

БОУ балтийский Федеральный университет имени иммануила канта

# А.Ю.Зюбин, И.Г.Самусев

# ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Учебное электронное издание

Калининград 2025

БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. ИММАНУИЛА КАНТА

# А.Ю. Зюбин, И.Г. Самусев

# ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Учебное пособие

Учебное электронное издание

Калининград Издательство Балтийского федерального университета им. И. Канта 2025

> © Зюбин А. Ю., Самусев И. Г., 2025 © БФУ им. И. Канта, 2025 ISBN 978-5-9971-0952-3

#### Рецензенты

А.Ю. Сетейкин, канд. физ.-мат. наук, доц.,
 Балтийский федеральный университет им. И. Канта;
 Д.В. Шити, канд. физ.-мат. наук,
 Балтийский федеральный университет им. И. Канта

### Зюбин, А.Ю.

Оптическая спектроскопия комбинационного рассеяния света бактериальных клеток : учебное пособие / А.Ю. Зюбин, И.Г. Самусев [Электронное издание] : учебное электронное издание. — Калининград : Издательство БФУ им. И. Канта, 2025. — https://publish.kantiana.ru/catalog/non-periodical/ uchebnye-posobiya/978-5-9971-0952-3/

Изложены подходы к использованию спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света и спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света для анализа бактериальных клеток на примере микобактерий и *E. coli*. Приведены практические примеры разработки оптических сенсоров подобной диагностики. Разобраны способы осуществления спектрального анализа клеточной стенки микобактерии. Приведен детальный обзор по последним работам в данной области.

Предназначено для магистров и аспирантов, занимающихся спектроскопией живых систем, в том числе оптическими сенсорами, основанными на плазмонном эффекте. Также будет полезно специалистам в области оптической спектроскопии живых систем.

> © Зюбин А.Ю., Самусев И.Г., 2025 © БФУ им. И. Канта, 2025 ISBN 978-5-9971-0952-3

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Прикладные аспекты методов спектроскопии и	
оптической сенсорики	6
1.1. Усиление оптических эффектов рассеяния света и	
флуоресценции металлическими наночастицами	6
1.2. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния	
света в исследованиях микобактерий	11
Глава 2. Реализация подходов оптической спектроскопии	
съемки микобактерий	17
2.1. Расчет оптических свойств сенсоров на основе наночастиц	17
2.2. Химический синтез сред коллодных наночастиц золота	
и структурированных поверхностей, исследование оптических	
свойств	18
2.3. Спектроскопия комбинационного и гигантского	
комбинационного рассеяния бактериальных клеток микобактерий	25
2.4. Исследования внутриштаммовых различий клеток	
микобактерий туберкулеза различной резистентности штамма	
Beijing	30
Перспективные тематики для курсовых работ и ВКР	48
Список рекомендуемой литературы	64

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее активно развивающихся областей современной физики является плазмоника, оперирующая колебаниями свободных электронов в металлических наноструктурах. Активно изучаются вопросы взаимодействия таких колебаний с атомами и молекулами для создания и применения оптических сенсоров, наноустройств. Поверхностный плазмон (ПП) представляет собой коллективные колебания свободных электронов на поверхности металла, когда действительная часть функции диэлектрической проницаемости металла отрицательна [1; 2].

В случае если электромагнитная волна связана с коллективными электронными колебаниями, индуцируется поверхностная плазмонная волна, распространяющаяся вдоль поверхности металла, а электрическое поле в направлении нормали к поверхности металла становится безызлучательным и сильно локализовано на поверхности металла. Важное явление в плазмонике — сильная пространственная локализация электронных колебаний на частоте плазмонного резонанса (ПР). Такая локализация приводит к значительному увеличению локальных электрических и магнитных полей. Локализованный поверхностный плазмонный резонанс (ЛППР) представляет собой коллективные колебания свободных электронов, подобные колебаниям поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [3; 4]. ЛППР индуцируется при взаимодействии света с металлическими наночастицами (НЧ) с размерами меньше длины волны падающего света, а такое колебание представляет собой стоячую волну электронной плотности, индуцированную вблизи частицы [5-7].

Последние десятилетия плазмонные металлические наночастицы вызывают большой интерес в сфере практических приложений, таких как оптические сенсоры, вчастности основанные на эффектах усиления и преобразования оптического излучения. Такие частицы применяются для методов гигантского комбинационного рассеяния света, металл-усиленной флуоресценции, создания метаповерхностей и управления светом вблизи них, плазмонного катализа, плазмонной гипертермии, плазмонноусиленной фотогальваники, плазмонных наноантенн, субволновой плазмонной оптики, тераностики и биомедицинской визуализации [8—13].

## Глава 1

### ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ МЕТОДОВ СПЕКТРОСКОПИИ И ОПТИЧЕСКОЙ СЕНСОРИКИ

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

Свойства локализованных поверхностных плазмонов сильно зависят от формы, размера металлических наночастиц, что позволяет настраивать их резонансные частоты для эффективного взаимодействия света с элементарными квантовыми системами, такими как, например, молекулы и квантовые точки. В последние годы настройка ЛППР металлических наночастиц путем изменения их формы и состава была одним из самых надежных и многообещающих способов получения необходимых плазмонных характеристик для сенсорных приложений. Усиленные локальные поля вблизи наночастиц приводят к увеличению интенсивности комбинационного рассеяния до порядков  $10^{14}$ , что позволяет обнаруживать отдельные молекулы [14; 15]. Локальные поля, усиленные плазмонами, могут привести к разработке методов определения структуры дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) без присоединения к ним маркеров [16].

Используя плазмонные наночастицы сложной структуры, можно одновременно усиливать как поглощение, так и испускание света и таким образом создавать эффективные флуорофоры и наноразмерные источники света [17]. Металлические наноструктуры использовались в приложениях оптического зондирования с плазмонным усилением, таких как гигантское комбинационное рассеяние света (ГКРС), металл-усиленная флуоресценция (МЕF) и биомедицинская визуализация [3; 5; 18—20].

6

В качестве перспективных приложений могут быть рассмотрены фундаментальные и прикладные концепции, приложения оптического зондирования, методы синтеза плазмонных металлических наночастиц из родия (Rh), платины (Pt), золота (Au) и серебра (Ag). При взаимодействии световой волны с металлическими наночастицами оптическое поле модифицируется эффектами плазмонного резонанса, благодаря чему возникает плазмонное усиление вблизи металла. Такие эффекты могут быть объяснены электромагнитной теорией. Наноматериалы объясняются электромагнитной теорией. В длинноволновом пределе, где длина волны ( $\lambda$ ) падающего света намного больше диаметра частицы (R), локальное электрическое поле вблизи частицы  $E_{log}$  определяется выражением

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

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

$$a = g 4\pi \varepsilon_d R^3, \tag{2}$$

где g определяется как

$$g = \frac{\varepsilon_m - \varepsilon_m}{\varepsilon_m + 2\varepsilon_d} = \frac{(\varepsilon_{m(Re)} - \varepsilon_d) + i\varepsilon_m(lm)}{(\varepsilon_{m(Re)} + 2\varepsilon_d) + i\varepsilon_m(lm)}.$$
(3)

Здесь  $\varepsilon_m$  и  $\varepsilon_d$  — диэлектрические проницаемости металлической наночастицы и окружающей диэлектрической среды соответственно.  $\varepsilon_{m(Re)}$  и  $\varepsilon_{m(Im)}$  — действительная и мнимая части комплексной диэлектрической проницаемости ( $\varepsilon_m$ ) наночастицы металла соответственно ( $\varepsilon_m = \varepsilon_{m(Re)} + i\varepsilon_{m(Im)}$ ). Максимальная величина поляризуемости получается, когда действительная часть знаменателя в уравнении (3) стремится к нулю, что со-

ответствует диэлектрической проницаемости металла, действительная часть которой равна  $-2\varepsilon_d$ . Согласно теории рассеяния Ми, сечения рассеяния ( $\sigma_{sca}$ ) и поглощения ( $\sigma_{abs}$ ) сферических металлических наночастиц определяются как [18; 21; 23]

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

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

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

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

где  $\omega_{Ex}$  и  $\omega_{R}$  — частота возбуждения и комбинационного рассеяния света соответственно. Активно  $E_{loc(\omega Ex,r)}$  — локальное электрическое поле возбуждающего света вблизи металлических наночастиц.  $E_{loc(\omega R,r)}$  — локальное электрическое поле комбинационного рассеяния света вблизи наночастиц. Предполагая малый частотный сдвиг между возбуждением и комбинационным рассеянием света ( $\omega_{Ex} \approx \omega_{R}$ ), следует отметить, что эффективность усиления рамановского рассеяния пропорциональна модулю напряженности электрического поля в четвертой степени  $|\mathbf{E}|^4$  [18; 24]

$$G = |E_{loc}(\omega_R, r)|^4.$$
<sup>(7)</sup>

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

$$P_{em} = Qq_{abs}F_{ex},\tag{8}$$

где Q — квантовый выход флуорофора,  $\sigma_{abs}$  — сечение поглощения флуорофора. В присутствии металлических наночастиц локальный световой поток возбуждения (F<sub>102</sub>) определяется как  $F_{loc} = (E_{loc}/E_{inc}) F_{ex}$ , где  $E_{loc}$  — локальное электрическое поле вблизи металла наночастицы [27]. Интенсивность флуоресценции может быть увеличена до 100 раз за счет плазмонного усиления местного поля. В то же время свечение флуоресценции флуорофоров может тушиться при коротких расстояниях (<5 нм) от поверхности металла или при прямом контакте с поверхностью металла, где эффект тушения флуоресценции преобладает над эффектом усиления. Существует несколько подходов к описанию таких механизмов усиления флуоресценции и тушения вблизи металлических наночастиц, однако точный механизм до сих пор неизвестен из-за сложности взаимодействия «металл — флуорофор» [26; 27]. Основы эффекта металл-усиленной флуоресценции и его применения в биофизике были сформулированы и описаны в работах [28—30].

Традиционно для получения наночастиц используют благородные металлы, такие как Au, Ag и Cu [30; 57—64]. Применение этих наночастиц ограничено видимым и ближним инфракрасным (БИК) диапазонами длин волн. Разнообразие биологических веществ, которые имеют флуоресцентное излучение в УФ-диапазоне, требует синтеза соответствующих средств усиления / тушения сигнала. Стоит отметить, что в области глубокого ультрафиолета отсутствует излучение флуоресценции, что позволяет эффективно применять метод УФ-ГКР для биомедицинского зондирования. Последние исследования показали, что Al, Ga, Mg и Rh являются перспективными материалами для УФ-плазмоники [65; 66]. В настоящее время алюминий активно используется для исследований в УФ и глубоком УФ-диапазонах [67]. Алюминий довольно распространен и поэтому дешевле по сравнению с другими металлами. Однако он имеет оксидную пленку, токсичен и чувствителен к температуре окружающей среды. Используя экспериментальный и теоретический подходы, авторы показали, что образование слоя оксида алюминия привело как к красному смещению, так и к ослаблению резонансных максимумов в наночастицах алюминия различной формы [68; 69]. Магний также имеет максимум поглощения в УФ-области, но окисляется гораздо больше, чем алюминий, поэтому на нем сложнее реализовать УФ-плазмонные применения. Однако, например, галлий не окисляется, стабилен и в широком температурном диапазоне сохраняет свою стабильность в течение нескольких лет, поэтому его можно использовать для таких исследований [70]. Платина и родий — одни из самых интересных металлов для исследований в области УФ-плазмоники. Эти металлы облалают сильным плазмонным откликом в УФ-лиапазоне и могут быть использованы для УФ-плазмонных приложений [71]. Эти металлы не окисляются, то есть они практически не имеют оксидной пленки. Родий также обладает преимуществами наличия высокого коэффициента отражения и высокой химической стабильности. Биологические субстанции, такие как нуклеиновые кислоты, основания ДНК и аминокислоты, имеют полосы поглощения в УФ-области [72]. Тенденция к изучению биологических веществ привела к повышенному научному интересу к области УФ-плазмоники [65; 73]. Наночастицы металлов способны к индуцированию ЛППР в том числе на острых краях в широком диапазоне длин волн возбуждения. Таким образом, они подходят для создания очень чувствительных биосенсоров с плазмонным усилением. Использование флуоресценции и рамановской амплификации с методами МЕГ и ГКРС позволяет достичь пределов обнаружения на уровне одной молекулы [74]. Благодаря этой особенности возможна разработка сверхчувствительных биосенсоров на основе МЭФ и ГКР. В таких методах плазмонные металлические наноструктуры необходимы для усиления оптических сигналов для биологического обнаружения.

# 1.2. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света в исследованиях микобактерий

В последние десятилетия спектроскопия КРС и спектроскопия ГКРС, в частности, активно применяется в мировой науке для экспресс-детекции и исследования биомолекул [75—77]. Исследование биомолекул с использованием сред усиления сигнала КР на базе эффекта плазмонного резонанса позволяет исследователям быстро [78; 79], безметочно [80], неинвазивно [81; 82] и точно [83] получать спектральную информацию, в том числе от биологических объектов макроскопического масштаба — бактериальных клеток [84]. Метод успешно используется для целей лекарственного мониторинга [85], анализ раковых клеток [86], клеточных механизмов [87].

В последнее время ведутся исследования широкого спектра бактериальных клеток, успешно реализуются методики дифференциации различных культур бактерий. Спектроскопия ГКРС применяется для анализа бактериальных клеток [88; 89]. Анализ единичных бактериальных клеток также является перспективной задачей и направляет исследователей на поиск новых методик [90] и средств реализации ГКР-эффекта [91—93].

В последние годы наблюдаются отдельные попытки применения ГКР-спектроскопии и для исследований бактериальных клеток микобактерий туберкулеза. В подавляющем большинстве данные исследования направлены на дифференциацию видов туберкулезных бактерий, выявление межвидовых различий штаммов туберкулеза или сравнение туберкулезных штаммов и других штаммов. Научной группой под руководством J. Рорр ведутся исследования микобактерий туберкулеза в университете Фридриха Шиллера (г. Йена, Германия). В работе [94] предложен подход к дифференциации туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий с помощью комбинированной методики lab-on-chip-ГКР. Авторы работы провели исследование более 2100 ГКР спектров MbT, определили спектральные различия.

В работе [95] были проведены исследования MbT двух видов в стадии роста. Спектроскопия КР применялась для анализа единичных бактериальных клеток и слоя миколовых кислот в них во временном диапазоне роста (0—72 ч). Были установлены спектральные различия в липидном составе на поздней стадии роста — в диапазоне 48—72 ч. В продолжение исследований в работе [96] было зарегистрировано более 8800 спектров туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий, создана спектральная библиотека. С применением хемометрических методов дифференциации спектров достигнута точность определения видов — 94 %.

Авторами также были проведены исследования штаммов различных видов с варьируемой лекарственной чувствительностью. Во всех работах авторов основной проблемой было низкое усиление спектрального сигнала, которое не позволило выявить меж- и внутриштаммовые различия в пределах одного вида варьируемой лекарственной чувствительности. В работе [97] авторами использовался мультимодальный подход на базе MALDI-TOF масс-спектрометрии, ГКР-спектроскопии и классических микробиологических методик для анализа единичных туберкулезных клеток в отличающихся стадиях роста. В работе исследовались бактерии *Мусоbacterium smegmatis*, иммобилизованные на гидрофобной поверхности стекла. С помощью предложенного подхода авторам удалось идентифицировать вид и особенности живой бактериальной клетки в отличающихся стадиях роста.

Ряд исследований проводится в США (Университет Юты, Государственный университет Колорадо. Массачусетский технологический институт и др.). В работе [98] было осуществлено комплексное исследование миколовых кислот, выделенных от туберкулезных и нетуберкулезных штаммов микобактерий с помощью методов ядерного магнитного резонанса, хроматографии, ГКР-спектроскопии. С использованием многокомпонентного статистического анализа штаммы были спектрально дифференцированы с точностью 100 %. Спектральные различия в миколовых кислотах для определения межвидовых различий штаммов были основной гипотезой исследований, которая подтверждена в работе [99]. Авторами данной работы предложен новый метод диагностики туберкулезного менингита на основе спектроскопии КРС. Были проанализированы спектры слюны, выделены колебательные полосы, специфичные для случаев патологии. Авторы работы [100] использовали сочетание методов ГКР-спектроскопии, плазмон-усиленной ИК-спектроскопии, численных методов для исследования лекарственного препарата изониазида и его роста в виде тонких слоев на серебре.

В работе [101] с помощью флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии КР были исследованы связи «кислота — спирт» в ферментах CYP51, равномерно замещенные гистидином. Бактерия *Mycobacterium tuberculosis* была использована в качестве модельной системы для исследования роли этих связей в тонкой настройке конформации гема, состояния вращения железа, а также образования и распада оксиферозного фермента.

Авторы [102] исследовали ManLAM-комплекс бактерии туберкулеза с помощью ГКР-спектроскопии с целью определения его в качестве спектрального маркера наличия туберкулезной патологии в биологических жидкостях пациентов. В результате исследований гипотеза не оправдалась, поскольку достаточной степени повторяемости авторам достичь не удалось.

В работе [103] были выполнены исследования биомаркера — компонента клеточной стенки липоарабиногалактана микобактерии, для чего использовалась сконструированная авторами активная ГКР-среда для получения спектров рассеяния данного биомаркера. Брались варьируемые концентрации человеческой сыворотки и на них отрабатывалась методология исследования. В продолжение исследований [104] данный компонент изучался с помощью резонансной спектроскопии ГКР. Авторами посредством разработанной методики иммуноанализа было проведено исследование биомаркера — липоарабиногалактана микобактерии. Было установлено, что применение резонансного ГКР показывает лучшие результаты, чем ГКР.

В работе [105] представлены результаты ГКР-исследований патогенных и непатогенных *MbT*. Из бактерий выделялись миколовые кислоты, после чего их основные формы — альфа-, метокси- и кетомиколовые кислоты — были проанализированы с помощью ГКР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Авторами работ слой миколовых кислот был использован в качестве биомаркера для выявления спектроскопических особенностей патогенных и непатогенных *MbT*.

В работе [106] проводилось исследование поверхностей, покрытых слоем шероховатого серебра для достижения эффекта ГКР. Авторы апробировали поверхности для определения 4,4-бипиридина, аденина, входящего в состав ДНК. В результате исследований удалось получить разрешаемый сигнал ГКР аденина. Авторы полагают, что сигнал аденина может служить биомаркером для определения таких патогенов, как *Plasmodium spp. и Mycobacterium tuberculosis*.

В работе [107] был предложен быстрый метод определения туберкулезных ДНК с помощью сенсора ДНК на основе аптамеров. Специализированные электроды-подложки модифицировались серебряными наночастицами которые, в свою очередь, модифицировались аптамерами для определения ДНК туберкулезных бактерий.

В работе [108] был предложен метод для детектирования штамма *Mycobacterium smegmatis*, на основе реакции серебряного зеркала, созданного непосредственно на поверхности бактерии. Бактерия помещалась в раствор соли AgNO<sub>3</sub> и NaOH, затем добавлялся гидроксид аммония до тех пор, пока нитрат серебра не растворялся окончательно. Затем бактерии наносились на полипропиленовую поверхность и выполнялась ГКР-спектроскопия. Такой подход позволил идентифицировать патогены *M. Bovis BCG, M. Tuberculosis, Staphylococcus Aureus, S. Epidermis, Bacillus u Escherichia coli.* 

В работе [109] приводятся результаты исследований по реализации ГКРС детекции микобактерий туберкулеза с применением наностержней золота, встроенных в графеновые 3D-матрицы. Была показана возможность детекции элементов ДНК в фемтомолярных концентрациях. В работе [110] была показана возможность ГКРС идентификации бактериальных штаммов с помощью реакции серебряного зеркала. Авторы предложили сенсор, способный детектировать *М. Bovis* количественно, с нижним порогом детекции до 100 бактерий в пробе. В последнее время существует достаточное количество работ, направленных на применение ГКРС и наночастиц в исследовании туберкулеза. В работе [111] отражены результаты применения варьируемых концентраций наночастиц. В исследовании представлена

методика синтеза таких частиц и результаты их воздействия на штамм Mycobacterium phlei. Были опробованы различные концентрации частиц для ингибирования микобактерий и подобраны концентрации, оказывающие ингибирующее их рост действие. Коллектив в [112] разрабатывает подходы, основанные на идентификации патогенов с применением спектроскопии комбинационного рассеяния света и РСА-анализа. Показана перспективность комплексного подхода для идентификации патогенов. Коллективом в [113] был предложен теоретический подход к моделированию спектров антибактериального агента РҮСА с помощью методов DFT и теоретически обсуждены сайты связывания в процессе воздействия РУСА на микобактерию E. coli и Mycobacterium stegmatis. Также было выполнено моделирование электронных спектров и ЯМР-спектров. Были проанализированы центры связывания противобактериальных препаратов с помощью молекулярного докинга. Коллектив в [114] ведет исследования двух штаммов туберкулеза Мусоbacterium indicus pranii (MIP) и Mycobacterium intracellulare, наблюдаемых у пациентов, в том числе с ВИЧ. Коллеги, как и авторы проекта, делают упор на выявлении различий в миколовых кислотах клеточной стенки микобактерии и картеноидах, для чего применяют КР-спектроскопию. Однако авторы проекта не выявляют различия антибиотикочувствительности внутри одного бактериального штамма. В работе [115] проводится детальное теоретическое исследование производных пиразола методом DFT с целью выявления особенностей молекулярной динамики и молекулярного докинга на центры связывания белков микобактерии. Авторы осуществили моделирование колебательных мод и определили характеристические максимумы, выявляющие связывание производных пиразола и микобактерии. В работе [116] выполнено квантово-механическое моделирование спектральных и энергетических характеристик PCINH, которое затем было соотнесено с экспериментальными результатами КР-, ИК-, ЯМР-спектроскопии и спектроскопии поглощения. Была показана перспективность теоретического подхода для оценки антибактериального воздействия PCINH на микобактерии штамма H37Rv. Подобные теоретические подходы были отражены в работах [117; 118]. Самые свежие

единичные работы в области применения подходов спектроскопии комбинационного рассеяния света и гигантского комбинационного рассеяния света направлены на разработку методов быстрой диагностики антибиотикорезистентности. В частности, в работе [119] рассматривается применение методов машинного обучения для классификации спектров в подходах ГКР-спектроскопии. Была показана успешная дифференциация штаммов *Mtb* с лекарственной устойчивостью и без нее (пятикратная перекрестная точность проверки = 94,32 %). Между тем штаммы *Mtb*, выделенные из легочных и внелегочных образцов, были эффективно разделены (пятикратная точность перекрестной проверки = 99,86 %). Более того, штаммы *Mtb* с различными профилями лекарственной устойчивости также были выделены (пятикратная точность перекрестной проверки = 99,86 %).

### ГЛАВА 2

## РЕАЛИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ Съемки микобактерий

### 2.1. Расчет оптических свойств сенсоров на основе наночастиц

Первым этапом необходимо осуществить подбор оптимальных оптических параметров, для чего выполняется моделирование оптических свойств наночастиц металлов, варьируемой формы, после чего определяются параметры для последующего синтеза наночастиц, при которых достигается наибольшее усиление ГКРС. Для проведения моделирования необходимо использовать пакет *Ansys Lumerical FDTD Solutions*, который подробно описан в [120; 121]. В случае моделирования сферических частиц и частиц с оболочкой моделирование проводится по схеме, обозначенной в работе [122].

Далее необходимо провести теоретическую оценку коэффициента ГКРС для выделенной морфологии поверхности золота для химического синтеза. Для проведения моделирования выбираются наиболее подходящие различные структурные элементы, такие как цилиндры, сферические сегменты и острые конусы. Для «кругов» и «сеток» размер основания поверхности в области моделирования задается следующим образом: х — 200 нм, у — 400 нм, z — 10 нм. В случае «кругов» поверхность состояла из большого («L»), среднего («М») и малого («S») цилиндров со сферическими сегментами на их вершине. Цилиндры «М» располагаются между цилиндрами «L», а цилиндры «S» — по периферии. На рисунке 1 изображен пример области модели FDTD с геометрией поверхности «круг» (*a*) и распределением электрических искажений ( $\delta$ ).



Рис. 1. Область модели FDTD с геометрией поверхности «круг» (*a*) и распределением напряженности электрического поля Е (б)

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

На втором этапе с учетом результатов математического моделирования определяются размеры нанозвезд, дающих наибольшую напряженность электрического поля вблизи поверхности. Для проведения экспериментальной части лучшим вариантом являются наночастицы (НЧ) золота геометрической формы звезды. Синтезирование НЧ проводится химическим методом с использованием «семян роста». Для реализации химического синтеза используются следующие химически реактивы: HAuCl<sub>4</sub> (тетрахлороаурат (III) водорода), ЦТАБ/СТАВ (C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>BrN, цетилтриметиламмоний бромид), NaBH<sub>4</sub> (борогидрид натрия), AA (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, L-аскорбиновая кислота), HCl (соляная кислота), Na<sub>3</sub>Cit (цитрат натрия), NaOH (гидроксид натрия), TEOS (тетраэтоксисилан), APTES (3-Аминопропил)триэтоксисилан). Все химические реактивы должны быть степени

чистоты х.ч или ос.ч. Растворы должны быть приготовлены с использованием химически чистой воды 1-го типа (Milli-Q). Для химического синтеза золотых нанозвезд осуществляется двухстадийных метод синтеза. В качестве «зародышевого раствора» используется коллоид, приготовленный по стандартному цитратному методу [123]. Для синтеза зародышей необходимо брать 20 мл раствора, содержащего HAuCl<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>0 и Na,Cit с концентрациями 2,5 · 10<sup>-4</sup> моль/л и 10<sup>-4</sup> моль/л соответственно. Затем при умеренном перемешивании добавляют свежеприготовленный NaBH<sub>4</sub> (0,1 моль/л, 60 мкл). Раствор сразу же становится коричнево-розовым и постепенно в течение суток приобретает окончательный красный цвет. Для синтеза нанозвезд готовится раствор СТАВ (15 мл, 7,33 моль/л), к которому добавляют 640 мкл HAuCl<sub>4</sub> (0,01 моль/л) и 96 мкл AgNO<sub>3</sub> (0,01 моль/л). Затем при интенсивном перемешивании вводят 110 мкл АА (0,1 моль/л). Сразу после обесцвечивания раствора добавляют 12 мкл «зародышевых частиц» и перемешивают еще 2 мин. В течение этого времени раствор постепенно становится синим. Синтезированные коллоиды представлены на рисунке 2.



а

б

Рис. 2. Вид спектров поглощения (*a*), СЭМ-изображения нанозвезд (*б*)

Для контроля положения плазмонного максимума были сняты спектры поглощения нанозвезд. Такие спектры снимали в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм с использованием двухлучевого спектрофотометра Shimadzu UV-2600 со спектральным диапазоном 200-800 нм. На рисунке 2, б представлены спектры поглощения золотых наностержней и нанозвезд. Видно, что максимум поглощения нанозвезд лежит в нужной нам ближней ИК-области. Для подтверждения различной морфологии наночастиц использовался метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Данное исследование было осуществлено с помощью двулучевой электронно-ионной системы сверхвысокого разрешения Zeiss Cross Beam XB 540. На СЭМ-изображениях, полученных с помощью двулучевой электронно-ионной системы, наблюдаются золотые нанозвезды. Наблюдаются как четкие, так и не до конца сформировавшиеся вершины. Для модификации прототипа были также приготовлены золотые нанозвезды в два этапа с использованием зародышевых частиц. Для синтеза зародышей сначала готовили 20 мл раствора, содержащего золотохлористоводородную кислоту и цитрат натрия с концентрациями соответственно 2,5 · 10<sup>-4</sup> М и 10<sup>-4</sup> М. Затем при умеренном перемешивании быстро добавляли свежеприготовленный ледяной борогидрид натрия (0,1 М, 60 мкл). Раствор сразу же становился коричнево-розовым и постепенно в течение суток приобретал окончательный красный цвет. Для синтеза нанозвезд готовили 15 мл 7,33 М раствора СТАВ (0,125 г СТАВ на 46,88 мл воды). К этому раствору добавляли 640 мкл 0,01 М p-pa HAuCl и 96 мкл 0,01 M AgNO,. Затем при интенсивном перемешивании приливали 110 мкл 0,1 М аскорбиновой кислоты. Сразу после обесцвечивания р-ра добавляли 12 мкл р-ра зародышевых частиц и перемешивали еще 2 мин. На рисунке 3 представлена электронная микрофотография золотых нанозвезд. Их средний размер около 50 нм. Большинство из представленных нанозвезд обладает пятью лучами. Также на фотографии можно видеть несколько сферических наночастиц, которые являются зародышами.



Рис. 3. Электронная микрофотография золотых нанозвезд (*a*) и их спектры поглощения с характерным максимумом 624 нм (*б*)

Был также проведен синтез оболочечных нанозвезд с целью повышения биосовместимости создаваемого сенсора. Раствор золотых нанозвезд центрифугировали 10 мин при 10 000 g, зат тем разбавляли в 0,001 М раствором СТАВ. К 10 мл полученного раствора добавляли 10 мкл 0,1 М водного раствора NaOH при интенсивном перемешивании для достижения рН 10-11. После три раза добавляли по 20 мкл 20%-го раствора TEOS в метаноле с интервалами в 30 мин при бережном перемешивании. Реакция протекала в течение 2 дней. По истечении этого времени полученный раствор центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин и диспергировали в метаноле. Далее исследовались спектральные свойства и размеры наностержней. По данным фотонной корреляционной спектроскопии (рис. 4) средний размер нанозвезд в оболочке (85,3 % частиц) составляет 33,460 ± 9,842 нм. Это больше, чем до покрытия кремнеземом  $(24,73 \pm 6,47 \text{ нм})$ , что говорит об успешном синтезе оболочечных частиц. Наличие 13,3 % наночастиц с радиусом 5.448 можно объяснить содержанием отдельных кремнеземных наночастиц.





На рисунке 5 представлена электронная микрофотография золотых нанозвезд в кремнеземной оболочке. Толщина полученной оболочки — около 20 нм. Помимо нанозвезд кремнеземом покрылись остаточные зародышевые частицы, а также образовалось незначительное количество отдельных кремнеземных наночастиц.



Рис. 5. Электронная микрофотография золотых нанозвезд в кремнеземной оболочке

На рисунке 6 изображены спектры поглощения нанозвезд с оболочкой и без нее. Наблюдается незначительное смещение пика на 1 нм. Это связано с ростом локального показателя преломления вокруг частиц, что приводит к увеличению вклада рассеяния.



Рис. 6. Сравнение спектров поглощения нанозвезд в кремнеземной оболочке и без нее

Для реализации функционализации поверхности стекол наночастицами была разработана и применена следующая методология. Были использованы оптически прозрачные кварцевые стекла марки КУ-1. Очистка стекл осуществлялась многостадийным способом. Первым этапом пластины промывались в ультразвуковой ванне в течение 30 мин, в которой через каждые 10 мин происходила замена жидкости по следующей схеме: Milli-Q — изопропиловый спирт — Milli-Q. Далее пластины сушили при 90 °C до полного высыхания. После чего стекла вертикально помещали в термостойкую посуду с раствором пираньи (30 %  $H_2O_2$  и 96 %  $H_2SO_4$ , 1:3) и подогревали до 70 °C. Через 30 мин пластину промывали три раза по 10 мин в ультразвуковой ванне с Milli-Q и сушили при 90 °C до полного высыхания. Очищенные стекла вертикально помещались в 5 %-ный раствор APTES и безводного толуола на 24 ч. Далее для очистки от излишек APTES образцы последовательно погружали в ультразвуковую ванну с безводным этанолом (10 мин × 2 раза) и со сверхчистой водой (10 мин × 3 раза). После высыхания на поверхность APTES-модифицированных стекл адсорбировали синтезированные золотые наночастицы. Для этого пластины горизонтально погружали в коллоидные растворы и оставляли в покое на 12 и 24 ч. Через сутки стекла (рис. 7) промывали водой и использовали по назначению.



Рис. 7. Фотографии исследуемых АРТЕS-модифицированных стекол с изображением монослоя варьируемой плотности (*a*) и участками высокой плотности (*б*)

Данный прототип далее был использован для экспериментов комбинационного рассеяния света с модельным красителем. В рамках проведения экспериментальной части по получению спектров гигантского комбинационного рассеяния света с помощью созданных прототипов сенсоров на основе нанозвезд на APTES-модифицированных стеклах использовался спектрометр *Centaur U (ООО «НаноСканТехнология»*, Россия). Поскольку приготовленные нанозвезды имеют широкий максимум плазмонного поглощения, начинающийся в районе 500 нм и заканчивающийся в ближнем инфракрасном диапазоне, в ходе эксперимента были использованы лазеры с длинами волн  $\lambda = 532$  нм и  $\lambda = 632$  нм, соотносящиеся со спектрами плазмонного поглощения.

## 2.3. Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния бактериальных клеток микобактерий

В качестве модельных бактерий для анализа воздействия антибиотиков и определения спектральных полос, являющихся потенциальными маркерами клеточной гибели, оптимальнее всего выбирать культуры бактерий *E. coli*, находящихся в стационарной фазе роста, чувствительных к антибактериальным препаратам. Далее приведены примеры исследования воздействия пяти антибиотиков широкого спектра на клетку и оценка изменения их спектра. На первом этапе был осуществлен подбор экспериментальных условий съемки, были получены различимые спектры бактерий. На втором этапе проведена оценка воздействия антибиотика на клеточные стенки бактерий с целью идентификации спектральных изменений методом КРС. В рамках проведения экспериментальной части по получению спектров гигантского комбинационного рассеяния света с помощью созданных оптических сенсоров на основе золотых нанозвезд на APTES-модифицированных стеклах использовался спектрометр Renishaw Virsa (Великобритания). Поскольку приготовленные прототипы имели широкий максимум плазмонного поглощения, начинающийся в районе 500 нм и заканчивающийся в ближнем инфракрасном диапазоне, в ходе эксперимента были использованы лазеры с длиной волны  $\lambda = 532$  нм,  $\lambda = 785$  нм, соотносящиеся со спектрами плазмонного поглощения прототипов. В ходе экспериментов было установлено, что лазер λ=532 нм разрушает бактериальные клетки в силу большей энергии излучения, поэтому для дальнейших экспериментов был использован более длинноволновый источник λ = 785 нм. Бактерии помещались на поверхность сенсора (рис. 8) мазком. Все спектральные данные были сохранены после регистрации в виде файлов .txt для дальнейшей оценки. Для обработки спектральных данных использовалась информационная система BioRad-KnowItAll (Thermo Fisher Scientific Inc., США). С помощью нее производилась линейная коррекция базовой линии

и фильтрация по методу Савицкого — Голея. Съемка бактерий проводилась в течение суток после ингибирования по прошествии 8—12 ч.



Рис. 8. Прототип оптического сенсора для съемки бактериальных клеток

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

После визуального обнаружения бактерий в объективе микроскопа проводились позиционирование и спектральная съемка при следующих условиях: динамическая съемка в диапазоне обратных волновых чисел 350—3200 см<sup>-1</sup>, выдержка матрицы ПЗС 30 с, длина волны возбуждающего лазера  $\lambda = 785$  нм, мощность лазера варьировалась от 45 до 15 мВт. Такие условия съемки были связаны с факторами неповреждения образца и отсутствия его засветки. Полученные спектры сохранялись в формате .txt с целью дальнейшей обработки. После снятия спектра бактерий (контроль) с помощью автоматической пипетки *Eppendorf Research* с наконечником на бактерии была нанесена 1 капля по 1 мкл выбранного антибиотика (рис. 9). В течение 5 мин происходило высыхание лекарственного препарата, и съемка возобновилась при тех же условиях, что и для бактерий без лекарственного препарата. Измерения колебательных спектров производилось каждые 5 мин с целью наблюдения за динамикой изменения бактериальной стенки под воздействием антибиотика. Съемка прекращалась, когда на протяжении трех изменений спектральная картина не изменялась.



Рис. 9. Бактерии *E. coli*, помещенные на поверхность оптического сенсора (*a*), и их стократное оптическое изображение на предметном столике спектрометра КРС (*δ*)

В ходе выполнения работ было выбрано пять антибиотиков, с которыми проводились эксперименты по воздействию на клетку и эксперименты по антибиотикорезистентности: цефтриаксон, ципрофлоксацин, ампициллин + сульбактам, тетрациклин реневал, рифампицин для исследования влияния лекарственных препаратов на выбранные штаммы бактерий. В ходе проведения эксперимента были получены рабочие концентрации антибиотика, вводимые в организм человека (рекомендуемая доза для лечения). Исходя из этих концентраций, были получены концентрации, которые позволили работать с исследуемым объектом: они не перекрывали спектр бактерий, при этом воздействуя на исследуемый образец. Рекомендуемая концентрация для лечения была определена из инструкции по применению к выбранным антибиотикам. Среди используемых лекарственных средств были антибиотики в виде растворов (ципрофлоксацин, рифампицин) и порошка (цефтриаксон и ампициллин + сульбактам, тетрациклин реневал). Поскольку все антибиотики использовались в жидком виде, лекарственные препараты в форме порошка растворялись в некотором количестве воды с помощью автоматической пипетки Eppendorf Research с наконечником. Отмерялось определенное количество дистиллированной воды, чтобы получить необходимую концентрацию. Препараты растворялись в рассчитанном заранее количестве воды. После их растворения полученный раствор центрифугировался с целью осаждения крупных нерастворимых частиц таблетки. Использованные массы порошков, объемы дистиллированной воды и полученные концентрации представлены в таблице 1.

Таблица 1

Антибиотик	Масса лекарственного препарата, г	Объем добавленной воды, мл	Рекомендуемая концентрация для лечения, г/мл	Рабочая концентрация, г/мл
Цефтриаксон	0,5	1,5	33 · 10 <sup>-2</sup>	33 · 10 <sup>-5</sup>
Ципрофлоксацин	Использовался в жид-			
	ком виде		$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-5}$
Ампициллин + суль-				
бактам	1,5	2	$75 \cdot 10^{-2}$	$75 \cdot 10^{-5}$
Тетрациклин реневал	0,1	5	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-5}$
Рифампицин	0,1	5	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$

### Используемые концентрации действующих веществ антибиотиков

Эксперимент был проведен следующим образом. Ha АРТЕЅ-модифицированную поверхность кварцевого стекла КУ-1 были нанесено с помощью скальпеля несколько колоний бактерий чувствительного штамма E. coli. Бактериальные штаммы *E. coli*, используемые в этом исследовании, были получены от БФУ им. И. Канта. Все исследуемые культуры, в том числе антибиотикорезистентные, выращивали в среде Луриа — Бертани (LB) (Becton Dickinson), триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, хлорид натрия 5 г/л, агар 15 г/л при 37 °С в течение ночи. В рамках проведения экспериментальной части по изучению изменения структуры бактериальной стенки при возникновении у бактерии E. coli устойчивости к лекарственным препаратам были получены спектры гигантского комбинационного рассеяния света с помощью нанозвезд на APTES-модифицированных стеклах, также использовался рамановский анализатор Virsa. Поскольку приготовленные нанозвезды имели широкий максимум плазмонного поглощения, начинающийся в районе 500 нм и заканчивающийся в ближнем инфракрасном диапазоне, в ходе эксперимента был использован лазер с длиной волны  $\lambda = 785$  нм. Выбор этой длины волны также обусловлен возможностью изучения живых, нативных бактерий под действием препарата, а не под действием лазера высокой энергии, который может повредить их структуру. Для проведения этого эксперимента бактериальные штаммы E. coli, полученные из музея БФУ им. И. Канта, были пересажены в приготовленные ранее чашки Петри. В процессе экспериментов по съемке антибиотикорезистентных штаммов были взяты бактерии, резистентные последовательно к исследуемым препаратам. Штаммы были помещены в 6 чашек Петри (5 резистентных штаммов, 1 контрольный чувствительный штамм). Питательная среда снималась отдельно, и ее спектр вычитался из спектра каждого штамма. Полученные спектры сохранялись в формате .txt с целью дальнейшей обработки. Они были обработаны в программе Origin 2021. В процессе экспериментов были успешно получены спектры чувствительных, антибиотикорезистентных бактерий, а также бактерий при воздействии лекарственных препаратов. Далее приведены результаты съемки бактерий, имеющих резистентность к препаратам. Бактерии,

имеющие резистентность, брались в университете и растились на среде с соответствующим антибиотиком для проверки резистентности. После выхода на стационарную фазу роста осуществлялась спектральная съемка посредством КРС-спектроскопии. Перед обработкой все дополнительные спектральные составляющие вычитались.

### 2.3. Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния бактериальных клеток Mycobacterium tuberculosis

Для реализации ГКРС клеток микобактерий была применена методика, в которой использовались физически синтезированные наночастицы, полученные в том числе методом химического синтеза.

После достижения оптимальных параметров эксперимента была осуществлена спектроскопия комбинационного рассеяния света на микобактериях туберкулеза. В рамках данной работы была опробована регистрация КР-сигнала от нескольких сред роста для штамма микобактерии туберкулеза (MbT) Erdman spp. Также были зарегистрированы их спектры комбинационного рассеяния света. По итогам были определены оптимальные параметры эксперимента с минимальным сигналом фона. Для отработки методики использовался референсный штамм Erdman spp. из музея Санкт-Петербургского государственного научно-исследовательского института фтизиопульмонологии Минздрава РФ в лаборатории экспериментального туберкулеза. Штаммы культивировались с использованием среды Левенштейна — Йенсена или среды Миддлбрука 7Н9. Бактериальные штаммы культивировались при температуре 37 °С и поддержании 5%-ного уровня СО, в инкубаторе в течение 28-30 сут. Далее образцы трижды центрифугировались и отмывались в деионизированной воде, после чего помещались в пробирки Eppendorf 5 мл. Суспензия штаммов замораживалась в физиологическом растворе 15%-ным раствором глицерина и хранилась при T = - 80 °C. Было установлено, что глицерин дает ощутимый вклад в спектр бактерий, в связи с чем его концентрация уменьшалась до 5 %. Это, как и дополнительные промывки бактериальной массы перед экспериментом, способствовало понижению паразитного сигнал рассеяния глицерина и получению более высокого соотношения сигнал / шум для микобактерий. Далее перед началом эксперимента размороженную бактериальную суспензию объемом 200 мкл помещали на водяную баню и убивали нагреванием при + 80 °С в течение часа. Далее центрифугировали осадок (4000 об/мин, в течение 10 мин). После этого осадок ресуспендировали в 80 мкл дистиллированной воды. Для целей съемки использовались легочные и внелегочные штаммы микобактерий, резистентные к различным препаратам. Спектры комбинационного рассеяния были зарегистрированы с помощью спектрометра Horiba Jobin-Yvon LabRam ĤR800 (Horiba, Франция), оснащенным лазером с длиной волны 514 нм. Мощность лазера составляла 35 мВт. Оптическая схема включала в себя микроскоп Olympus BX41 с объективом  $100 \times$  (NA 0,9). Монохроматор спектрометра имел фокусное расстояние 800 мм и был оснащен голографической решеткой 600 шт/мм. Спектрометр был оборудован CCD-матрицей с размером пикселей 1024 × 256 и внутренним охлаждением до -70 °C. Воспроизводимость по волновому числу составляла 1 см<sup>-1</sup>. Спектральное разрешение составляло 1,5 см<sup>-1</sup>. Размер лазерного пятна 1 × 25 микрон, позиционировался на конгломерате бактерий (рис. 10).



Рис. 10. Изображение бактериальной массы микобактерий туберкулеза на кварцевом стекле при увеличении 100×, полученное с использованием спектрометра комбинационного рассеяния света

Рэлеевское рассеяние было устранено с помощью режекторных фильтров. Внутри спектрометра рамановское рассеяние проходит через щель размером 50 мкм, и, наконец, весь рамановский сдвиг регистрируется в виде спектра термоэлектрически охлаждаемым прибором с зарядовой связью с установленной температурой – 70° С. Прибор калибровался кремниевой пластиной при максимуме сигнала при 520,2 см<sup>-1</sup> в течение 1 с. Капля деактивированных бактерий наносилась на химически очищенный кварц, затем высушивалась. Спектры регистрировались в диапазоне 400—3150 см<sup>-1</sup>. После регистрации спектр сохранялся в формате .txt и специальном формате Horiba (.ngs) на ПК, подключенном к блоку комбинационного рассеяния. После отработки КР-методики были зарегистрированы спектры ГКР с применением поверхностей на основе нанозвезд и на коммерческих подложках Silmeco. Типовой спектр референсного штамма Erdman приведен на рисунке 11.



Рис. 11. Спектр комбинационного рассеяния референтного штамма *Erdman spp*. в диапазоне 200—3150 см<sup>-1</sup>, полученный на кварцевом стекле

Далее проводились детальные исследований бактериальных конгломераций и единичных клеток микобактерий туберкулеза с применением КР-спектроскопии. Были исследованы референтные и клинические штаммы микобактерий. Штаммы микобактерий были взяты из коллекции НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ. Это были штаммы *Beijing*, распространенные на территории РФ, имеющие различную лекарственную резистентность. Выборка включала в себя референтные (H37Rv, H37Ra, Erdman) штаммы и клинические штаммы: монорезистентные (МоноЛУ), полирезистентные (ПолиЛУ), с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). Биологический материал состоял из респираторного материала пациентов с туберкулезом легких, хирургического материала (из места разрушения кости) пациентов с костным туберкулезом. Все образцы были подготовлены на среде Левенштейна — Йенсена или Middlebrook 7Н9 (с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960). Все культуры были собраны на одинаковых фазах роста (стационарное состояние). В таблице 2 приведен список основных референтных и клинических штаммов, для которых проводилось исследование. Стоит отметить, что для штаммов МоноЛУ спектральных различий (между чувствительными и МоноЛУ) выявлено не было, в связи с чем они были исключены из выборки исследования.

Таблица 2

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

#### Перечень исследуемых штаммов микобактерий туберкулеза

0	~	<b>_</b>
()кончание	maon	
Onon minute	111000001.	~

Штамм	Тип туберкулеза	Способ забора образца	Чувствительность к препаратам	Препарат
H37Rv	Легочный	Музей	Чувствительный	Нет
		(референс)		
H37Ra	Легочный	Музей (референс)	Чувствительный	Нет
Erdmann	Легочный	Музей (референс)	Чувствительный	Нет

Примечание: где S — стрептомицин; H — изониазид; R — рифампицин; E — этамбутол; Z — пиразинамид; K — канамицин; Of офлоксацин; ЦП — капреомицин; A — амикацин; Cap — парааминосалициловая кислота.

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

Спектральные исследования КР и ГКР спектроскопии проводились на приборах *Horiba Jobin-Yvon LabRam HR 800 (Horiba*, Франция) и *Senterra (Brucker*, США). Использование двух спектрометров было необходимо для регистрации спектров на длинах волн 632,8 нм (*LabRam HR 800*) и 785 нм (*Senterra*) и соответствующих сред усиления для них. В случае использования спектрометра LabRam HR800 (Horiba, Франция) использовали лазер с длиной волны 632,8 нм. Мощность лазера на образце составляла 17 мВт. Оптическая схема включала в себя микроскоп Olympus BX41 с объективом 100× (NA 0.9). Монохроматор спектрометра имел фокусное расстояние 800 мм и был оснащен голографической решеткой 600 шт/мм с максимумом блеска на длине волны 500 нм. Спектрометр был оборудован ССД-матрицей Synapse (Horiba) с размером пикселей 1024 × 256 и внутренним охлаждением до – 70 °C. Воспроизводимость по волновому числу составляла 1 см<sup>-1</sup>. Спектральное разрешение — 1,5 см<sup>-1</sup>. Размер лазерного пятна 1 × 25 микрон, позиционировался на конгломерате или одиночных клетках бактерий (рис. 12). В случае использования спектрометра Senterra применялся источник возбуждения с длиной волны 785 нм. Спектральное разрешение составляло около 3 см<sup>-1</sup>. Для регистрации применялся высокочувствительный детектор Andor IDus 416 с максимумом детекшии на ллине волны 780 нм.



Рис. 12. Изображение бактериальной массы микобактерий туберкулеза на кварцевом стекле при съемке конгломераций и единичных бактерий (желтая стрелка) на спектрометре *LabRam 800HR* туберкулеза на кварцевом стекле (*a*) и пример ГКР-картирования единичных микобактерий в разных частях клетки, реализованного на спектрометре Senterra при увеличении 100 крат (*б*)
Перед съемкой спектров приборы калибровались кремниевой пластиной при максимуме сигнала при 520,2 см-1 в течение 1 с. В случае КР-измерений суспензия деактивированных бактерий наносилась на химически очищенный кварц, затем высушивалась. В случае ГКР-измерений коллоидные растворы наночастиц наносились на кварцевые стекла 1—3 слоями, затем суспензия бактерий помещалась туда. В случае использования спектрометра Senterra использовались как изготовленные авторами проекта коллоидные золотые наностержни, так и промышленные ГКР-активные структуры, адаптированные под длину волны возбуждения 785 нм (Silmeco, Дания). Спектры регистрировались в диапазоне 400—3150 см<sup>-1</sup>. После регистрации спектры сохранялись в оригинальных форматах (.ngs) и (.dpt), а также в формате .txt на ПК, подключенном к блоку комбинационного рассеяния. Последовательный анализ основных спектральных компонент был проведен в области «отпечатка пальца» 600—1800 см<sup>-1</sup>. Также более детально была анализирована область спектра 1000—1500 см<sup>-1</sup> для исследования потенциального маркера антибиотикорезистентности — глутатиона (GSH). Спектральная обработка проводилась с помощью программного пакета KnowItAll Spectroscopy Edition. Для всех спектров проводилась коррекция базовой линии, фильтрация шумов, удаление базовой линии кварца, нанесенных на него коллоидов. В случае использования субстрата Silmeco базовый спектр субстрата записывался спектрометром Centerra, а потом автоматически вычитался из результирующего спектра. За время реализации второго года проекта было зарегистрировано 1353 КР- и ГКР-спектров от 146 бактериальных клеток из штаммов, обозначенных в таблице 3.

После выбора оптимальной методики пробоподготовки для микобактерий туберкулеза был проведен анализ бактерий туберкулеза, в частности спектральный анализ липидных и белковых колебательных групп в высокочастотной области для микобактерий туберкулеза с различной степенью антибиотикорезистентности: чувствительных, с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Анализ проводился с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния света с целью детекции возможных спектральных изменений молекул

с высоким молекулярным весом, находящимся в структуре клеточной стенки микобактерий. Последовательный анализ колебательных групп был выполнен в спектральном диапазоне высоких частот v = 2700 - 3050 см<sup>-1</sup>. Были исследованы образцы легочного и внелегочного (костного) туберкулеза. Спектры комбинационного рассеяния были зарегистрированы с помощью спектрометра Horiba Jobin-Yvon LabRam HR800 (Horiba, Франция) оснащенным He-Ne лазером с длиной волны 632,8 нм. Мощность лазера составляла 30 мВт. Оптическая схема включала в себя микроскоп Olympus BX41 с объективом 100× (NA 0,9). Монохроматор спектрометра имел фокусное расстояние 800 мм и был оснащен голографической решеткой 600 шт/мм. Спектрометр был оборудован ССД-матрицей с размером пикселей 1024 × 256 и внутренним охлаждением до -70 °С. Воспроизводимость по волновому числу составляла 1 см<sup>-1</sup>. Спектральное разрешение — 1,5 см<sup>-1</sup>. Размер лазерного пятна 1 × 25 микрон, позиционировался на конгломерате бактерий. Каждый спектр регистрировался в течение 80 с, выполнялось 10 усреднений для каждого спектра с целью повышения соотношения сигнал / шум. Всего было зарегистрировано около 653 спектров, из которых было отобрано 60 спектров легочных и внелегочных микобактерий, имеющих лучшее соотношение «сигнал — шум».

Спектроскопия комбинационного рассеяния дает детальную информацию о различных компонентах внутри бактериальных клеток: ДНК/РНК, углеводах, белках, липидах, амидных групп. В результате выполнения работы был проведен последовательный анализ основных спектральных компонент в области «отпечатка пальца» 600—1800 см<sup>-1</sup>. Спектральная обработка осуществлялась с помощью программного пакета *KnowItAll Spectroscopy Edition* (лиц. № 112029). Далее необходимо выполнить максимально детальную спектральную идентификацию компонент стенки бактерий, затем осуществить спектральную съемку штаммов, выявить спектральные различия, определить наличие принципиально изменяющихся колебаний при действии антибиотиков. На рисунке 13 изображен характерный спектр чувствительного штамма *E. coli* без спектральной обработки, а на рисунке 14 — КРС-спектр со спектральной обработкой.



Рис. 13. КРС-спектр бактерии E. coli без коррекции базовой линии



Рис. 14. КРС-спектр бактерии *E. coli* без коррекции после проведения процедур коррекции

Для более точного анализа полученные спектры комбинационного рассеяния света были нормированы на максимум интенсивности, затем была откорректирована базовая линия. Полученные в результате анализа колебательные частоты были сведены в таблицу 3. В таблице 3 отражены колебательные максимумы для низкочастотной и среднечастотной областей спектра. Были детально идентифицированы спектральные колебания для липидов, пептидов, ДНК, аминокислот и других спектральных элементов, входящих в состав бактерии [124].

Таблица 3

## Спектральный профиль бактерий *E.coli*

E. coli,	
спектральный	Интерпретация колебательной моды
сдвиг, см <sup>-1</sup>	
520-540	S-S-валентные колебания
540	СОС-гликозидное кольцо, деформационные
	колебания
620	Фенилаланин
640	Тирозин
665	Гуанин
720	Аденин
785	Цитозин, урацил (колебания ароматического
	кольца)
829	Тирозин на поверхности клеточной стенки
852	Тирозин внутри клетки
858	С-С-скелетные. С = О = С-1.4-гликозилная связь
897	СОС-валентные колебания
1004	Фенилаланин
1061	С-N- и С-С-валентные колебания
1085	С-О-валентные колебания
1098	СС-скелетные и СОС-валентные колебания от
	гликозидной связи
1102	> РО <sub>2</sub> -валентные колебания (симметричные)
1129	С-N- и С-С-валентные колебания
1230—1295	Амид III
1295	СН <sub>2</sub> -деформационные колебания
1440—1460	С-Н,-деформационные колебания
1575	Гуанин, аденин (растяжение ароматического
	кольца)
1606	Фенилаланин
1614	Тирозин
1650—1680	Амид I
1735	> С = О-валентные колебания
2870-2890	СН <sub>2</sub> -валентные колебания
2935	СН <sub>3</sub> - и СН <sub>2</sub> -валентные колебания
2975	СН <sub>3</sub> -валентные колебания
3059	(С = С-Н) (ароматическое кольцо)-валентные
	колебания

Следующим шагом было выявление спектральных различий между контролем и штаммами под действием антибиотика на бактерию. Для разработки метода необходимо было, во-первых, прояснить спектральные изменения в структуре клеточной стенки при действии препарата и выделить изменяющиеся колебательные моды. Таким образом, после обнаружения бактерий проводилась спектральная съемка при следующих условиях: динамическая съемка в диапазоне обратных волновых чисел 350—3200 см<sup>-1</sup>, 30 с, длина волны лазера — 785 нм, мощность лазера варьировалась от 45 до 15 мВт. Такие условия съемки были обусловлены несколькими факторами, решающим среди которых было получение спектра бактерий без засвета образца и посторонних шумов. Полученные спектры сохранялись в формате .txt с целью дальнейшей обработки в программе Origin 2021. После снятия спектра бактерий (контроль) с помощью автоматической пипетки Eppendorf Research с наконечником на бактерии была нанесена 1 капля по 1 мкл выбранного антибиотика. В течение 5 мин происходило высыхание лекарственного препарата, и съемка возобновилась при тех же условиях, что и бактерии без лекарственного препарата. Измерения колебательных спектров производились каждые 5 мин с целью наблюдения за динамикой изменения бактериальной стенки под воздействием антибиотика. Съемка прекращалась, когда на протяжении трех изменений спектральная картина не изменялась. Полученные спектры сохранялись в формате .txt с целью дальнейшей обработки в программе Origin 2021. В ходе обработки данных определено ограничить исследуемую область до области отпечатка пальцев с целью сохранения информативности полученных данных и исключения постороннего шума от фона, который проявлялся в области больших волновых чисел. Для каждого антибиотика было собрано три ключевых спектра: экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий Е. coli (контроль), снятый непосредственно до добавления лекарственного препарата; экспериментальный спектр антибиотика рабочей концентрации, который был использован для наблюдения изменений в структуре бактерий; экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом, отражающий изменения структуры исследуемого образца. Последующие спектры (рис. 15) чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с антибиотиком не отличались ни по интенсивности максимумов, ни по положению пиков.



Рис. 15. ГКРС спектры бактерий *E. coli* и антибиотика цефтриаксона.
 Черный спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий. Красный спектр — экспериментальный спектр антибиотика рабочей концентрации 7,5 мг/мл.
 Синий спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом. На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма и чувствительного штамма

Анализируя полученные графики, можно заметить несколько характерных особенностей воздействия цефтриаксона на чувствительный штамм *E. coli* для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Для нуклеиновых кислот наблюдается сдвиг максимумов с 735 на 727 см<sup>-1</sup>, с 771 на 785 см<sup>-1</sup>, уменьшение интенсивности максимумов нуклеиновых кислот на 672, 812 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, 1003, 1031, 1246 см<sup>-1</sup>. Для липидной полосы было определено уменьшение интенсивности на 1064 см<sup>-1</sup>, уменьшение интенсивности и сдвиг с 1295 на 1300 см<sup>-1</sup> (рис. 16).



Рис. 16. ГКРС-спектры бактерий *E. coli* и антибиотика ципрофлоксацина. Черный спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий.
Красный спектр — экспериментальный спектр антибиотика рабочей концентрации 0,02 мг/мл.
Синий спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом. На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма и чувствительного штамма под воздействием бактерий Анализируя полученные графики, можно заметить несколько характерных особенностей воздействия ципрофлоксацина на чувствительный штамм *E. coli* для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Интенсивность колебательных полос нуклеиновых кислот на 672 и 727 см<sup>-1</sup> после взаимодействия с лекарственным препаратом увеличилась. Интенсивность максимумов на 785, 812 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 спектр ципрофлоксацина в области 1057—1105 см<sup>-1</sup> имеет одинаковую форму с формой бактерий под воздействием препарата. Так что это изменение может быть результирующей от двух анализируемых образцов: бактерии и антибиотика.

Для липидной группы характерен максимум на 1300 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>. Происходят спектральные сдвиги с 1010 на 1001 см<sup>-1</sup> и с 1030 на 1040 см<sup>-1</sup> с уменьшением интенсивности (рис. 17).

Анализируя полученные графики, можно заметить несколько характерных особенностей воздействия ампициллина + сульбактама на чувствительный штамм *E. coli* для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. 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.



Рис. 17. ГКРС-спектры бактерий *E. coli* и антибиотика
ампициллина + сульбактама. Черный спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий.
Красный спектр — экспериментальный спектр антибиотика рабочей концентрации 0,02 мг/мл.
Синий спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом.
На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма и чувствительного штамма под воздействием бактерий

В колебательных полосах липидной группы также можно наблюдать изменения интенсивности колебательных полос на 1065 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 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 (рис. 18).



Рис. 18. ГКРС-спектры бактерий *E. coli* и антибиотика тетрациклина реневал. Черный спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий.
Красный спектр — экспериментальный спектр антибиотика рабочей концентрации 0,02 мг/мл.
Синий спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий после взаимодействия с лекарственным препаратом. На вставке графика изображено сравнение спектров чувствительного штамма и чувствительного штамма под воздействием бактерий

Анализируя полученные графики, можно заметить несколько характерных особенностей воздействия тетрациклина реневала на чувствительный штамм *E. coli* для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Для нуклеиновых кислот некоторые максимумы сдвигаются, например с 726 на 731 см<sup>-1</sup> с уменьшением интенсивности и с 1483 на 1478 см<sup>-1</sup>. При рассмотрении липидной группы можно заметить следующие особенности: максимум на 1065 см<sup>-1</sup> у чувствительного штамма неинтенсивен, однако после воздействия на E. coli тетрациклина реневала отмечается 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 и 1452 см<sup>-1</sup> после добавления ципрофлоксацина сдвигаются на 1445 и 1458 см<sup>-1</sup> соответственно. Для белковой группы также наблюдается спектральный сдвиг полос: с 840 на 830 см<sup>-1</sup>, сдвиг с уменьшением интенсивности с 1004 на 1000 см<sup>-1</sup>, сдвиг с увеличением интенсивности с 1032 на 1025 см<sup>-1</sup> (рис. 19).



Рис. 19. ГКРС-спектры бактерий *E. coli* и антибиотика рифампицина. Красный спектр — экспериментальный спектр чувствительного штамма бактерий. Черный спектр — экспериментальный спектр антибиотика рабочей концентрации 0,015 мг/мл

Аналирируя полученные графики, можно заметить несколько характерных особенностей воздействия рифампицина на чувствительный штамм *E. coli* для органических соединений, формирующих бактериальную стенку. Для нуклеиновых кислот некоторые максимумы сдвигаются, например с 785 на 791 см<sup>-1</sup> с уменьшением интенсивности и красным сдвигом и уменьшении интенсивности с 1295 на 1310 см<sup>-1</sup>.

Таким образом, были выделены колебательные моды, характеризующие изменения при действии антибиотика. Данные отмечены жирным в таблице 4.

Таблица 4

E. coli,	
спектральный	Интерпретация колебательной моды
сдвиг, см <sup>-1</sup>	
520—540	S-S-валентные колебания
540	СОС гликозидное кольцо, деформационные
	колебания
620	Фенилаланин
640	Тирозин
665	Гуанин
720	Аденин
785	Цитозин, урацил (колебания ароматического
	кольца)
829	Тирозин на поверхности клеточной стенки
852	Тирозин внутри клетки
858	С-С-скелетные, С = О = С-1,4-гликозидная связь
897	СОС-валентные
1004	Фенилаланин
1061	С-N- и С-С-валентные
1085	С-О-валентные
1098	СС-скелетные и СОС-валентные от гликозидной
	СВЯЗИ
1100	

# Спектральный профиль *E. coli* под воздействием антибиотика

Глава 2. Реализация подходов оптической спектроскопии съемки микобактерий

Окончание табл. 4

E. coli,	
спектральный	Интерпретация колебательной моды
сдвиг, см <sup>-1</sup>	
1129	С-N- и С-С-валентные
1230—1295	Амид III
1295	СН <sub>2</sub> деформационные
1440—1460	С-Н <sub>2</sub> деформационные
1575	Гуанин, аденин (растяжение ароматического кольца)
1606	Фенилаланин
1614	Тирозин
1650—1680	Амид I
1735	> С = О-валентные
2870—2890	СН <sub>2</sub> -валентные
2935	СН <sub>3</sub> - и СН <sub>2</sub> -валентные
2975	СН <sub>3</sub> -валентные
3059	(C = C-H) (ароматическое кольцо)-валентные

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

Спектральный анализ микобактерий для каждого элемента структуры был проведен следующим образом. Поскольку клеточная стенка микобактерии имеет комплексное строение (рис. 20) и сама микобактерия может быть спектрально отличима от других видов бактерий, для выявления внутриштаммовых различий микобактерий различной резистентности, таким образом, в работе были анализированы основные составляющие клетки с помощью спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света. Анализ возможных изменений проводился последовательно для каждого элемента клеточной стенки, который может претерпевать изменения в процессе приобретения антибиотикорезистентности.



Рис. 20. Схематическое представление клеточной стенки микобактерии

Полученные спектральные картины были проанализированы в среднечастотном (600—1800 см<sup>-1</sup>) и высокочастотном (2500—3100 см<sup>-1</sup>) диапазонах на возможные изменения в составе миколовых кислот, арабиногалактана, пептидогликана, белков и липидов, входящих в клеточную стенку микобактерии. В таблице 5 представлены структуры миколовых кислот, арабиногалактана и пептидогликана. Поскольку миколовые кислоты входят в состав клеточной стенки микобактерии, а формы миколовых кислот могут быть идентифицированы посредством спектроскопии КР и ГКР, то данный слой-потенциальный маркер антибиотикорезистентности интенсивно изучался авторами в рамках данной работы.

Таблица 5



# Структура основных составляющих клеточной стенки микобактерии

В результате проведения экспериментов спектроскопии комбинационного рассеяния света была получена характерная спектральная картина для референтных и клинических штаммов микобактерий туберкулеза. На рисунке 21 изображена в сравнении спектральная картина для референтных и легочных штаммов микобактерий туберкулеза. Успешно зарегистрированы спектры клинических штаммов чувствительных (ТБ-ЧВ), ПолиЛУ (МЛУ), ШЛУ (ШЛУ), а также референтных Н37Rv Пражский и Н37Rv\_США. Для внелегочных штаммов были зарегистрированы спектры комбинационного рассеяния для внелегочных ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ штаммов, выявлены и отмечены характеристические максимумы бактериальных клеток (рис. 22). Для анализа для всех спектров была выполнена фильтрация шумов, коррекция базовой линии, произведена нормировка на максимум интенсивности.

Для более точного анализа полученные спектры комбинационного рассеяния света были нормированы на максимум интенсивности и откорректированы. Полученные в результате анализа колебательные частоты были сведены в таблицу 6. В таблице 6 отражены колебательные максимумы для низкочастотной и среднечастотной областей спектра. Были идентифицированы спектральные колебания для липидов, пептидов, ДНК, аминокислот и других спектральных элементов, входящих в состав микобактерии.



Рис. 21. Спектры комбинационного рассеяния света для легочных и референтных штаммов (*a*) и внелегочных штаммов различной антибиотикорезистентности (*б*)



Рис. 22. Нормированные, подвергнутые фильтрации и коррекции базовой линии спектры комбинационного рассеяния света для легочных и референтных штаммов (*a*) и внелегочных штаммов различной антибиотикорезистентности (б)

Таблица б

ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	Колебательная мода
640 w	640 w	640 w	Скелетные (С-С)
			(пептидогликан)
671 w	674 mw	674 w	Тирозин
724 vw	724 vw	724 vw	ДНК
783 w	783 w	783 w	Цитозин, урацил
821 wsh	819 wsh	819 wsh	Ring-breathing-колебания
			тирозина с CaDPA
			carboxylate stretching-
			колебаниями
849 sbr	850 sbr	850 msbr	v (CC) ring breathing
			(пептидогликан)
924 mbr	924 mbr	924 mbr	v (CHR <sub>2</sub> ) С-С-скелетные,
			где $R \neq CH_2$ (фосфолипиды)
976 mwbr	972 mwbr	972 mwbr	L-гистидин
1002 m	1002 mw	1002 m	v (CC)-фенилаланин
1061 s	1061 s	1061 s	С-С,С-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 (СН <sub>2</sub> ) (насыщенные
			липиды) (профиль
			миколовых кислот)
1460 vs	1461 vs	1457 vs	СН <sub>2</sub> /СН <sub>3</sub> -деформации
			протеинов и липидов
1656 mbr	1656 mbr	1656 mbr	Амид I
1664 msh	1667 msh	1667 msh	Амид I

#### Колебательные частоты для легочных штаммов ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ [127]

Примечание: где w — слабые колебания; m — средние колебания; s — интенсивные колебания; vs — очень интенсивные колебания; vw — очень слабые колебания; br — широкий максимум; sh — плечо.



Рис. 23. Интенсивность основных характеристических максимумов для легочных штаммов (*a*) и внелегочных штаммов микобактерий (*б*)

Было отмечено явное отличие интенсивности основных колебательных мод для микобактерий легочного (рис. 23, а) и внелегочного туберкулеза (рис. 23, б). Например, интенсивность максимума глутатиона резко снижается в штаммах ШЛУ для внелегочного туберкулеза, но увеличивается для штаммов МЛУ и ТБ-ЧВ по сравнению с туберкулезом легких. Это удивительный факт, поскольку глутатион вырабатывается не MbT, а его окисленной формой (токсичной для клеток MbT), генерируется макрофагом для борьбы с патогеном. Специальная система МbT детоксифицирует его для производства глутатиона в клетках, который не так токсичен, как его окисленная форма. Такие различия в интенсивности между двумя формами туберкулеза можно объяснить сильной вирулентностью внелегочных штаммов, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения. Лимонная кислота, наблюдаемая во всех штаммах, не является частью клеточной стенки, но ее присутствие может указывать на активный рост бактерий. Это означает, что спектральный анализ комбинационного рассеяния может определить не только структуры клеточной стенки, но и энергетику метаболических путей, вовлеченных во взаимодействие «хозяин — патоген». По результатам спектрального анализа легочных штаммов были выделены максимумы, характеризующие профили пептидогликана, фосфолипидов, миколовых кислот. Основными результатами спектрального анализа стала детекция увеличения интенсивности рассеяния для колебания на частоте 1437 см<sup>-1</sup> для штамма ШЛУ, характерного для профиля миколовых кислот, а также регистрация увеличения интенсивности рассеяния для колебания на частоте 1171 см<sup>-1</sup>, спектральный максимум которого характерен для глутатиона. Предполагалось увеличение плотности слоя миколовых кислот, что, в свою очередь, коррелирует с интенсивностью детектируемого сигнала и антибиотикорезистентностью бактерии (от ТБ-ЧВ к ШЛУ).

Таблица 7

(ТБ-ЧВ)	(МЛУ)	(ШЛУ)	Колебательная мода
640 vw	640 w	640 w	Скелетные (С-С) (пептидо-
			гликан)
671 w	674 mw	674 mw	Тирозин
724 vw	724 vw	724 vw	ДНК
782 mw	782 mw	783 mw	Цитозин, урацил
823 msh	820 mssh	820 msh	Колебания ароматического
			кольца тирозина
847 m	850 s	850 s	v (CC)-валентные колебания
			(пептидогликан)
918 mbr	924 msbr	922 msbr	v (CHR <sub>2</sub> ) С-С-скелетные, где
			R≠CH <sub>3</sub> (фосфолипиды)
975 wbr	975 mbr	974 mbr	L-гистидин
1000 s	1001 m	1002 m	v (CC)-фенилаланин
1059 s	1061 vs	1062 vs	C-C,C-N (возможный про-
			филь миколовых кислот)
1168 w	1170 w	1170 vw	Глутатион
1255 wbr	1255 mbr	1255 mbr	Амид III
1295 vsbr	1295 sbr	1295 sbr	СН <sub>2</sub> -крутильные колебания
			(липиды) (профиль миколо-
			вых кислот)
1322 mg	1323 ms	1322 m	A + G + Tyr

#### Колебательные частоты для внелегочных штаммов ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ

(ТБ-ЧВ)	(МЛУ)	(ШЛУ)	Колебательная мода
1433 ssh	1438 msh	1438 msh	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) (насыщенные липи-
			ды) (профиль миколовых
			кислот)
1455 vs	1460 s	1460 s	СН <sub>2</sub> /СН <sub>3</sub> -деформации проте-
			инов и липидов
1656 mbr	1656 wbr	1656 wbr	Амид I
1664 msh	1667 wsh	1667 wsh	Амид I

Окончание табл. 6

Примечание: где w — слабые колебания; m — средние колебания; s — интенсивные колебания; vs — очень интенсивные колебания; vw — очень слабые колебания; br — широкий максимум; sh — плечо.

По результатам анализа внелегочных штаммов микобактерий туберкулеза (табл. 7) наблюдалась другая спектральная картина. Интенсивность максимума на частоте 1437 см<sup>-1</sup> от ТБ-ЧВ к ШЛУ уменьшалась, тогда как максимум на 1061 см<sup>-1</sup> увеличивался. Интенсивность спектрального максимума на 1171 см<sup>-1</sup>, характерного для глутатиона, уменьшалась от ТБ-ЧВ к ШЛУ. Для МЛУ и ШЛУ штаммов было отмечено увеличение интенсивности спектральных максимумов для сдвигов волн 621, 823, 847, 918, 1059 и 1255 см<sup>-1</sup>. Поскольку легочные и внелегочные штаммы внутри одного вида микробиологически отличны, 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 увеличиением интенсивности колебаний при 1062 см<sup>-1</sup>, что коррелирует с интенсивностью детектируемого сигнала и антибиотикорезистентностью бактерии (от ТБ-ЧВ к ШЛУ).

Следующим шагом был проведен анализ липидного состава спектров микобактерий в высокочастотной области. Были детально проанализированы спектральные максимумы белков и липидов в соответствии с [358, 359]. Выявлены различия в спектральных картинах для легочных и внелегочных штаммов, а также штаммов с различной антибиотикорезистентностью внутри образцов одного штамма (рис. 24, a,  $\delta$ ).



Рис. 24. Спектры комбинационного рассеяния света для легочных (*a*) и внелегочных штаммов (*б*) для ТБ-ЧВ (синяя линия),
 МЛУ (желтая линия), ШЛУ (красная линия) микобактерий.
 Дополнительно для анализа проводилось разложения каждого спектра с использованием гауссиан (вставки)

Для легочных штаммов были идентифицированы колебательные группы, отраженные в таблице 8. Были выявлены колебания групп: CH<sub>2</sub>-симметричные валентные колебания в протеинах и липидах, CH<sub>3</sub> ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах, относящиеся к внутриядерному содержимому. Интенсивность колебательных максимумов также менялась в зависимости от анализируемого штамма. В направлении уменьшения антибиотикорезистентности от ШЛУ к МЛУ интенсивность росла на 25 % для колебания CH<sub>2</sub> с частотой 2847 см<sup>-1</sup> и на 7 % для колебания CH<sub>2</sub> с частотой 2932 см<sup>-1</sup>. Для колебания CH<sub>3</sub> на частоте 2879 см<sup>-1</sup> не было детектировано явных колебаний спектральной интенсивности.

Для внелегочных штаммов полученные спектры изображены на рисунке 25. Для них также были определены колебания групп: CH<sub>2</sub>-симметичные валентные колебания в липидах, CH<sub>3</sub>-ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах — 2847 см<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>-ассиметричные валентные колебания в протеинах и липидах 2879 см<sup>-1</sup>, относящиеся к внутриядерному содержимому, — 2932 см<sup>-1</sup>. Были задетектированы изменения интенсивности колебательных мод. В направлении увеличения антибиотикорезистентности от ТБ-ЧВ к ШЛУ интенсивность колебания CH<sub>2</sub> 2847 см<sup>-1</sup> увеличивается на 18 % и колебания CH<sub>2</sub> на 2847 см<sup>-1</sup> увеличивалась на 3 %. С другой стороны, от ТБ-ЧВ к МЛУ интенсивность колебаний уменьшается на 10 % для CH<sub>2</sub>-колебаний липидов на 2847 см<sup>-1</sup>. Для колебания 2879 см<sup>-1</sup> изменений интенсивности спектров не наблюдалось.



Рис. 25. Картина распределения интенсивностей основных колебательных максимумов ТБ-ЧВ (синие линии), МЛУ (желтые линии), ШЛУ (красные линии) в высокочастотной области для внелегочных штаммов (*a*) и легочных штаммов (*б*)

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света 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 мы не обнаружили изменений, но было выявлено небольшое уменьшение колебаний белков СН., 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. Так же, как и в вышеописанных данных, для легочных штаммов в целом наблюдалось увеличение интенсивности спектральных компонент в сравнении с ТБ-ЧВ и ШЛУ (там, где изменение было зарегистрировано), а во внелегочных штаммах — противоположная картина. Данная информация может быть использована в качестве характерных маркеров для различения лекарственно чувствительных, МЛУ и ШЛУ легочных и внелегочных штаммов МБТ (табл. 8). 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 и 2932 см<sup>-1</sup>.

Таблица 8

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

Легочные штаммы		Внелегочные штаммы			Колебательная	
ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	мода
2847 m	2847 m	2847 mw	2847 m	2847 m	2847 ms	СН <sub>2</sub> -симметич- ные валентные колебания в липидах
2879 s	2879 s	2879 s	2879 s	2879 s	2879 s	СН <sub>3</sub> -ассиме- тричные ва- лентные колеба- ния в протеинах и липидах

Лего	Легочные штаммы		Внелегочные штаммы			Колебательная
ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	мода
2932 s	2932 s	2932 ms	2932 ms	2932 m	2932 ms	СН <sub>2</sub> -асси-
						метричные
						валентные коле-
						бания в протеи-
						нах и липидах,
						относящиеся
						к внутриядер-
						ному содержи-
						мому

Окончание табл. 7

Примечание: где w — слабые колебания; m — средние колебания; s — интенсивные колебания; vs — очень интенсивные колебания; vw — очень слабые колебания; br — широкий максимум; sh — плечо.

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

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

Поскольку одной из потенциальных полос, характеризующих изменение антибиотикорезистентности, был максимум на 1171 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 спек-

тральной картины в области 1000—1500 см<sup>-1</sup>. С применением КР- и ГКР-спектроскопии были проанализированы полученные спектры бактериальных конгломератов размером  $5 \times 5$  микрон, была определена спектральная картина для каждого штамма исследуемых микобактерий. Бактериальный конгломерат состоял из одного «монослоя» бактерий. Отмечено изменение интенсивности колебания на 1171 см<sup>-1</sup>, характерного для колебательных групп глутатиона (GSH). Проведен детальный анализ спектральной картины в области 1000—1500 см<sup>-1</sup> и сравнение с референтными штаммами.

Для легочных штаммов ТБ-ЧВ, МЛУ, ШЛУ наблюдались характеристические колебания на величине спектральных сдвигов 1076, 1171, 1255, 1309, 1369 и 1457 см<sup>-1</sup> (рис. 26).



Рис. 26. Спектры комбинационного рассеяния света для легочных штаммов с различной лекарственной резистентностью: голубая линия — ТБ-ЧВ, желтая линия — МЛУ, красная линия — ШЛУ

Результаты анализа спектральных данных легочных штаммов были сведены в таблицу 9. В ней были отражены положения спектральных максимумов для легочных штаммов микобактерий различной лекарственной устойчивости. Данные максимумы сравнивались с результатами теоретических расчетов структуры глутатиона в соответствии с [1]. Было показано изменение интенсивности анализируемых максимумов. Интенсивность увеличивалась для всех спектральных мод от ТБ-ЧВ к XDR с положением максимума 1076, 1171, 1255, 1309, 1369, 1457 см<sup>-1</sup>. Для ТБ-ЧВ-штаммов изменения на спектральных максимумах 1309 и 1457 см<sup>-1</sup> не детектировалась. Был отмечен рост интенсивности сигнала для всех штаммов в целом, однако для МЛУ-штаммов спектральные максимумы проявлялись на величинах спектрального сдвига 1076 и 1369 см<sup>-1</sup>.

Таблица 9

ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	Колебательная мод
1076 w	1076 w	1076	v(N14-C15)(13) + v(C10-C9)
			$(21) + (C10-H2)(13) + \sigma(C10-$
			S11-H31)(13)
1171 w		1171 mw	$v(O18-C8)(16) + \sigma(H25-$
			$N7-C6$ )(10) + $\gamma$ (C6-H24)(11)
1255 w		1255	v(O17-C16) (25) + (C15-H2)
			(44)
		1309 w	(C5-H2)(36) + (C10-H2)(13)
1369 vw	1369 w	1369 mw	(C4-H2)(18) + (C5-H2)(57)
		1457	(C4-H2)(24) + (C5-H2)(66)

# Спектральные характеристики легочных штаммов микобактерий туберкулеза

Примечание: где w — слабые колебания; m — средние колебания; s — интенсивные колебания; vs — очень интенсивные колебания; vw — очень слабые колебания; br — широкий максимум; sh — плечо

Для внелегочных штаммов микобактерий (табл. 10) наблюдалась более сложная картина. Для штаммов ТБ-ЧВ и ШЛУ интенсивность уменьшалась для максимумов: 1171, 1255 см<sup>-1</sup> и увеличивалась для 1076 см<sup>-1</sup>. Был отмечен незначительный синий сдвиг спектра на величину около 3 см<sup>-1</sup>, соответствующий предполагаемой конформации структуры молекулы глутатиона.

Таблица 10

ТБ-ЧВ	МЛУ	ШЛУ	Колебательная мода
1076 w	1076 w	1076	v(N14-C15)(13) +v(C10-C9)
			$(21)+(C10-H2)(13) + \sigma(C10-$
			S11-H31)(13)
1171 w		1171 mw	$v(O18-C8)(16) + \sigma(H25-$
			$N7-C6$ )(10) + $\gamma$ (C6-H24)(11)
1255 w		1255	v(O17-C16)(25) + (C15-H2)
			(44)
		1309 w	(C5-H2)(36) + (C10-H2)(13)
1369 vw	1369 w	1369 mw	(C4-H2)(18) + (C5-H2)(57)
		1457	(C4-H2)(24) + (C5-H2)(66)

#### Спектральные характеристики внелегочных штаммов микобактерий туберкулеза

Таким образом, с помощью КР-спектроскопии был проанализированы моды трипептида глутатиона, состоящего из L-цистеина, глицина и L-глутамата, который (или его составк ляющие) может быть 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. С основой 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. Известно, что глутатион играет важную роль в активации НК-клеток, это может приводить к смерти микобактерии. С другой стороны, микобактерия не синтезирует глутатион, но синтезирует субстанцию микотиол, структура которой сходна по строению с глутатионом. Также стоит отметить, что

глутатион может встраиваться в состав клеточной стенки или быть прикрепленным к ней. С другой стороны глутатион может формировать соединение S-нитрозоглутатион, образующееся в процессе взаимодействия с NO (при терапии) на поверхє ности клеточной стенки. Как таковой S-нитрозоглутатион не может транспортироваться внутрь клетки, однако соединение S-nitroso-L-cysteinyglycine способно проникать внутрь клетки через транспортные каналы, высвобождая затем NO, что привон дит к смерти микобактерии туберкулеза.

Поведение внелегочных максимумов (табл. 9) уже обсуждалось выше и может быть связано с содержанием миколовых кислот в микобактерии. Однако иное поведение интенсивностей спектральных максимумов демонстрирует различие спектральной картины легочных и внелегочных штаммов и может быть основой распознавания внутривидовых бактериальных различий.

## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕМАТИКИ ДЛЯ КУРСОВЫХ И ДИПЛОМНЫХ РАБОТ, АСПИРАНТСКИХ ДИССЕРТАЦИЙ

Раскрытая тема имеет большой потенциал для разработки с точки зрения оптической спектроскопии. В связи с этим возможна проработка следующих тематик курсовых работ, выпускных квалификационных работ, аспирантских диссертаций.

1. Оптическая спектроскопия клеток *E. coli* при воздействии варьируемой температуры внешней среды.

2. Моделирование оптических свойств наночастиц металлов и шероховатых поверхностей.

3. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света модельного красителя.

4. Спектральное картирование конгломератов и одиночных клеток микобактерий.

5. Фотофизические свойства клеточных стенок микобактерий в присутствии наночастиц металлов.

6. Расчет оптических свойств металлических наночастиц в комплексах с красителем.

7. Поиск спектральных маркеров воздействия лекарственных препаратов методом гигантского комбинационного рассеяния света.

8. Расчет оптических свойств димеров наночастиц благородных металлов.

9. Оценка оптических процессов вблизи наночастиц внутри клетки микобактерии.

### СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Raether H.* Surface plasmons on smooth surfaces // Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. 2006. P. 4—9.

2. *Hutter E., Fendler J. H.* Exploitation of localized surface plasmon resonance // Advanced materials. 2004. Vol. 16, № 19. P. 1685—1706.

3. *Maier S. A., Atwater H. A.* Plasmonics: Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures // Journal of applied physics. 2005. Vol. 98, № 1. P. 10.

4. *Philip A., Kumar A. R.* The performance enhancement of surface plasmon resonance optical TE-4Bors using nanomaterials: A review // Co-ordination Chemistry Reviews. 2022. Vol. 458. P. 214424.

5. *Petryayeva E., Krull U. J.* Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and 717 bioTE-4Bing–A review // Anal. Chim. Acta. 2011. № 706. P. 8–24.

6. Ozbay E. Plasmonics: merging photonics and electronics at nanoscale dimensions // Science. 2006. Vol. 311, № 5758. P. 189—193.

7. Loh J. Y. Y., Safari M., Mao, C. et al. Near-perfect absorbing copper metamaterial for solar fuel generation // Nano Letters. 2021. Vol. 21, № 21. P. 9124—9130.

8. *Kim M., Ham W. K., Kim W. et al.* Optical properties of nucleobase thin films as studied by attenuated total reflection and surface-enhanced Raman spectroscopy // Optical Materials. 2018. Vol. 78. P. 531—537.

9. *Kim J. B., Zou Y.,Kim Y. D., Kim J. J.* Multiple surface plasmon waves in [prism/Ag/SiO<sub>2</sub> helical thin film] Kretschmann configuration // Thin solid films. 2011. Vol. 520, Nº 5. P. 1451—1453.

10. *Kim J. B., Peranantham P., Shin Y. S. et al.* Surface plasmon resonances at a  $[Ag/SiO_2 helical thin-film]$  interface // Journal of the Korean Physical Society. 2012. Vol. 60. P. 1249—1252.

11. Koshizaki N., Sasaki T., Tsuchiya T. 3-2. Laser Processing for Nanomaterial Preparation // Photoreaction Control and Photofunctional Materials. 2001. Vol. 1997. P. 56. 12. Lee G. J., Choi E. H., Ham, W. K. Circular dichroism, surface-enhanced Raman scattering, and spectroscopic ellipsometry studies of chiral polyfluorene-phenylene films // Optical Materials Express. 2016. Vol. 6, № 3. P. 767—781.

13. *Moskovits M., Tay L. L., Yang J. et al.* FKPC and the single molecule // Optical properties of nanostructured random media. Berlin ; Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2002. P. 215–227.

14. Wang Z., Pan S., Krauss T. D. et al. The structural basis for giant enhancement enabling single-molecule Raman scattering // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. Vol. 100, № 15. P. 8638—8643.

15. Lakowicz J. R., Malicka J., Gryczynski I. et al. Radiative decay engineering: the role of photonic mode density in biotechnology // Journal of physics D: Applied physics. 2003. Vol. 36, № 14. P. R240.

16. *Guzatov D. V., Klimov V. V.* Radiative decay engineering by triaxial nanoellipsoids // Chemical physics letters. 2005. Vol. 412, № 4—6. P. 341—346.

17. Wang L., Hasanzadeh Kafshgari M., Meunier M. Optical properties and applications of plasmonic-metal nanoparticles // Advanced Functional Materials. 2020. Vol. 30, № 51. P. 2005400.

18. De Aberasturi D. J., Serrano-Montes A. B., Liz-Marzán L. M. Modern applications of plasmonic nanoparticles: from energy to health // Advanced Optical Materials. 2015. Vol. 3, N 5. P. 602—617.

19. Vo-Dinh T., Liu Y., Fales A. M. et al.  $\Gamma$ KPC nanobiosensors and nanoreporters: golden opportunities in biomedical applications // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2015. Vol. 7, No 1. P. 17–33.

20. Fan X., Zheng W., Singh D. J. Light scattering and surface plasmons on small spherical particles // Light: Science & Applications. 2014. Vol. 3,  $N_{2}$  6. P. e179—e179.

21. Stiles P. L., Dieringe J. A., Shah N. C. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy // Annu. Rev. Anal. Chem. 2008. Vol. 1. P. 601—626.

22. *Kelly K. L., Coronado E., Zhao L. L., Schatz G. C.* The optical properties of metal nanoparticles: 759 the influence of size, shape, and dielectric environment // J. Phys. Chem. B. 2003. № 107. P. 668—677.

23. *Qiu Y., Kuang C., Liu X. et al.* Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // Biosensors. 2022. Vol. 22, № 13. P. 4889.

24. *Qiu Y., Kuang C., Liu X., Tang L.* Mesoscopic and microscopic strategies for engineering plasmon-enhanced raman scattering // Advanced Optical Materials. 2018. Vol. 6, № 16. P. 1701097.

25. Jeong Y., Kook Y. M., Lee K. et al. Metal enhanced fluorescence (MEF) for Biosensors: General approaches and a review of recent developments // Biosensors and Bioelectronics. 2018. Vol. 111. P. 102—116.

26. *Deng W., Xie F., Baltar H. T. et al.* Metal-enhanced fluorescence in the life sciences: here, now and beyond // Physical Chemistry Chemical Physics. 2013. Vol. 15, № 38. P. 15695—15708.

27. Lakowicz J. R., Geddes C. D., Gryczynski I. et al. Advances in surface-enhanced fluorescence // Journal of fluorescence. 2004. Vol. 14. P. 425-441.

28. Aslan K., Gryczynski I., Malicka J. et al. Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology // Current opinion in biotechnology. 2005. Vol. 16, № 1. P. 55–62.

29. *Aslan K., Lakowicz J. R., Szmacinski H.* Metal-enhanced fluorescence solution-based TE-4Bing platform // Journal of fluorescence. 2004. Vol. 14. P. 677—679.

30. *Taflove A., Hagness S. C., Piket-May M.* Computational electromagnetics: the finite-difference time-domain method // The Electrical Engineering Handbook. 2005. Vol. 3. P. 629—670.

31. *Oubre C., Nordlander P.* Optical properties of metallodielectric nanostructures calculated using the finite difference time domain method // The Journal of Physical Chemistry B. 2004. Vol. 108,  $N_{\rm P}$  46. P. 17740—17747.

32. *Kim J., Lee G. J., Park I. et al.* Finite-difference time-domain numerical simulation study on the optical properties of silver nanocomposites // Journal of nanoscience and nanotechnology. 2012. Vol. 12, № 7. P. 5527—5531.

33. *Kim J., Lee G. J., Park I., Lee Y. P.* Influence of ZnO Nanorod Morphology on Optical 784 Confinement—Finite-Difference Time-Domain Numerical Simulation Study // J. Nanosci. Nan 785 otechno. 2011. № 11. P. 7238—7241.

34. Sosa I. O., Noguez C., Barrera R. G. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes // The Journal of Physical Chemistry B. 2003. Vol. 107, № 26. P. 6269–6275.

35. *Makkar P., Ghosh N. N.* A review on the use of DFT for the prediction of the properties of nanomaterials // RSC advances. 2021. Vol. 11,  $N_{\odot}$  45. P. 27897—27924.

36. *Jackson J. D.* Classical electrodynamics 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley & sons. Inc., N. Y., 1999.

37. Darienzo R. E., Chen O., Sullivan M. et al. Au nanoparticles for FKPC: Temperature-controlled nanoparticle morphologies and their Raman enhancing properties // Materials chemistry and physics. 2020. Vol. 240. P. 122143.

38. *Qayyum H., Amin S., Ahmed W. et al.* Laser-based two-step synthesis of Au-Ag alloy nanoparticles and their application for surface-enhanced Raman spectroscopy ( $\Gamma$ KPC) based detection of rhodamine 6G and urea nitrate // Journal of Molecular Liquids. 2022. Vol. 365. P. 120120.

39. *Kim K., Lee H. S.* Effect of Ag and Au nanoparticles on the ΓKPC of 4-aminobenzenethiol assembled on powdered copper // The Journal of Physical Chemistry B. 2005. Vol. 109, № 40. P. 18929—18934.

40. Aslan K., Malyn S. N., Geddes C. D. Angular-dependent metal-enhanced fluorescence from silver colloid-deposited films: opportunity for angular-ratiometric surface assays // Analyst. 2007. Vol. 132, № 11. P. 1112—1121.

41. Aslan K., Malyn S. N., Geddes C. D. Metal-enhanced fluorescence from gold surfaces: angular dependent emission // Journal of fluorescence. 2007. Vol. 17. P. 7—13.

42. *Cabello G., Nwoko K. C., Marco J. et al.* Cu@ Au self-assembled nanoparticles as SERS-active substrates for (bio) molecular sensing // Journal of Alloys and Compounds. 2019. Vol. 791. P. 184—192.

43. *De Barros Santos E., Sigoli F. A., Mazali I. O.* Metallic Cu nanoparticles dispersed into porous glass: A simple green chemistry approach to prepare ΓKPC substrates // Materials Letters. 2013. Vol. 108. P. 172—175.

44. *Zhang Y., Asla K., Previte M. J. et al.* Metal-enhanced fluorescence from copper substrates // Applied Physics Letters. 2007. Vol. 90, № 17. P. 173116.

45. *Gutiérrez Y., Alcaraz de la Osa R., Ortiz D. et al.* Plasmonics in the ultraviolet with aluminum, gallium, magnesium and rhodium // Applied Sciences. 2018. Vol. 8, N 1. P. 64.

46. *McMahon J. M., Schatz G. C., Gray S. K.* Plasmonics in the ultraviolet with the poor metals Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, and Bi // Physical Chemistry Chemical Physics. 2013. Vol. 15, N 15. P. 5415—5423.

47. *Tanabe I., Shimizu M., Kawabata R. et al.* Far-and deep-ultraviolet surface plasmon resonance using Al film for efficient TБ-ЧВing of organic thin overlayer // ТБ-ЧВors and Actuators A: Physical. 2020. Vol. 301. P. 111661.

48. *Knight M. W., King N. S., Liu L. et al.* Aluminum for plasmonics // ACS nano. 2014. Vol. 8, № 1. P. 834—840.

49. *Gutierrez Y., Ortiz D., Sanz J. et al.* How an oxide shell affects the ultraviolet plasmonic behavior of Ga, Mg, and Al nanostructures // Optics express. 2016. Vol. 24, № 18. P. 20621–20631.

50. Yang Y., Wu P. C., Kim T. H. et al. Gallium nanoparticle plasmonics // APS March Meeting Abstracts. 2010. Vol. 2010. P. Y14. 005.

51. *Gutierrez Y., González F., Saiz J. M. et al.* Metals and dielectrics for UV plasmonics // Nanophotonics VIII. SPIE, 2020. Vol. 11345. P. 26—34.

52. Voet D., Gratzer W. B., Cox R. A. et al. Absorption spectra of nucleotides, polynucleotides, and nucleic acids in the far ultraviolet // Biopolymers: Original Research on Biomolecules. 1963. Vol. 1, № 3. P. 193—208.

53. *Cardinal M. F., Vander Ende E., Hackler R. A. et al.* Expanding applications of ΓKPC through versatile nanomaterials engineering // Chemical Society Reviews. 2017. Vol. 46, № 13. P. 3886–3903.

54. *Lee H. K., Lee Y. H., Koh C. S. L. et al.* Designing surface-enhanced Raman scattering (ΓKPC) platforms beyond hotspot engineering: emerging opportunities in analyte manipulations and hybrid materials // Chemical Society Reviews. 2019. Vol. 48, № 3. P. 731—756.

55. *Laing S., Gracie K., Faulds K.* Multiplex in vitro detection using FKPC // Chemical Society Reviews. 2016. Vol. 45, № 7. P. 1901—1918.

56. *Halas N*. Playing with plasmons: tuning the optical resonant properties of metallic nanoshells // Mrs Bulletin. 2005. Vol. 30, № 5. P. 362—367.

57. *Schlücker S.* Surface-Enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications // Angewandte Chemie International Edition. 2014. Vol. 53, № 19. P. 4756—4795.

58. *Kundu S., Chen Y., Dai W. et al.* Enhanced catalytic and ΓKPC activities of size-selective Rh NPs on DNA scaffolds // Journal of Materials Chemistry C. 2017. Vol. 5, № 10. P. 2577–2590.

59. Zettsu N., McLellan J. M., Wiley B. et al. Synthesis, Stability, and Surface Plasmonic Properties of Rhodium Multipods, and Their Use as Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering // Angewandte Chemie. 2006. Vol. 118, № 8. P. 1310—1314.

60. *Tian Z. Q., Ren B., Wu D. Y.* Surface-enhanced Raman scattering: from noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures // The Journal of Physical Chemistry B. 2002. Vol. 106, № 37. P. 9463—9483.

61. *Hunyadi Murph S. E., Coopersmith K. J.* Fabrication of silverrhodium nanomaterials for chemical TE-4Bing applications // Nanocomposites VI: Nanoscience and Nanotechnology in Advanced Composites. Springer International Publishing, 2019. P. 95—104.

62. Sangeetha K., Sankar S. S., Karthick K. et al. Synthesis of ultra-small Rh nanoparticles congregated over DNA for catalysis and ΓKPC applications // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019. Vol. 173. P. 249—257.

63. *Kumaravel S., Karthick K., Sankar S. S. et al.* Engineered Rh Nano-networks on DNA for  $\Gamma$ KPC Applications // Journal of Nanotechnology and Nanomaterials. 2020. Vol. 1, N 2. P. 57—64.

64. *Zhang Y., Geddes C. D.* Metal-enhanced fluorescence from thermally stable rhodium nanodeposits // Journal of Materials Chemistry. 2010. Vol. 20, № 39. P. 8600—8606.

65. Rodrigues M. P. D. S., Dourado A. H., Cutolo L. D. O. et al. Gold-rhodium nanoflowers for the plasmon-enhanced hydrogen evolution reaction under visible light // ACS catalysis. 2021. Vol. 11, N 21. P. 13543—13555.

66. Rodrigues M. P. D. S., Dourado A. H., Cutolo L. D. O. et al. Metal-enhanced intrinsic fluorescence of nucleic acids using platinum nanostructured substrates // Chemical physics letters. 2012. Vol. 548. P. 45–50.

67. *Chu C. S., Sung T. W., Lo Y. L.* Enhanced optical oxygen TE-4Bing property based on Pt (II) complex and metal-coated silica nanoparticles embedded in sol–gel matrix // TE-4Bors and Actuators B: Chemical. 2013. Vol. 185. P. 287—292.

68. *Bigall N. C., Härtling T., Klose M. et al.* Monodisperse platinum nanospheres with adjustable diameters from 10 to 100 nm: synthesis and distinct optical properties // Nano letters. 2008. Vol. 8, № 12. P. 4588–4592.

69. *Mafuné F., Kohno J. Y., Takeda Y. et al.* Formation of stable platinum nanoparticles by laser ablation in water // The Journal of Physical Chemistry B. 2003. Vol. 107, № 18. P. 4218–4223. 70. Cueto M., Piedrahita M., Caro C. et al. Platinum nanoparticles as photoactive substrates for mass spectrometry and spectroscopy TE-4Bors // The Journal of Physical Chemistry C. 2014. Vol. 118,  $N_{\rm P}$  21. P. 11432—11439.

71. *Kim K., Lee H. B., Choi J. Y. et al.* Surface-enhanced Raman scattering of 4-aminobenzenethiol in nanogaps between a planar Ag substrate and Pt nanoparticles // The Journal of Physical Chemistry C. 2011. Vol. 115, № 27. P. 13223—13231.

72. *Kim K., Kim K. L., Lee H. B. et al.* Surface-enhanced Raman scattering on aggregates of platinum nanoparticles with definite size // The Journal of Physical Chemistry C. 2010. Vol. 114, № 43. P. 18679—18685.

73. Yang Y., Huang Z., Li D. Solvothermal synthesis of platinum nanoparticles and their ΓKPC properties. 5<sup>th</sup> International Symposium on Advanced Optical Manufacturing and Testing Technologies: Optoelectronic Materials and Devices for Detector, Imager, Display, and Energy Conversion Technology // SPIE. 2010. № 22. P. 116–120.

74. *Kneipp K., Kneipp H., Kartha V. B. et al.* Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS) // Physical Review E. 1998. Vol. 57, № 6. P. R6281.

75. *Lin C. C., Yang Y. M., Chen Y. F. et al.* A new protein A assay based on Raman reporter labeled immunogold nanoparticles // BioTБ-ЧBors and Bioelectronics. 2008. Vol. 24, № 2. P. 178—183.

76. *Alexandre M. T., Gundermann K., Pascal A. A. et al.* Probing the carotenoid content of intact Cyclotella cells by resonance Raman spectros-copy // Photosynthesis research. 2014. Vol. 119. P. 273—281.

77. Scully M. O., Kattawar G. W., Lucht R. P. et al. FAST CARS: Engineering a laser spectroscopic technique for rapid identification of bacterial spores // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002. Vol. 99, № 17. P. 10994—11001.

78. *Xie C., Chen D., Li Y.* Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers // Optics letters. 2005. Vol. 30,  $N_{\text{O}}$  14. P. 1800—1802.

79. *Liu Y., Zhou H., Hu Z. et al.* Label and label-free based surface-enhanced Raman scattering for pathogen bacteria detection: A review // Biosensors and Bioelectronics. 2017. Vol. 94. P. 131—140.
80. Schuster K. C., Urlaub E., Gapes J. R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture // Journal of Microbiological Methods. 2000. Vol. 42, N 1. P. 29—38.

81. *Premasiri W. R., Moir D. T., Klempner M. S. et al.* Characterization of the surface enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria // The Journal of Physical Chemistry B. 2005. Vol. 109, № 1. P. 312–320.

82. Jarvis R. M., Goodacre R. Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy // Analytical chemistry. 2004. Vol. 76,  $N_{\odot}$  1. P. 40—47.

83. *Cao Y. W. C., Jin R., Mirkin C. A.* Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection // Science. 2002. Vol. 297, № 5586. P. 1536—1540.

84. *Hidi I. J., Jahn M., Weber K. et al.* Lab-on-a-chip-surface enhanced Raman scattering combined with the standard addition method: toward the quantification of nitroxoline in spiked human urine samples // Analytical chemistry. 2016. Vol. 88, № 18. P. 9173—9180.

85. *Wang S., Yu M., Jiang J., Zhang W. et al.* Evidence aggregation for answer re-ranking in open-domain question answering. arXiv preprint arX-iv:1711.05116. 2017.

86. *Büchner T., Drescher D., Traub H. et al.* Relating surface-enhanced Raman scattering signals of cells to gold nanoparticle aggregation as determined by LA-ICP-MS micromapping // Analytical and bioanalytical chemistry. 2014. Vol. 406. P. 7003—7014.

87. *Cheong Y., Kim Y. J., Kang H. et al.* Rapid label-free identification of Klebsiella pneumoniae antibiotic resistant strains by the drop-coating deposition surface-enhanced Raman scattering method // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2017. Vol. 183. P. 53—59.

88. Kahraman M., Yazıcı M. M. Convective assembly of bacteria for surface-enhanced Raman scattering // Langmuir. 2008. Vol. 24, № 3. P. 894—901.

89. *Drake P., Jiang P. S., Chang H. W. et al.* Raman based detection of Staphylococcus aureus utilizing single domain antibody coated nanoparticle labels and magnetic trapping // Analytical Methods. 2013. Vol. 5, № 16. P. 4152—4158.

90. *Qu L. L., Liu Y. Y., He S. H. et al.* Highly selective and sensitive surface enhanced Raman scattering nanoTE-4Bors for detection of hydrogen peroxide in living cells // Biosensors and Bioelectronics. 2016. Vol. 77. P. 292—298.

91. *Huang M., Yan H., Chen C. et al.* Phonon softening and crystallographic orientation of strained graphene studied by Raman spectroscopy // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. Vol. 106, № 18. P. 7304—7308.

92. Pazos-Perez N., Pazos E., Catala C. et al. Ultrasensitive multiplex optical quantification of bacteria in large samples of biofluids // Scientific Reports. 2016. Vol. 6, № 1. P. 1—10.

93. Mühlig A., Bocklitz T., Labugger I. et al. LOC-SERS: a promising closed system for the identification of mycobacteria // Analytical chemistry. 2016. Vol. 88, № 16. P. 7998—8004.

94. *Stöckel S., Kirchhoff J., Neugebauer U. et al.* The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms // Journal of Raman Spectroscopy. 2016. Vol. 47, № 1. P. 89–109.

95. Lorenz B., Wichmann C., Stöckel S. et al. Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria // Trends in microbiology. 2017. Vol. 25, № 5. P. 413—424.

96. *Neumann A. C., Bauer D., Hoelscher M. et al.* Identifying dormant growth state of mycobacteria by orthogonal analytical approaches on a single cell and ensemble basis // Analytical chemistry. 2018. Vol. 91, № 1. P. 881–887.

97. *Rivera-Betancourt O. E., Karls R., Grosse-Siestrup B. et al.* Identification of mycobacteria based on spectroscopic analyses of mycolic acid profiles // Analyst. 2013. Vol. 138, № 22. P. 6774—6785.

98. Sathyavathi R., Dingari N. C., Barman I. et al. Raman spectroscopy provides a powerful, rapid diagnostic tool for the detection of tuberculous meningitis in ex vivo cerebrospinal fluid samples // Journal of biophotonics. 2013. Vol. 6, № 8. P. 567—572.

99. Owens N. A., Laurentius L. B., Porter M. D. et al. Handheld Raman spectrometer instrumentation for quantitative tuberculosis biomarker detection: a performance assessment for point-of-need infectious disease diagnostics // Applied Spectroscopy. 2018. Vol. 72, № 7. P. 1104—1115. 100. Jennings G. K., Modi A., Elenewski J. E. et al. Spin equilibrium and O2-binding kinetics of Mycobacterium tuberculosis CYP51 with mutations in the histidine-threonine dyad // Journal of inorganic biochemistry. 2014. Vol. 136. P. 81—91.

101. Crawford A. C., Laurentius L. B., Mulvihill T. S. et al. Detection of the tuberculosis antigenic marker mannose-capped lipoarabinomannan in pretreated serum by surface-enhanced Raman scattering // Analyst. 2017. Vol. 142, № 1. P. 186—196.

102. Owens N. A., Laurentius L. B., Porter M. D. et al. Handheld Raman spectrometer instrumentation for quantitative tuberculosis biomarker detection: a performance assessment for point-of-need infectious disease diagnostics // Applied Spectroscopy. 2018. Vol. 72, № 7. P. 1104—1115.

103. Owens D. K., Davidson K. W., Krist A. H. et al. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement // Jama. 2019. Vol. 322, № 7. P. 652—665.

104. *Perumal J., Dinish U. S., Bendt A. K. et al.* Identification of mycolic acid forms using surface-enhanced Raman scattering as a fast detection method for tuberculosis // International Journal of Nanomedicine. 2018. Vol. 13. P. 6029.

105. Robinson A. M., Zhao L., Alam M. Y. S. et al. The development of "fab-chips" as low-cost, sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrates for analytical applications // Analyst. 2015. Vol. 140,  $N_{\rm P}$  3. P. 779—785.

106. *Karaballi R. A., Nel A., Krishnan S. et al.* Development of an electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) aptasensor for direct detection of DNA hybridization // Physical Chemistry Chemical Physics. 2015. Vol. 17, № 33. P. 21356—21363.

107. *Zhou X., Hu Z., Yang D. et al.* Bacteria detection: from powerful SERS to its advanced compatible techniques // Advanced Science. 2020. Vol. 7, № 23. P. 2001739.

108. *Perumal J., Wang Y., Attia A. B. E. et al.* Towards a point-of-care SERS TБ-ЧВог for biomedical and agri-food analysis applications: A review of recent advancements // Nanoscale. 2021. Vol. 13, № 2. P. 553—580.

109. *Alula M. T., Krishnan S., Hendricks N. R. et al.* Identification and quantitation of pathogenic bacteria via in-situ formation of silver nanoparticles on cell walls, and their detection via SERS // Microchimica Acta. 2017. Vol. 184. P. 219–227.

110. *Kote J. R., Kadam A. S., Ubaidullah M. et al.* Antimycobacterial, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Mesoporous Nickel Oxide Nanoparticles for Healthcare // Coatings. 2020. Vol. 10, № 12. P. 1242.

111. *Kumar S., Gopinathan R., Chandra G. K. et al.* Rapid detection of bacterial infection and viability assessment with high specificity and sensitivity using Raman microspectroscopy // Analytical and bioanalytical chemistry. 2020. Vol. 412. P. 2505—2516.

112. *Robert H. M., Usha D., Amalanathan M. et al.* Spectroscopic (IR, Raman, UV, NMR) characterization and investigation of reactive properties of pyrazine-2-carboxamide by anti-bacterial, anti-mycobacterial, Fukui function, molecular docking and DFT calculations // Chemical Data Collections. 2020. Vol. 30. P. 100583.

113. Verma A. K., Soni R. K. Silver nanodendrites for ultralow detection of thiram based on surface-enhanced Raman spectroscopy // Nanotechnology. 2019. Vol. 30, № 38. P. 385502.

114. *Thomas R., Mary Y. S., Resmi K. S. et al.* Synthesis and spectroscopic study of two new pyrazole derivatives with detailed computational evaluation of their reactivity and pharmaceutical potential // Journal of Molecular Structure. 2019. Vol. 1181. P. 599—612.

115. Rawat P., Singh R. N., Ranjan A. et al. Antimycobacterial, antimicrobial activity, experimental (FT-IR, FT-Raman, NMR, UV-Vis, DSC) and DFT (transition state, chemical reactivity, NBO, NLO) studies on pyrrole-isonicotinyl hydrazone // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2017. Vol. 179. P. 1—10.

116. *Maheswari R., Manjula J.* Vibrational spectroscopic analysis and molecular docking studies of (E)-4-methoxy-N'-(4-methylbenzylidene) benzohydrazide by DFT // Journal of Molecular Structure. 2016. Vol. 1115. P. 144—155.

117. Ulahannan R. T., Panicker C. Y., Varghese H. T. et al. Molecular structure, FT-IR, FT-Raman, NBO, HOMO and LUMO, MEP, NLO and molecular docking study of 2-[(E)-2-(2-bromophenyl) ethenyl] quino-line-6-carboxylic acid // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2015. Vol. 151. P. 184—197.

118. *Wang L., Zhang X. D., Tang J. W. et al.* Machine learning analysis of SERS fingerprinting for the rapid determination of Mycobacterium tuberculosis infection and drug resistance // Computational and structural biotechnology journal. 2022. Vol. 20. P. 5364—5377.

119. *Stiles P. L., Dieringer J. A., Shah N. C. et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy // Annu. Rev. Anal. Chem. 2008. Vol. 1. P. 601—626.

120. Le Ru E. C., Etchegoin P. G. Rigorous justification of the |E| 4 enhancement factor in surface enhanced Raman spectroscopy // chemical Physics letters. 2006. Vol. 423, N 1–3. P. 63–66.

121. Zyubin A., Rafalskiy V., Lopatin M. et al. Spectral homogeneity of human platelets investigated by SERS // Plos one. 2022. Vol. 17,  $N_{\text{P}}$  5. P. e0265247.

122. *Kimling J., Maier M., Okenve B. et al.* Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited // The Journal of Physical Chemistry B. 2006. Vol. 110, № 32. P. 15700—15707.

123. *Maquelin K., Kirschner C., Choo-Smith L.-P. et al.* Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscop // J. Microbiol. Methods. 2002. № 51. P. 255–271.

124. Tang M., McEwen G. D., Wu Y. 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. Vol. 405, № 5. P. 1577–1591.

125. *Liu T. Y., Chen Y., Wang H. H. et al.* Differentiation of bacteria cell wall using Raman scattering enhanced by nanoparticle array // Journal of nanoscience and nanotechnology. 2012. Vol. 12, № 6. P. 5004—5008.

126. Zyubin A., Lavrova A., Manicheva O. et al. Raman spectroscopy reveals M. tuberculosis strains with different antibiotic susceptibility // Laser Physics Letters. 2019.  $\mathbb{N}$  16 (8). P. 085602.

127. Chiriac C., Tatar A. S., Radu C. et al. Techniques used for the diagnostic of ancient tuberculosis in human remains // Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia. 2014. Vol. 59, № 1.