сходства между спектрами в работе использовалось расстояние Махаланобиса, которое выступало в качестве специального параметра для анализа спектров клеток крови. Этот метод позволяет точно оценивать различия между спектрами, учитывая не только расстояние между точками в многомерном пространстве, но и ковариацию данных. Это означает, что расстояние Махаланобиса корректирует влияние различных признаков в зависимости от их изменчивости, что делает его особенно полезным в задачах, связанных с анализом многомерных данных. В данной работе было проведено измерение расстояния Махаланобиса (Рисунок 2) для 91 спектра, и результаты показали, что для большинства из них (97%) расстояние не превышало 5. Однако для трех спектров были зафиксированы значительно более высокие значения, равные 14, 32 и 91. Эти результаты указывают на то, что в выборке существуют спектры, которые заметно отличаются от остальных, что может быть признаком их уникальности или наличия каких-либо аномалий. В данном случае, результаты анализа подтвердили, что спектры тромбоцитов однородны<sup>11</sup>.



Рисунке 2. Распределение расстояний Махаланобиса для спектрального набора данных КРС.

Следующим этапом проводилось исследование, в котором участвовали здоровые добровольцы и пациенты с патологией ССЗ. При изучении спектров ГКРС были разрешены и идентифицированы и сравнены характеристики колебательных полос тромбоцитов, включающих аминокислоты: Cys, Phe, Tyr, Trp, дисульфидные мостики, белки, липиды и другие компоненты (Рисунок 3). Различия между спектрами обусловлены проведением антитромбоцитарной терапией и ее влиянием на структуру тромбоцитов. Эта информация может быть использована в качестве характерных маркеров для определения эффективности антитромбоцитарной терапии. Все выявленные характеристические полосы КР тромбоцитов подробно описаны в тексте диссертации.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Silveira Jr L. et al. Independent component analysis applied to Raman spectra for classification of in vitro human coronary arteries //Instrumentation Science and Technology. – 2008. – T. 36. – №. 2. – C. 134-145.



Рисунок 3. Спектры КРС тромбоцитов (на графиках отражена нормированная на максимум интенсивность по оси Y) в области спектра 400-1750 см<sup>-1</sup> у здоровых лиц (синяя линия), здоровых лиц, получающих антитромбоцитарную терапию (зеленая линия) и лиц с сердечно-сосудистой патологией (красная линия) (а) и спектры КРС тромбоцитов в области спектра дисульфидных мостов 450-575 см<sup>-1</sup> для здоровых лиц (синяя линия) и лиц с сердечно-сосудистой патологией (красная линия) (б).

В рамках данной работы были исследованы также спектральные и временные флуоресцентные фотопроцессы в тромбоцитах человека и их комплексах с наночастицами платины. В результате проведенной работы была выявлена возможность плазмонного переноса энергии между НЧ платины, мембраной тромбоцитов и ее составляющими. Для исследования описанных фотопроцессов применялись как экспериментальные, так и теоретические подходы. На рисунке 4 представлены спектры флуоресценции тромбоцитов и флуоресценции ароматических аминокислот (контроль). При сравнении теоретических и экспериментальных данных было установлено, что максимумы Trp показали наилучшую корреляцию, тогда как Tyr и Phe показали минимальную корреляцию и отсутствие корреляции соответственно. Обсуждая Trp, мы предположили, что в спектре присутствуют три остатка Trp и/или один остаток Tyr. Пик флуоресценции Trp при  $\lambda = 357$  нм относится к изолированному Trp в воде<sup>12</sup>. Пик при  $\lambda = 317$  нм указывает на глубоко погребенный Trp в мембранных белках или мембране тромбоцитов или замаскированный Tyr. Пик, возникающий при  $\lambda = 330$  нм, может обозначать остатки

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Hellmann N., Schneider D. Hands on: using tryptophan fluorescence spectroscopy to study protein structure //Protein Supersecondary Structures: Methods and Protocols. – 2019. – C. 379-401.

Тгр на поверхности мембраны тромбоцитов или поверхности рецепторов тромбоцитов<sup>13</sup>. Следует отметить, что Рhe имел чрезвычайно низкую интенсивность флуоресценции <sup>14</sup> при возбуждении на  $\lambda = 240$  нм.

По результатам спектральных измерений отмечены колебания интенсивности флуоресценции тромбоцитов как в отсутствие НЧ Рt, так и в их присутствии. Общая интенсивность уменьшалась при допировании тромбоцитарной массы НЧ Pt. В отсутствие НЧ Pt максимальная интенсивность флуоресценции достигала максимального и минимального значений 3,01·10<sup>6</sup> и 1,43·10<sup>6</sup> отн.ед. соответственно.



Рисунок 4. Спектры поглощения НЧ Рt (синяя пунктирная линия), тромбоцитов (синяя сплошная линия), Trp (зеленая сплошная линия), Tyr (красная сплошная линия) и Phe (фиолетовая сплошная линия) спектры флуоресценции (а) и результаты моделирования Гаусса для экспериментальной кривой флуоресценции тромбоцитов (темно-синяя линия), включая: кривую свободного Trp (синяя линия), Trp на мембране тромбоцитов (зеленая линия) и скрытый/замаскированный остаток Tyr/Trp (красная сплошная линия) (б).

По результатам FRET расчетов установлено, что  $R_0$  не претерпевает существенных изменений и составляет 38 Å, тогда как расстояние между HЧ Pt и тромбоцитом колеблется в диапазоне 65 - 78 Å. Несмотря на то, что эффективность переноса была достаточно низкой (1-6%), скорость диполь-дипольного переноса была достаточно высокой, достигая для образца PLT3 1,91·10<sup>8</sup> с<sup>-1</sup>. Высокая скорость передачи энергии может быть объяснена небольшим расстоянием между

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Saboor M. et al. Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology //Pakistan journal of medical sciences. – 2013. – T. 29. – №. 3. – C. 891.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Chen R. F. Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine //Analytical Letters. – 1967. – T. 1. – №. 1. – C. 35-42.

тромбоцитами и НЧ. Этот результат коррелирует с механизмами передачи энергии и их объяснениями<sup>15,16</sup>. П

Проведено исследование флуоресцентных характеристик аминокислот тромбоцитов — в частности, флуоресценции, квантового выхода и времени жизни — в присутствии и в отсутствии наночастиц платины (НЧ Pt), синтезированных методом лазерной абляции. Для оценки энергетических параметров взаимодействия использовалась модель резонансного переноса энергии по Фёрстеру. Установлена возможность энергообмена между НЧ Рt и белками тромбоцитов, что свидетельствует о наличии эффективного механизма переноса энергии. Полученные результаты указывают на перспективность применения наночастиц платины в качестве платформы для создания сенсоров тушения флуоресценции. Такие сенсоры могут быть использованы для изучения мембранной организации тромбоцитов и их рецепторного аппарата, а также для мониторинга биофизических изменений, возникающих при антитромбоцитарной терапии, в процессе тромбообразования и при других патофизиологических состояниях сердечно-сосудистой системы. Следует отметить, что другие аминокислоты, такие как His, также могут быть перспективными кандидатами для будущих флуоресцентных исследований с использованием длин волн возбуждения  $\lambda$ =200-250 нм<sup>17</sup>.

Отдельной задачей диссертации являлось разработка алгоритмов классификации полученных спектров и выделение конкретных маркеров, различающих выборки. Для этого были разработаны алгоритмы на базе машинного обучения, с помощью которых были выделены возможные биохимические маркеры, классифицирующие выборки. Так, был разработан алгоритм классификации спектров и выделения биомаркеров для исследуемых групп пациентов.

Заключительным шагом было проведено сравнение используемых алгоритмов и построенных моделей, в котором было проведено сравнение применяемых алгоритмов машинного обучения с помощью матриц неточностей, отраженных в диссертации, инструмента, используемого в машинном обучении для оценки производительности классификационных моделей. С помощью матрицы были выявлены выявить типы ошибок, которые совершала модель. Например, она позволяла определить, сколько объектов было ложно классифицировано как положительные или отрицательные. Далее была определена точность выявления наблюдений, определены верные группы показывает алгоритм логистической регрессии. В Таблице 1 приведены результаты сравнения применяемых моделей.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Chau Y. F. C. et al. Plasmonic effects in composite metal nanostructures for ЛЧ-ТБing applications //Journal of Nanoparticle Research. – 2018. – T. 20. – C. 1-13.

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Chau Y. F. C. et al. Plasmonic perfect absorber based on metal nanorod arrays connected with veins //Results in Physics. – 2019. – T. 15. – C. 102567.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Iwunze M. O. The characterization of the fluorescence of I-histidine in simulated body fluid //Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2007. – T. 186. – №. 2-3. – C. 283-289.

	, J 1	1 , ,
Алгоритм обработки	Тренировочный ре-	Тестовый результат
	зультат	
Логистическая регрес-	0,75	0,76
сия		
Метод ближайших сосе-	0,79	0,67
дей		
Случайный лес	1	0,73
Дерево решений	1	0,64

Таблица 1. Результаты сравнения применяемых моделей

Было установлено, что модель логистической регрессии показала наилучшие результаты с более высокой точностью, как на тренировочном, так и на тестовом наборе данных, по сравнению с другими моделями. KNN показала высокую точность на тренировочных данных, но ее точность на тестовых данных ниже. Это может свидетельствовать о переобучении модели или ее ограниченной способности обобщать данные. Другие модели, такие как KNN, RandomForest и DecisionTree, могут быть полезными в определенных сценариях, но они могут требовать дополнительной настройки и учета особенностей данных для достижения лучших результатов. Важно также учитывать, что точность моделей не является единственной метрикой для оценки их производительности. Для полной оценки моделей мы рассматривали и другие метрики, такие как полнота, точность, F1мера и т. д., а также провели анализ ошибок и проверить их интерпретируемость и практическую применимость в конкретной задаче.

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

В результате этого исследования были продемонстрированы результаты по разработке методов машинного обучения для дифференциации спектров КР у па-

циентов с сердечно-сосудистыми патологиями и без них, в том числе при действии терапии. Применены подходы к обработке массивов спектральных данных, состоящих из 1266 спектров, для различных групп пациентов: здоровых пациентов, пациентов с патологией сердечно-сосудистых заболеваний, здоровых пациентов, получающих терапию, и пациентов с патологией сердечно-сосудистых заболеваний, получающих терапию. Показана применимость алгоритма случайного леса. Выявлены потенциальные биомаркеры различий между группами пациентов, на которых тестировались данные алгоритмы. Достигнутая точность классификации с помощью алгоритма случайного леса спектров по группам здоровых пациентов без терапии и больных с сердечно-сосудистой патологией без терапии составила 83,4%. При классификации терапии у здоровых пациентов точность составила 76,26%, у больных с сердечно-сосудистой патологией - 70%.

В четвертой главе представлены результаты биофизического анализа клеток *E.coli* и *M.tuberculosis*, в том числе одиночных. Для решения задач диссертации были применены оптические сенсоры на базе плазмонного эффекта, обладающие свойствами генерации плазмонного резонанса в видимой и ближней ИКобласти. Был зарегистрирован спектральный профиль клеток.

В результате проведенного анализа выявлены биомаркеры действия антибиотиков на чувствительный штамм *E.coli*. Установлено его действие на ароматические компоненты, составляющие клеточную стенку бактерии. Для нуклеиновых кислот наблюдался сдвиг максимумов с 735 см<sup>-1</sup> на 727 см<sup>-1</sup>, с 771 см<sup>-1</sup> на 785 см<sup>-1</sup>, уменьшение интенсивности максимумов нуклеиновых кислот на 672 см<sup>-1</sup>, 812 см<sup>-1</sup> и 1575 см<sup>-1</sup>, однако на 1483 см<sup>-1</sup> можно наблюдать увеличение интенсивности. Для белковых полос можно наблюдать снижение интенсивности максимумов на 855 см<sup>-1</sup>, 1003 см<sup>-1</sup>, 1031 см<sup>-1</sup>, 1246 см<sup>-1</sup>. Для липидной полосы было определено уменьшение интенсивности на 1064 см<sup>-1</sup>, уменьшение интенсивности и сдвиг с 1295 см<sup>-1</sup> на 1300 см<sup>-1</sup>.

В случае воздействия антибиотика ципрофлоксацина, было установлено, что интенсивность колебательных полос нуклеиновых кислот на 672 см<sup>-1</sup> и 727 см<sup>-1</sup> после взаимодействия с лекарственным препаратом увеличилась. Интенсивность максимумов на 785 см<sup>-1</sup>, 812 см<sup>-1</sup> и 1483 см<sup>-1</sup>, наоборот, уменьшились так, что с трудом можно их идентифицировать. Колебательная полоса на 1095 см<sup>-1</sup> также изменила свою интенсивность. Однако это увеличение тяжело приписать только к изменению нуклеиновой группы, поскольку форма спектра КРС ципрофлоксацина в области 1057 см<sup>-1</sup> - 1105 см<sup>-1</sup> имеют одинаковую форму с формой бактерий под воздействием препарата. В связи с этим, такое изменение может быть результирующей от двух анализируемых образцов: бактерии и антибиотика. Для липидной группы характерен максимум на 1300 см<sup>-1</sup>. Несмотря на то, что три анализируемых графика имеют максимум в этой области, у бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом происходит уменьшение интенсивности так, что можно говорить о действии лекарственного препарата на образец, а не на получение результирующего спектра. Максимум на 1440 см<sup>-1</sup> также становится менее интенсивным. При рассмотрении белковых групп было определено следующее: колебательная мода на 832 см<sup>-1</sup> становится менее интенсивной и сдвигается на 827 см<sup>-1</sup>, а максимум с 855 см<sup>-1</sup> сдвигается на 862 см<sup>-1</sup>. Происходит спектральные сдвиги с 1010 см<sup>-1</sup> на 1001 см<sup>-1</sup> и с 1030 см<sup>-1</sup> на 1040 см<sup>-1</sup> с уменьшением интенсивности.

В случае воздействия на клетку воздействия ампициллина + сульбактама на чувствительный штамм *E.coli* удалось определить изменения в некоторых колебательных полосах нуклеиновых кислот: максимум на 1095 см<sup>-1</sup> у бактерий после взаимодействия с ампициллином + сульбактамом становится менее интенсивным. В колебательных полосах липидной группы также можно наблюдать изменения интенсивности колебательных полос на  $1065^{-1}$  и 1293 см<sup>-1</sup>. Однако при рассмотрении максимума на 1455 см<sup>-1</sup> было определено не только уменьшение интенсивности после взаимодействия с препаратом, но и сдвиг на 1443 см<sup>-1</sup>. При дифференциации полос белков было определено уменьшение интенсивности и сдвиг максимума с 830 см<sup>-1</sup> на 837 см<sup>-1</sup>. Максимум на 855 см<sup>-1</sup> у бактерий под действием лекарственного препарата не был идентифицирован, в отличие от контроля.

По результатам воздействия на клетку тетрациклином было установлено, что для нуклеиновых кислот некоторые максимумы сдвигаются, например, с 726 см<sup>-1</sup> на 731 см<sup>-1</sup> с уменьшением интенсивности, и с 1483 см<sup>-1</sup> на 1478 см<sup>-1</sup>. При рассмотрении липидной группы можно заметить следующие особенности: максимум на 1065 см<sup>-1</sup> у чувствительного штамма не интенсивен, однако после воздействия на *E.coli* тетрациклином наблюдается рост интенсивности этого максимума. Однако для максимума на 1300 см<sup>-1</sup> наблюдается обратная картина: у контроля бактерий этот максимум можно различить, а после взаимодействия с лекарственным препаратом он заметно уменьшается. Максимумы на 1440 см<sup>-1</sup> и 1452 см<sup>-1</sup> после добавления ципрофлоксацина сдвигаются на 1445 см<sup>-1</sup> и 1458 см<sup>-1</sup> соответственно. Для белковой группы также наблюдается спектральный сдвиг полос: с 840 см<sup>-1</sup> на 830 см<sup>-1</sup>, сдвиг с уменьшением интенсивности с 1004 см<sup>-1</sup> на 1000 см<sup>-1</sup>, сдвиг с увеличением интенсивности с 1032 см<sup>-1</sup> на 1025 см<sup>-1</sup>.

В результате воздействия рифампицина на чувствительный штамм E.Coli, были выявлены спектральные биомаркеры изменений, характерные для ДНК и нуклеиновых кислот, в результате чего некоторые максимумы сдвигаются, например, с 785 см<sup>-1</sup> на 791 см<sup>-1</sup> с уменьшением интенсивности и красным сдвигом, и уменьшении интенсивности 1295 см<sup>-1</sup> на 1310 см<sup>-1</sup>.

В итоге, по результатам выполненной работы были выявлены характерные спектральные особенности воздействия антибиотиков на чувствительный штамм *E. coli* для ароматических соединений, формирующих бактериальную стенку. Было установлено, что для нуклеиновых кислот наблюдался сдвиг максимумов в низкочастном диапазоне спектрального сдвига, а также уменьшение интенсивности максимумов нуклеиновых кислот, белковых полос. По результатам исследований основным маркером клеточной гибели была выделена и являлась полоса фенилаланина на частоте обратного сдвига 1003 см<sup>-1</sup>, связанного с жизненным циклом клетки. Проведена идентификация спектральных мод, наблюдаемых в усредненном спектре. Также было показано уменьшение интенсивности спектральных полос, относящиеся к пуриновым метаболитам, аминокислотам, что указывает на инактивацию жизнедеятельности бактерий и свидетельствует об эффективной антибактериальной активности антибиотика. По результатам исследования установлено, что маркером клеточной гибели может являться полоса фенилаланина на частоте обратного сдвига антибиотика. По результатам исследования установлено, что маркером клеточной гибели может являться полоса фенилаланина на частоте обратного сдвига 1003 см<sup>-1</sup>.

После работы с *E.Coli*, были проведены КРС и ГКРС исследования микобактерий туберкулеза. В связи со сложным строением клеточной стенки микобактерий и их спектральной отличимостью от других бактериальных видов, для выявления внутриштаммовых различий между микобактериями с различными профилями лекарственной устойчивости был проведён анализ основных компонентов клеточной стенки (см. рисунок 5) с использованием спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света. Анализ возможных изменений проводился последовательно для каждого элемента клеточной стенки, который может претерпевать молекулярные изменения в процессе приобретения антибиотикорезистентности.



Рисунок 5. Схематическое представление клеточной стенки микобактерии<sup>18</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Tang M. et al. Characterization and analysis of mycobacteria and Gram-negative bacteria and co-culture mixtures by Raman microspectroscopy, FTIR, and atomic force microscopy //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2013. – T. 405. – № 5. – C. 1577-1591

Полученные спектральные данные были проанализированы в среднечастотном (600 см<sup>-1</sup>–1800 см<sup>-1</sup>) и высокочастотном (2500 см<sup>-1</sup>–3100 см<sup>-1</sup>) диапазонах с целью выявления возможных изменений в составе миколовых кислот, арабиногалактана, пептидогликана, белков и липидов, входящих в структуру клеточной стенки микобактерий (см. рисунок 6).В результате проведения экспериментов спектроскопии комбинационного рассеяния света была получена характерная спектральная картина для референтных и клинических штаммов микобактерий туберкулеза. Успешно зарегистрированы спектры клинических штаммов чувствительных (ЛЧ-ТБ), множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ), а также референтных Н37Rv Пражский и Н37Rv США. Для внелегочных штаммов ЛЧ-ТБ, МЛУ, ШЛУ были зарегистрированы спектры комбинационного рассеяния света, выявлены и отмечены характеристические максимумы спектральной картины конгломератов бактериальных клеток. Для анализа для всех спектров была выполнена фильтрация шумов, коррекция базовой линии, произведена нормировка на максимум интенсивности.



Рисунок 6. Нормированные, подвергнутые фильтрации и коррекции базовой линии спектры комбинационного рассеяния света для легочных и референтных штаммов (А) и внелегочных штаммов различной антибиотикорезистентности (Б).

Для более точного анализа полученные спектры комбинационного рассеяния света были нормированы на максимум интенсивности и откорректированы. Полученные в результате анализа колебательные частоты сведены в Таблицу 2. В таблице отражены колебательные максимумы для низкочастотной и среднечастотной областей спектра. Были идентифицированы спектральные колебания для липидов, пептидов, ДНК, аминокислот и других элементов, входящих в состав микобактерии для штаммов легочной и внелегочной локализации. В Таблице 2 приведена спектральная картина для штаммов микобактерий легочной локализации.

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

Таблица 2. Колебательные частоты для легочных штаммов ЛЧ-ТБ, МЛУ, ШЛУ

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



Рисунок 7. Интенсивность основных характеристических максимумов для легочных штаммов (А) и внелегочных штаммов микобактерий (Б).

По результатам анализа интенсивности колебательных мод микобактерий (Рисунок 7) для легочной и внелегочной локализации было показано, что интенсивность максимума на частоте 1437 см<sup>-1</sup> от ЛЧ-ТБ к ШЛУ уменьшалась, тогда, как максимум на 1061 см<sup>-1</sup> увеличивался. Интенсивность спектрального максимума на 1171 см<sup>-1</sup>, характерного для глутатиона, уменьшалась от ЛЧ-ТБ к ШЛУ. Для МЛУ и ШЛУ штаммов было отмечено увеличение интенсивности спектральных максимумов для сдвигов волн 621 см<sup>-1</sup>, 823 см<sup>-1</sup>, 847 см<sup>-1</sup>, 918 см<sup>-1</sup> 1059 см<sup>-1</sup> и 1255 см-1. Поскольку легочные и внелегочные штаммы внутри одного вида микробиологически отличны<sup>19</sup>, возможно различие характеристических мод для искомых в проекте спектральных биомаркеров антибиотикорезистентности. В частности, поведение спектральных максимумов, характеризующих слой миколовых кислот и глутатиона различно для легочных и внелегочных штаммов. Предполагается увеличение плотности слоя миколовых кислот, что характеризуется увеличением интенсивности колебаний при 1062 см<sup>-1</sup>, что в свою очередь коррелирует с интенсивностью детектируемого сигнала и антибиотикорезистентностью бактерии (от ЛЧ-ТБ к ШЛУ). В работе проведен детальный анализ липидного состава спектров

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Khosravi A. D. et al. Identification of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens of patients suspected of having extrapulmonary tuberculosis by application of nested PCR on five different genes //Frontiers in cellular and infection microbiology. -2017. - T. 7. - C. 3

микобактерий в высокочастотной области. Были выявлены различия в спектральных картинах для легочных и внелегочных штаммов, а также штаммов с различной антибиотикорезистентностью внутри образцов одного штамма (Рисунок 8).



Рисунок 8. Спектры комбинационного рассеяния света для легочных (А) и внелегочных штаммов (Б) для ЛЧ-ТБ (синяя линия), МЛУ (желтая линия), ШЛУ (красная линия) микобактерий. Дополнительно, для анализа проводилось разложения каждого спектра с использованием гауссиан (вставки).

В тоже время, с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света спектроскопии были зарегистрированы и идентифицированы колебательные полосы компонентов микобактериальных клеток в спектральной области с высокими волновыми числами: липидов и белков. Наблюдались различия между спектрами в составе и структуре клеточной стенки для чувствительных и резистентных штаммов. Для асимметричных колебаний липидов и белков изменений не было обнаружено, но было получено небольшое уменьшение колебаний CH<sub>2</sub>, связанных с содержимым ядра клетки. Штаммы легочных МЛУ показывают максимальную интенсивность липидов, но внелегочные штаммы ШЛУ также показывают максимальную интенсивность полосы, характеризующей составляющие ядра клетки. Также, как и в вышеописанных данных для легочных штаммов в целом наблюдалось увеличение интенсивности спектральных компонент в сравнении ЛЧ-ТБ и ШЛУ (там, где изменение было зарегистрировано), а во внелегочных штаммах наблюдалась противоположная картина. Данная информация может быть использована в качестве характерных маркеров для различения лекарственно-чувствительных, МЛУ и ШЛУ легочных и внелегочных штаммов МБТ. Для определения основных различий между различными штаммами туберкулеза легких и внелегочного туберкулеза следует отметить, что основное различие

между штаммами туберкулеза легких и внелегочного туберкулеза заключается в интенсивности липидных спектральных максимумов при 2847 см<sup>-1</sup> и 2932 см<sup>-1</sup>.

Поскольку одной из потенциальных полос, характеризующих изменение антибиотикорезистентности был максимум на 1171 см<sup>-1</sup>, характерный для колебаний глутатиона, с применением КР-спектроскопии были проведены дополнительные исследования с использованием Не-Ne лазера с длиной волны  $\lambda$ =632.8 нм для более детального изучения поведения спектральной картины в области 1000-1500 см<sup>-1</sup>. С применением КР и ГКР спектроскопии были анализированы полученные спектры бактериальных конгломератов размером 5x5 микрон, была определена спектральная картина для каждого штамма исследуемых микобактерий. Бактериальный конгломерат состоял из одного «монослоя» бактерий. Было отмечено изменение интенсивности колебания на 1171 см<sup>-1</sup>, характерного для колебательных групп глутатиона (GSH). Был проведен детальный анализ спектральной картины в области 1000-1500 см<sup>-1</sup> и сравнение с референтными штаммами.

Таким образом, с помощью КР-спектроскопии был анализированы моды трипептида глутатиона, состоящего из L-цистеина, глицина и L-глутамата, который (или его составляющие) может являться потенциальным маркером антибиотикорезистентности к кислородосодержащим производным азота. Такие производные широко используются в составе широко распространенных противотуберкулезных препаратов, таких как индозилин и изониазид. Глутатион также может обеспечивать сопротивление клетки активным формам кислорода. Основываясь на результатах теоретического моделирования для связей глутатиона, полученные экспериментальные спектры были соотнесены с теоретическими расчетами. Основными критериями оценки были: положение спектрального максимума и его интенсивность. Поскольку известно, что глутатион играет важную роль в активации НК-клеток (натуральных клеток), это может приводить к смерти микобактерии. С другой стороны, микобактерия не синтезирует глутатион, но синтезирует субстанцию микотиол, структура которой сходна по строению к глутатиону. Следует также отметить, что глутатион способен либо интегрироваться в структуру клеточной стенки, либо ковалентно связываться с её поверхностью. Кроме того, в условиях терапии с использованием оксида азота (NO) глутатион может образовывать S-нитрозоглутатион — соединение, формирующееся в результате взаимодействия с NO на поверхности клеточной стенки. Несмотря на то, что S-нитрозоглутатион не способен проникать внутрь клетки, производное соединение — S-нитрозо-L-цистеинглицин — может транспортироваться через клеточные каналы. Внутри клетки оно высвобождает NO, что приводит к цитотоксическому эффекту и гибели клетки.

Отдельным этапом работ являлось исследование с применением методик ГКРС единичных клеток микобактерий туберкулеза и проведение их спектрального

картирования в разных точках клетки. На Рисунке 9 отображены картируемые бактериальные клетки на структуре ГКРС Silmeco. Точками обозначены места позиционирования лазера в процессе съемки спектра, выбранные в процессе картирования на спектрометре Centerra. Время экспозиции для каждой точки составляло 70 секунд, мощность излучения составляла 50 мвт.







B)



Γ)



Д)



E)

Рисунок 9. 100х оптические изображения единичных бактериальных клеток при реализации ГКР-картирования легочных и внелегочных ЛЧ-ТБ (А,Б), МЛУ (В,Г) и ШЛУ (Д,Е) штаммов микобактерий туберкулеза. Стрелкой обозначено место позиционирования лазерного луча. Были выбраны и подробно проанализированы два потенциальных спектральных биомаркера для детального анализа – полосы глутатиона (при 1171 см<sup>-1</sup>) и метилированные сигнатуры ДНК (в диапазоне 700-800 см<sup>-1</sup>). Как процесс метилирование ДНК, так и глутатион участвуют в формировании устойчивости бактерий к действию антибиотиков (Рисунок 10).



Рисунок 10. Легочные штаммы микобактерий с различной антибиотикорезистентностью: ТБ-ЧВ (синяя линия), МЛУ (оранжевая линия), ШЛУ (красная линия). (А) идентифицированные максимумы в области 700-800 см<sup>-1</sup>: 722 см<sup>-1</sup> - пурин/пиримидин; 747 см<sup>-1</sup> - тимин; 772/776 см<sup>-1</sup> - цитозин/урацил; (Б) идентифицированный максимум 1002 см<sup>-1</sup> - фенилаланин (В) идентифицированные максимумы в диапазоне 1100-1200 см<sup>-1</sup> диапазон: 1123 см<sup>-1</sup> - ДНК/РНК-основа; 1169 см<sup>-1</sup> - глутатион.

Интенсивность спектральной полосы 747 см<sup>-1</sup> может коррелировать с метилированием полосы тимина в ДНК<sup>20</sup>. Интенсивность спектральной полосы 1169 см<sup>-1</sup> может коррелировать с глутатионом в *MbT*. На рис. 10а и рис. 10в видно, что интенсивность этих полос практически равна 0 для чувствительного штамма, тогда как для штаммов с антибиотикорезистентностью интенсивность этих колебаний очевидна.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Kim J. et al. Label-free detection for a DNA methylation assay using Raman spectroscopy //Chinese Medical Journal. – 2017. – T. 130. – №. 16. – C. 1961-1967



Рисунок 11. Внелегочные штаммы микобактерий с различной антибиотикорезистентностью: ТБ-ЧВ (SENS) (синяя линия), МЛУ (MDR) (оранжевая линия), ШЛУ (XDR) (красная линия). (А) идентифицированные максимумы в области 720-780 см<sup>-1</sup>: 733 см<sup>-1</sup> - аденин; (Б) идентифицированный максимум 1001 см<sup>-1</sup> - фенилаланин (В) идентифицированные максимумы в 1100 -1200 см<sup>-1</sup> диапазон:1152 см<sup>-1</sup>-N-Н и С-Н группы; 1171 см<sup>-1</sup> - глутатион;

В случае внелегочных образцов (Рис. 11 (А-В)), пик, соответствующий аденину в штаммах МЛУ и ШЛУ может быть идентифицирован на частоте спектрального сдвига 733 см<sup>-1</sup>. Второй диапазон 980-1020 см<sup>-1</sup> представленный на Рис. 116 также представляет интерес с точки зрения как маркеров метилирования ДНК в резистентности, так и фенилаланина, который является аминокислотой, играющей важную роль в метаболизме патогенов. Кроме того, фенилаланин также участвует в регуляции экспрессии генов и факторов вирулентности у микобактерий туберкулеза. Поскольку пики фенилаланина, расположенные при 1002 см<sup>-1</sup> и 5-метилцистеина при 1005 см<sup>-1</sup> расположены довольно близко друг к другу, видно на Рис. 11б, что они могут перекрываться для штаммов с ШЛУ. Показано, что на рис. 116, характеристики пика фенилаланина идентичны для всех внелегочных штаммов. Другой заметной спектральной особенностью является линия рамановского спектра, расположенная в районе частоты 1170 см<sup>-1</sup>. На рис. 10в хорошо видно, что интенсивность этой полосы, расположенной на частоте 1169 см<sup>-1</sup> близка к нулю для чувствительного штамма легочной локализации, но заметна для штаммов с устойчивостью к антибиотикам. В случае внелегочных штаммов для этого максимума наблюдалась противоположная картина. Было показано, что эта полоса была связана с глутатионом (GSH), как соответствующая одной из основных спектральных линий этой биомолекулы, участвующей в иммунном ответе хозяина на внешнее воздействие микобактерии. Стоит отметить, что в случае внелегочных штаммах наблюдается более сложная картина, чем в штаммах легочной

локализации. Интенсивность колебания метильной группы ДНК (733 см<sup>-1</sup>) снижается от ШЛУ к ТБ-ЧВ, тогда как максимум глутатиона при 1171 см<sup>-1</sup> снижается от ТБ-ЧВ к ШЛУ. ШЛУ штаммы могут быть зарегистрированы с помощью ГКРС методик. Кроме того, большое количество спектральной информации о ДНК позволило получить две спектральные характеристики ГКРС (полосы ГКРС при 730 см<sup>-1</sup> и 1171 см<sup>-1</sup>) – потенциальные биомаркеры резистентности. По результатам спектрального картирования были получены также спектральные картины для микобактерий всей штаммов.

В пятой главе была осуществлена проверка гипотезы об использовании инструментов квантово-механического моделирования для уточнения биомаркеров ответа на антиагрегантную терапию. Поскольку спектры тромбоцитов достоаточно сложные, выявление биомаркеров, характеризующих изменения их молекулярной структуры было уточнено покомпонентным расчетом оптических спектров комбинационного рассеяния света в месте связывания антитромботика и рецептора Р2Ү12 (для клопидогреля) и фермента СОХ-1 для аспирина. Для этого была выбрана часть рецептора циклооксигеназы СОХ-1, а также часть рецептора Р2Ү12 тромбоцитов. Проверялась гипотеза о возможности подтверждения экспериментально полученных биомаркеров при образовании связей между частью фермента/рецептора и аспирином/клопидогрелем и путем расчета соотвествующих колебательных полос. Для этого, с помощью программного пакета Gaussian 16 была рассчитана стыковка Arg и активного метаболита клопидогрела и аспирина на рецепторах P2Y12 и ЦОГ-1 тромбоцитов соответственно. Структуры были получены из банка данных белков (PDB). Мишенью для ЦОГ-1 был выбран аспирин, мишенью Р2Ү12 был выбран активный тиольный метаболит клопидогреля Н4. На основе полученных в данной главе результатов был реализован и апробирован подход, основанный на математическом моделировании спектров комбинационного рассеяния света (КРС) с использованием метода функционала плотности (DFT) для антитромбоцитарного препарата, а также для анализа взаимодействия целевого тромбоцитарного рецептора с ферментом в локализованной области. Выявлены полосы комбинационного рассеяния света, соответствующие препарату аспирин/клопидогрел и его взаимодействию в месте связывания. Определенные колебательные моды могут быть потенциальными биомаркерами взаимодействия клопидогреля/аспирина с соответствующими рецепторами тромбоцитов (Р2Ү12/СОХ-1). В результате выполненной работы были получены теоретические КРС спектры области взаимодействия лекарственного средства с рецептором. Уточнены полосы характеристик, соответствующие колебаниям метаболитов/ферментов и антиагрегантов. Показана перспективность получения результатов по патологиям, основанным на конформациях белков тромбоцитов при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Также, в результате выполненной работы были произведены расчеты компонент клеточной стенки микобактерии методом DFT. Получены теоретические спектры КРС для разных типов миколовых кислот (альфа, кето, метокси), а также элементов арабиногалактана. Теоретические данные были сопоставлены с полученными ранее экспериментальными результатами главы 3. Для КРС микобактерий для штаммов, описанных в методологической главе работы, уточнены полученные ранее результаты изменений спектральной картины тромбоцитов при действии антитромботиков. Приводятся рассчитанные теоретические КРС спектры соединений, входящих в состав бактериальной стенки микобактерий. Уточнены и подтверждены полосы спектральных характеристик, соответствующие колебаниям альфа-, кето-, метокси-миколовых кислот на частотах 1061 см<sup>-1</sup>, 1295 см<sup>-1</sup> и 1437 см<sup>-1</sup> и арабиногалактана на 822 см<sup>-1</sup>, 1076 см<sup>-1</sup>, 1269 см<sup>-1</sup>. Было показано, что колебательные КРС спектры могут быть рассчитаны с помощью DFT. Этот подход может быть применен для отдельных компонентов клеточной стенки, их составных частей, после чего они могут быть сопоставлены с экспериментальными результатами. Ввиду разной интенсивности максимумов и выделения теоретических спектров по каждой миколовой кислоте, этот факт может быть использован как для дифференциации чувствительных и резистентных клеток, так и для анализа места действия препарата на мишень. Данные результаты демонстрируют перспективы использования предложенных подходов для исследования изменений в проблемах для *MbT*, связанных с устойчивостью к антибиотикам.

### Основные результаты и выводы

1) Для исследования морфологических и оптических свойств тромбоцитов, бактерий *E. coli*, микобактерий *M. tuberculosis* применены планарные и коллоидные оптические сенсоры на базе плазмонного резонанса и выработана оптимальная методология проведения соответствующих экспериментальных процедур.

2) Исследовано различие между состоянием нормы, отклонением от нее и воздействием лекарственных препаратов для микобактерий туберкулеза (в том числе единичных), обладающих различным статусом антибиотикорезистентности, кишечной палочки *E. coli*, тромбоцитов при наступлении патологии ССЗ, отражающееся на спектральных характеристиках данных биообъектов. 3) Проведен анализ биомолекулярно-релевантных особенностей, отражающихся в специфике спектральных характеристик рассеяния на клетках методом гигантского комбинационного рассеяния света при использовании возбуждающего излучения с длинами волн λ=532 нм, λ=632.8 нм, λ=785 нм.

4) На основе проведенного комплекса исследований разработаны методы выделения наиболее информативных спектральных полос, служащих биомаркерами для определения степени антибиотикорезистентности бактерий и определения состояния тромбоцитов на основе существенных выборок спектральных данных и их групп; релевантность идентификации таких биомаркеров обоснована с применением многомерных методов статистического анализа (машинное обучение, корреляционный анализ и др.)

5) На основе анализа изменения значений совокупности выделенных биомаркеров при различных условиях аргументированы механизмы биофизических процессов, приводящих к изменениям в рецепторах P2Y12 тромбоцитов под воздействием лекарственных средств, а также антибиотикорезистентности кишечной палочки *E. coli* и микобактерий туберкулеза.

6) Анализ натурных экспериментальных данных позволил сформулировать положения о молекулярно-биологических механизмах, влияющих на изменения спектральных биомаркеров рецепторов P2Y12 и компонентов клеточных стенок микобактерий туберкулёза. Дополнительное подтверждение этих положений получено на основе результатов, полученных с применением разработанного подхода к моделированию бимолекулярных спектров с использованием метода теории функционала плотности (DFT). Данный подход открывает перспективы для *in silico*-скрининга новых веществ-кандидатов в лекарственные препараты, направленных на структуры клеточной стенки, что может способствовать созданию более эффективных средств терапии туберкулёза и расширению методов поиска новых антибиотиков.

### Список публикаций автора по теме диссертации

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК и индексируемых международными базами научного цитирования Scopus/Web of Science:

 Zyubin A., Rafalskiy, V., Lopatin, M., Demishkevich, E., Moiseeva, E., Matveeva, K., Kon I., Khankaev A., Kundalevich A., Butova V., Lipnevich L., Lyatun I., Samusev I. & Bryukhanov, V. Spectral homogeneity of human platelets investigated by SERS //PLOS ONE. – 2022. – T. 17. – №. 5. – C. e0265247. K1

- Kundalevich, A., Kapitunova, A., Berezin, K., Zyubin, A., Moiseeva, E., Rafalskiy, V., & Samusev, I. Raman spectra simulation of antiplatelet drug-platelet interaction using DFT //Scientific Reports. 2024. T. 14. №. 1. C. 1445. K1
- Matveeva K., Zyubin A., Demishkevich E., Rafalskiy V., Moiseeva E., Kon I., Kundalevich A., Butova V., Samusev, I. Spectral and time-resolved photoluminescence of human platelets doped with platinum nanoparticles //PLOS ONE. – 2021. – T. 16. – №. 9. – C. e0256621. K1
- Matveeva K., Zyubin A., Ognedyuk A., Demishkevich E., Kon I., & Samusev I. Photophysical properties of Au and Au@SiO<sub>2</sub> Nanoparticle-Dye Complexes in Mesoporous Silica Matrices for Theranostics Purposes //Romanian Journal of Physics. 2021. T. 66. №. 7-8. K1
- Zyubin A., Kon, I., Tcibulnikova A., Matveeva K., Khankaev A. Numerical FDTDbased simulations and Raman experiments of femtosecond LIPSS //Optics Express. - 2021. - T. 29. - №. 3. - C. 4547-4558. K1
- Zyubin A., Rafalskiy V., Tcibulnikova A., Moiseeva E., Matveeva K., Tsapkova A., Lyatun I., Medvedskaya P., Samusev I., Demin M. Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment //Laser Physics Letters. – 2020. – T. 17. – №. 4. – C. 045601. K1
- Zyubin A., Rafalskiy V., Tcibulnikova A., Matveeva K., Moiseeva E., Tsapkova A., Samusev I., Bryukhanov V., Demin M. Dataset of human platelets in healthy and individuals with cardiovascular pathology obtained by Surface-enhanced Raman spectroscopy //Data in brief. – 2020. – T. 29. – C. 105145. K1
- Lavrova A. I., Zyubin A. Y. Dogonadze, M. Z., Borisov, E. V., Samusev, I., & Postnikov, E. B. Surface-enhanced Raman spectroscopy reveals structure complexity difference in single extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis bacteria with different drug resistance //Results in Physics. – 2023. – T. 44. – C. 106106. K1
- Byuchkova Y. A., Zyubin A.Y., Rafalskiy V.V., Moiseeva E.M., Samusev I.G. Mathematical Analysis of Raman Spectra Data Arrays Using Machine Learning Algorithms //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2023. – T. 9. – №. 2. – C. 020308. K1
- Rafalskiy, V. V., Zyubin, A. Y., Moiseeva, E. M., Kupriyanova, G. S., Mershiev, I. G., Kryukova, N. O., Igor I. Kon, Ilya G. Samusev, Yana D. Belousova and Svetlana A. Doktorova Application of vibrational spectroscopy and nuclear magnetic resonance methods for drugs pharmacokinetics research //Drug Metabolism and Personalized Therapy. 2022. K1
- Kon I., Zyubin A., Samusev I. FDTD Simulations of Shell Scattering in Au@ SiO2 Core–Shell Nanorods with SERS Activity for sensory purposes //Nanomaterials. – 2022. – T. 12. – №. 22. – C. 4011. K1

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

Статьи в сборниках материалов конференций, представленных в изданиях, индексируемых

международными базами данных научного цитирования Web of Science и/или Scopus:

- Zyubin, A., Lavrova, A., Postnikov, E., Dogonadze, M., Demishkevich, E., Kundalevich, A., & Samusev, I. et al. Raman spectroscopy experimental spectrum analysis for identification in Mycobacterium tuberculosis strains with different drug resistance //Optics in Health Care and Biomedical Optics XI. – SPIE, 2021. – T. 11900. – C. 483-487.
- Matveeva, K. I., Zyubin, A. Y., Demishkevich, E. A., Rafalskiy, V. V., Moiseeva, E. M., Kon, I. I., ... & Samusev, I. G. Application of the spectrofluorimetric research method to study the complexes «Pt NPs-platelets» //Optics in Health Care and Biomedical Optics XI. – SPIE, 2021. – T. 11900. – C. 476-482.
- Kon, I. I., Zyubin, A. Y., Seteikin, A. Y., & Samusev, I. G. FDTD simulations field on gold nanoparticles and silver nanorods //Plasmonics VI. – SPIE, 2021. – T. 11904. – C. 139-145.
- Kon I. I., Zyubin A. Y., Samusev I. G. FDTD simulations of local plasmonic fields for gold surfaces fabricated by femtosecond laser ablation method //Advanced ЛЧ-TБог Systems and Applications X. – SPIE, 2020. – Т. 11554. – С. 254-259.
- Zyubin, A. Y., Matveeva, K. I., Kon, I. I., Kalinnikov, D. S., Shevchenko, M. A., & Samusev, I. G. et al. New method of SERS-active gold surfaces fabrication for bacterial cells Raman analysis //Nanophotonics VIII. – SPIE, 2020. – T. 11345. – C. 236-241.
- Matveeva, K. I., Zyubin, A. Y., Demishkevich, E. A., Lipnevich, L. L., Kundalevich, A. A., & Samusev, I. G. et al. ЛЧ-ТБіпд solutions for SERS applications using gold nanoparticle modified quartz surfaces //Nanophotonics VIII. – SPIE, 2020. – T. 11345. – C. 224-229.
- Zyubin, A. Y., Rafalskiy, V. V., Matveeva, K. I., Moiseeva, E. M., Tsapkova, A. A., Demishkevich, E. A., ... & Bryukhanov, V. V. Photophysical properties of nanoparticle-dye-protein complexes for fluorescent labeling purposes //Plasmonics V. SPIE, 2020. T. 11557. C. 115570F.
- Kon I. I., Zyubin A. Y., Samusev I. G. Numerical simulations of local plasmonic field distortion for multimodal core-shell gold-based nanoparticles //Advanced ЛЧ-ТБог Systems and Applications X. – SPIE, 2020. – Т. 11554. – С. 88-93.
- Zyubin, A. Y., Rafalskiy, V. V., Tcibulnikova, A. V., Matveeva, K. I., Moiseeva, E. M., Kolosova, V. V., ... & Samusev, I. G et al. Single human platelet study using surface-enhanced Raman spectroscopy as a perspective tool for antiplatelet therapy

effectiveness prediction //Optics in Health Care and Biomedical Optics IX. – SPIE, 2019. – T. 11190. – C. 37-42.

- Zyubin, A. Y., Matveeva, K. I., Kalinnikov, D. S., & Samusev, I. G. et al. Surfaceenhanced Raman spectroscopy of organoluminophores adsorbed on quartz surfaces modified by hydrosols of silver and gold nanoparticles //Plasmonics IV. – SPIE, 2019. – T. 11194. – C. 40-45.
- 11. Zyubin, A. Y., Alexandrov, K. Y., Matveeva, K. I., & Samusev, I. G et al. Plasmonenhanced fluorescence of nanoparticle-dye-protein complex as perspective approach for increase in fluorescent labeling effectiveness //Nanophotonics and Micro/Nano Optics V. – SPIE, 2019. – T. 11193. – C. 42-48.
- Lazareva, E. N., Zyubin, A. Y., Samusev, I. G., Slezhkin, V. A., Kochubey, V. I., & Tuchin, V. V. et al. Refraction, fluorescence, and Raman spectroscopy of normal and glycated hemoglobin //Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI. – SPIE, 2018. – T. 10685. – C. 636-643.
- 13. Konstantinova, E. I., Zyubin, A. U., Slezhkin, V. A., Samusev, I. G., & Bryukhanov, V. V. et al. Raman spectroscopy study of the optical properties of human serum albumin with dye aqueous solution droplet in presence of silver nanoparticles //Nanophotonics VII. SPIE, 2018. T. 10672. C. 138-143.
- Konstantinova, E., Zyubin, A., Moiseeva, E., Matveeva, K., Slezhkin, V., Samusev, I., & Bryukhanov, V. Application of quantum dots CdZnSeS/ZnS luminescence, enhanced by plasmons of silver rough surface for detection of albumin in blood facies of infected person //Biophotonics—Riga 2017. SPIE, 2017. T. 10592. C. 62-68.
- Postnikov, E. B., Lebedeva, E. A., Zyubin, A. Y., & Lavrova, A. I. et al. Computational implementation of the Cascade Hilbert-Zero Decomposition and perspectives of its applications for biophysical signal processing //Computational Biophysics and Nanobiophotonics. SPIE, 2022. T. 12194. C. 18-28.
- Kon I., Zyubin A., Samusev I. Numerical FDTD-based simulations for SERS-active planar plasmonic surfaces //Proc. of SPIE Vol. 2022. T. 12322. C. 1232210-1.
- Zyubin A., Lavrova A., Samusev I. SERS mapping of Mycobacterium tuberculosis single-cell with different drug resistance //Nanophotonics and Micro/Nano Optics IX. – SPIE, 2023. – T. 12773. – C. 99-101.
- Kon I., Zyubin A., Samusev I. Numerical FDTD-based simulations for SERS-active planar plasmonic surfaces //Nanophotonics, Micro/Nano Optics, and Plasmonics VIII. – SPIE, 2023. – T. 12322. – C. 223-227.
- Kundalevich A., Zyubin A., Samusev I. DFT simulations of mycobacterium tuberculosis cell wall components //Optics in Health Care and Biomedical Optics XIII. – SPIE, 2023. – T. 12770. – C. 127703A.

## Патенты и свидетельства о государственной регистрации программ ЭВМ

- Патент на изобретение РФ № RU 2 708 546 С1. Зюбин А. Ю., Константинова Е. И., Слежкин В. А., Матвеева К. И., Самусев И. Г., Демин М. В., Брюханов В. В. Способ получения усиленного сигнала комбинационного рассеяния света от молекул сывороточного альбумина человека в капле жидкости // Патент России № 2708546. 2019. Бюл. № 34. 2019 г.
- 2. Патент на изобретение РФ № RU 2 720 075 C1. Зюбин А. Ю., Матвеева К. И., Самусев И. Г., Демин М. В. Оптический сенсор с плазмонной структурой для определения химических веществ низких концентраций и способ его получения // Патент России № 2720075. 2019. Бюл. № 12. 2020 г.
- 3. Программа ЭВМ № RU 2020665579. Кон И.И., Зюбин А.Ю., Самусев И.Г. Программа ЭВМ для расчета теоретических значений усиления сигнала комбинационного рассеяния света для золотых наноструктурированных поверхностей // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 202066557. Бюл. № 12. 27.11.2020 г.
- 4. Программа ЭВМ № RU 2020666053. Кон И.И., Зюбин А.Ю., Самусев И.Г. Программа для расчета теоретических значений усиления сигнала комбинационного рассеяния света для золотых частиц сферической формы размером 10-100 нм // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020666053. Бюл. № 12. 04.12.2020 г.
- 5. Программа ЭВМ № RU 2022668593. Кон И.И., Зюбин А.Ю., Полторабатько Д.А., Самусев И.Г. Программа для расчета теоретических параметров электрического поля вблизи нанозвезд золота в ближнем инфракрасном диапазоне длин волн // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022668593. Бюл. № 10. 10.10.2022 г.
- 6. Программа ЭВМ № RU 2022619698. Бычкова Я.А., Зюбин А.Ю., Самусев И.Г. Программа формирования массивов спектральных данных комбинационного рассеяния света // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022619698. Бюл. № 6. 24.05.2022 г.
- 7. Программа ЭВМ № RU 2022615370. Кон И.И., Зюбин А.Ю., Самусев И.Г. Программа для расчета теоретических значений усиления сигнала комбинационного рассеяния света вблизи многослойных сфероидальных наночастиц золота с кремнеземной оболочкой // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022615370. Бюл. № 4. 30.03.2022 г.
- 8. Патент на изобретение РФ № RU 2 788 479 С1. Зюбин А. Ю., Рафальский В.В., Моисеева Е.М., Матвеева К.И., Кон И.И., Демишкевич Е.А., Кундалевич А.А., Ефтифеев Д.О., Ханкаев А.А., Цибульникова А.В., Самусев И.Г., Брюханов

В.В. Планарный наноструктурированный сенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса для усиления комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека и способ его получения // Патент России № 2788479. Бюл. № 2. 19.01.2023 г.

- 9.Патент на изобретение РФ № RU 2 787 689 C1. Зюбин А. Ю., Матвеева К.И., Демишкевич Е.А., Кундалевич А.А., Зозуля А.С., Самусев И.Г. Оптический сенсор для тушения флуоресценции оптически активных аминокислот тромбоцитов и способ его получения // Патент России № 2787689 C1. Бюл. № 2. 11.01.2023 г.
- 10. Программа ЭВМ № RU 2023618212. Бычкова Я.А., Зюбин А.Ю., Моисеева Е.М., Рафальский В.В. Программа классификации массивов спектров комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023618212. Бюл. № 4. 20.04.2023 г.
- База данных № RU 2024622816. Зюбин А.Ю., Демишкевич Е.А., Моисеева Е.М., Рафальский В.В., Самусев И.Г., Цапкова А.А. База данных «База данных спектров комбинационного рассеяния света тромбоцитов здоровых добровольцев» // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024622816. Бюл. № 7. 27.06.2024 г.
- 12. Программа ЭВМ № RU 2023618212. Бычкова Я.А., Зюбин А.Ю., Моисеева Е.М., Рафальский В.В. Программа классификации массивов спектров комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023618212. Бюл. № 4. 20.04.2023 г.
- 13. Программа ЭВМ № RU 2023618212. Бычкова Я.А., Зюбин А.Ю., Моисеева Е.М., Рафальский В.В. Программа классификации массивов спектров комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023618212. Бюл. № 4. 20.04.2023 г.
- 14. Программа ЭВМ № RU 2023618212. Бычкова Я.А., Зюбин А.Ю., Моисеева Е.М., Рафальский В.В. Программа классификации массивов спектров комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023618212. Бюл. № 4. 20.04.2023 г.
- 15. Программа ЭВМ № RU 2023618212. Бычкова Я.А., Зюбин А.Ю., Моисеева Е.М., Рафальский В.В. Программа классификации массивов спектров комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023618212. Бюл. № 4. 20.04.2023 г.

## Зюбин Андрей Юрьевич

# СПЕКТРОФЛУОРОМЕТРИЯ И СПЕКТРОСКОПИЯ ГИГАНТСКОГО КОМБИ-НАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОМАРКЕРОВ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук

> Подписано в печать 03.06.2025 г. Формат 60×90 <sup>1</sup>/16. Усл. печ. л. 2,4 Тираж 100 экз. Заказ 53

Отпечатано в Полиграфическом центре Балтийского федерального университета им. И. Канта 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6