

## АНОТАЦІЯ

Рябенко Ю.А. Визначення залишкових рідин біотоксинів методами Раман-спектроскопії. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 105 – Прикладна фізика та наноматеріали (Галузь знань 10 – Природничі науки). Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2023.

*Дисертація присвячена* дослідженню та розробці методики одержання композитних матеріалів, які мають метрологічно стійкі параметри, щодо підсилення Раманівського розсіювання складних органічних та біологічних молекул. Ці композити є перспективними для використання, як у біосенсорах, так і в інших виробках для калібрування спектрального обладнання. При цьому важливо, що наведені методи дають можливість отримувати високодобротні резонансні структури, що є стійкі до хімічного та механічного впливу і мають стабільну частоту Фреліха.

Сучасні високоточні спектрометричні методи дослідження дають можливість вивчати топологію та конформацію складних молекул. Одним з методів підвищення чутливості спектральних приладів, що надає можливість детектувати речовини в надмалих концентраціях є підсилення поверхнею комбінаційне розсіювання світла (SERS). В цьому методі зазвичай використовують наночастинки металів розміром від 15 – 50 нм, а в роботі досліджені наночастинки золота 5 – 10 нм. Гранули утворюють композитну структуру з прозорим середовищем підкладки, в якій спостерігається смуга плазмового поглинання, відповідна до коливань плазми вільних електронів. Однак існуючі методики сфокусовані на створенні колоїду у розчинах, або на підкладках з міткою без висушування зразка, що не дає можливості отримувати метрологічне стабільний сигнал SERS. Ефект плазмового резонансу та його використання у SERS відомі давно, та інтерес до створення нових метрологічних методик детектування молекул останнім часом суттєво зріс.

Композитний матеріал, що утворюється за допомогою лазерної імплантації гранулярної плівки золота у приповерхневий шар плавленого кварцу надає

можливість створити метаматеріал стійкий до хімічного та механічного впливу та такий, що має високодобротний резонанс. До цього часу відсутні методики створення таких метрологічно детермінованих композитів. І хоча спроби лазерних термічних імплантацій золота та срібла у приповерхневий шар були здійснені низкою авторів, у дисертації ця методика була вдосконалена та надала можливість створювати метаматеріал з наперед заданими властивостями.

Сучасний розвиток чисельного моделювання надає можливості розрахунку фізичних властивостей топологічно складних наноматеріалів. Тому у роботі наведені чисельні розрахунки модового складу складної топології наночастинки золота та ефективного індексу рефракції мод. Також чисельно було розраховане ближнє поле у «гарячій точці» наночастинки золота та було встановлено ефект зв'язування мод між наночастинками та коливальними рівнями енергії молекулярної групи, що відповідає дипольному переходу. Дані було підтверджено в експериментах з багатошаровим складом плівок. Встановлено, що зв'язок спостерігається на відстанях до 50 нм, що відповідає ближній зоні. Встановлено, що на таких відстанях можна використовувати модель дипольного осцилятора для опису наночастинок металів.

Чисельні розрахунки молекул відомі давно, але складність біологічних молекул надає можливості представити молекули у вигляді квантово-механічної системи та визначити основні її параметри: тензор поляризуємості, квантово-механічні енергетичні рівні та діелектричну проникність металів. Спрощена методика розрахунку діелектричної проникності Родаміну 6G наведена у дисертації та вказано, що таку методику можна застосовувати до великих молекул. Це розширює можливості у чисельному моделюванні підсилення Раманівського розсіювання біологічними молекулами на вискодобротних резонансних системах. Раман-спектроскопія має важливе значення у сучасних біофізичних дослідженнях. Але кількість досліджень вкрай обмежена та не носить системного характеру щодо спектрів токсичних молекул та спектрів речовин, що утворюються у процесі біохімічних реакцій цих токсинів з ферментами, що утворюються під час імунної відповіді. Тому у дисертації

наведена методика визначення присутності токсичної речовини Ботулотоксину А (BoNT A) у сироватці крові хворих на міастенію.

Зазначене вище визначає *актуальність роботи*.

Дисертаційна робота налічує чотири розділи.

*Перший розділ*, представляє літературу, що стосується теми дисертації, включаючи оптичні властивості гранульованих плівок золота. Характеристики описаного матеріалу служать основою для розрахунку частоти Фреліха та визначення смуги плазмового резонансу. У цьому розділі також наводяться гібридні моди в металевих наночастинках і описуються методи розрахунку полів в ближній зоні. Теоретично описано явище гігантського комбінаційного розсіювання (ГКР). Розглядаються основні підходи – електродинамічний та квантово-механічний, що дозволяють пояснити природу підсилення комбінаційного розсіювання коливальних переходів у молекулі.

Також детально описані біохімічні властивості молекули BoNT, різноманітність серотипів та механізм взаємодії з живими організмами. Також наведені методи виявлення BoNT A, описана їх обмеженість та розповсюдженість їх застосування в клінічній біохімії. З цих даних зрозуміло, що використання відомих методів враховує першочергове розуміння симптомів пацієнта для пошуку молекули токсину. У випадку, коли первинні симптоми не є показовими та/або імунна відповідь організму вплинула на результат, пошук саме BoNT стає ускладненим, адже аналіз залежить від конкретних реагентів, таких як оптичні репортери, пептидні субстрати або антитіла, специфічні до цього токсину та певного серотипу. Описується зміна профілю цитокінів при ботулізмі та проведений літературний аналіз порівняння з імунною відповіддю при міастенічному захворюванні.

*Другий розділ* описує експериментальні методи та перелік обладнання, використаного в експерименті. Підтверджується його відповідність сучасним метрологічним стандартам і своєчасне калібрування обладнання перед кожним експериментом. У розділі також описується метод забору крові та процедура виробництва сироватки. Окремо викладено спосіб підготовки резонансної підкладки шляхом термовакуумного осадження металу на оптичне кварцове

скло. Описано методику лазерної імплантації за допомогою дволазерної системи. Наведено опис чисельного алгоритму FDTD, а також методику розрахунку модового складу наночастинок золота. Розрахунок ефективного показника заломлення, що відповідає модовому складу розподілу електричного поля для наносфери золота, проводили за допомогою комерційної програми ANSYS Lumerical. Також наведена методика обробки Раман-спектра у програмному забезпеченні WiRE, фізичний зміст застосування кожного з етапів обробки та обґрунтованість використання певних показників для інтерпретації результатів.

У *третьому розділі* розглядається модель зв'язаного осцилятора в плівках  $Al/ZnS/Ag/SiO_2$ . Наводяться формули розрахунку нормальних коливань плазми вільних електронів у гранулах. Представлена методологія розрахунку константи зв'язування разом із чисельними розрахунками зв'язування в ближній зоні за допомогою ANSYS Lumerical. Експериментально встановлено вплив двох шарів металевих гранул. Було показано, що модель диполь-дипольної взаємодії можна використовувати на відстанях до 50 нм. Розроблено методику визначення плазмової частоти металів за положенням високочастотної смуги поглинання в спектрах оптичної густини. Досліджені моделі діелектричної проникності металевих наночастинок, а також граничні умови їх застосованості у порівнянні з розміром наносфер і коефіцієнтом заповнення. Детально розглянуто новітній спосіб імплантації наночастинок золота в поверхневий шар плавленого кварцу, виходячи з дволазерної схеми з  $CO_2$ -лазером та ітрієвим алюмінієвим лазером (Ho:YAG). Ця технологія забезпечує отримання метрологічно стабільних композитних підкладок  $Au - SiO_2$ , стійких до хімічних і механічних впливів. Надано АСМ-фотографії морфології отриманого зразка та спектри оптичної густини. Розміри наночастинок знаходяться в діапазоні 5-50 нм, а відстані між ними коливаються від 50 до 150 нм. На основі міжзонних переходів враховується низькочастотна смуга поглинання. Наведено чисельний розрахунок поля в ближній зоні в кратері гранул, утворених під час імплантації. Така «гаряча точка» здатна підсилити комбінаційне розсіювання від молекули з коефіцієнтом підсилення  $10^3$ .

У четвертому розділі запропонований новий метод розрахунку діелектричної проникності молекули Родаміну 6G за допомогою MATLAB, результати обчислень порівняні з даними обчисленими за допомогою програмного забезпечення Gaussian 09, показана узгодженість результатів. Зроблені висновки, що таку методику можна застосовувати до коливальних переходів великих молекул, враховуючи збудження ядра молекули та можливого розчинника, якщо зразок не є висušеним.

Представлена техніка експерименту з дослідження Раман-спектру зразків сироватки крові хворих на міастенію та учасників дослідження з контрольної групи.

Головні наукові результати, що були отримані у роботі, є наступними.

1. Розроблено методику дволазерної імплантації золота у приповерхневий шар плавленого кварцу.

2. Наведено модель зв'язаних осциляторів та визначені параметри коливальних мод та параметру зв'язування.

3. Визначено плазмову частоту коливань у металах *Ag, Al, Au*.

4. Визначено межу відстані між двома коливальними системами до 50 нм, де можна використовувати модель зв'язаних осциляторів.

5. Запропоновано та використано оригінальний метод визначення граничного розміру наночастинок золота, який склав 6 нм у діаметрі, починаючи з якого квантово-механічні явища починають домінувати над розмірними. Наведено розрахунок поля в ближній зоні у «гарячій точці» та проведено розрахунок підсилення комбінаційного розсіювання.

6. Розроблений метод розрахунку діелектричної проникності Родаміну 6G для електронних переходів в MATLAB, який може бути використаний при чисельному моделюванні експерименту з коливальних переходів великих молекул.

7. Досліджені Раман-спектри сироватки крові пацієнтів з міастенією на присутність ВоNT А. Проведена обробка спектра з урахуванням високої люмінесценції від розробленої підложки та біологічного зразка.

**Ключові слова:** Абсорбційна спектроскопія, Раман-спектроскопія, Діелектрична проникність, Дифракція електромагнітних хвиль, Поляризація, ТГц лазер, Резонатор, Ботулотоксин А, Бактеріальний тест, Міастенія, Білок, Біосенсор, Наночастинки, Полікристалічна плівка, Лінійний осцилятор, Негаусові світлові пучки, Дифракційна решітка, Сироватка крові, ТЕ хвильове поглинання, Розрахунок поля в дальній зоні, Відкритий резонатор, Пов'язані осцилятори, FDTD метод, Плазмовий резонанс.

### **ABSTRACT**

Iuliia Riabenko. Detection of Residual Liquids of Biotoxins with Raman Spectroscopy. Qualification scholarly paper: a manuscript.

Thesis submitted for obtaining the Doctor of Philosophy in Specialty 105 - Applied Physics and Nanomaterials (Natural Sciences). – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The thesis focuses on the research and development of the method for obtaining composite materials with parameters consistent with metrological standards to enhance Raman scattering of complex organic and biological molecules. These composites are promising for use both in biosensors and in other devices for calibration of spectral equipment. Such methods give an opportunity to obtain high-quality resonant structures resistant to chemical and mechanical influences and possessing a stable Frelich frequency.

Modern high-precision spectrometric research methods provide for a better understanding of topology and conformation of complex molecules. One of the methods of increasing the sensitivity of spectral devices is SERS which detects substances in residual concentrations. This method usually employs metal nanoparticles sized 15 – 50 nm, while the present research uses gold nanoparticles of 5 – 10 nm. The granules form a composite structure with a transparent substrate, where a plasma absorption band corresponds to plasma oscillations of free electrons. However, the existing techniques are focused on creating a colloid in solutions or on substrates with a label without drying the sample, which does not allow for obtaining a SERS signal consistent with metrological standards. The effect of plasma resonance

and its use in SERS have been known for a long time, nevertheless, there has been a growing interest in creating new metrological methods of molecular detection.

The composite material formed by laser implantation of a granular film of gold in the near-surface layer of fused quartz creates a metamaterial resistant to chemical and mechanical influences with a high-Q resonance. Currently, there are no methods able to create composites which would be consistent with metrological standards. Although attempts at laser implantation of gold and silver in the near-surface layer have been made by several authors, the present research improves this technique making it possible to create a metamaterial with predetermined properties.

The modern development of numerical modeling provides opportunities to calculate the physical properties of topologically complex nanomaterials. Therefore, the paper presents numerical calculations of modes of complex topology of a gold nanoparticle and the effective refractive index of the modes. The near field in the "hot spot" of a gold nanoparticle was also calculated, and the mode coupling effect was established between the nanoparticles and vibrational energy levels of the molecular group corresponding to the dipole transition. The data was confirmed in experiments with a multilayer composition of films. It was established that coupling is observed at distances up to 50 nm, corresponding to the near-field. Hence, at such distances, the dipole oscillator model can be used to describe metal nanoparticles.

Numerical calculations of the molecule properties have been available for some time. Still, the complexity of biological molecules makes it possible to present a molecule as a quantum mechanics system and determine its main parameters: the polarizability tensor, energy levels in quantum mechanics, and dielectric permittivity of metals. The thesis proposes a simplified method for calculating the dielectric constant of Rhodamine 6G, indicating that such a method can be applied to large molecules. This expands the possibilities of numerical modeling of Raman scattering enhancement for biological molecules on high-Q resonant systems.

Raman spectroscopy is of paramount importance in modern biophysical research. However, the number of studies available is quite limited and a systematic review could be beneficial in terms of the spectra of toxic molecules and substances formed during biochemical reactions of these toxins with enzymes as part of the

immune response. Therefore, the present thesis presents a method for determining the presence of Botulinum toxin A in the blood serum of patients with myasthenia gravis.

The research findings are outlined in four chapters. The first chapter, “Literature Review,” presents literature relevant to the thesis topic, including the optical properties of granular gold films. Characteristics of the material described serve as the basis for calculating the Fröhlich frequency and determining the plasma resonance band. The chapter further provides hybrid modes in metal nanoparticles and describes methods for calculating near fields. A theoretical approach is provided to explain the phenomenon of giant Raman scattering. The approaches applied in electrodynamics and quantum mechanics are described in order to account for the enhancement of Raman scattering of vibrational transitions in a molecule. The latest approaches to the creation of biosensors are also considered.

The second chapter, “Methodology of experimental and theoretical research,” describes the experimental methods. The list of equipment involved in the experiment is included. Its compliance with modern metrological standards and timely equipment calibration before each experiment is confirmed. The chapter also describes the method of blood sampling and the procedure for serum production. The method of preparing a resonant substrate through thermal vacuum deposition of evaporated metal onto optical quartz glass is presented separately. The technique of laser implantation is described based on a two-laser scheme. A description of the FDTD numerical algorithm is provided, as well as the method of calculating modes of gold nanoparticles. The calculation of the effective refractive index corresponding to the modes of the electric field distribution for the gold nanosphere was carried out using the commercial ANSYS Lumerical software. The technique of spectrum processing, physical reasons behind each of the stages, and the justification of specific indicators to interpret the results are also provided.

The third chapter examines the coupled oscillator model in  $Al/ZnS/Ag/SiO_2$  films. Formulas are developed to calculate normal fluctuations of free electron plasma in granules. A methodology for calculating the coupling constant is presented along with numerical calculations of coupling in the near field using ANSYS Lumerical. The influence of two layers of metal granules was experimentally established. It was also



shown that the dipole-dipole interaction model can be used at distances up to 50 nm. A technique was developed to determine the plasma frequency of metals based on the position of the high-frequency absorption band in the optical density spectra. The models of the dielectric constant of metal nanoparticles, as well as their applicability in comparison with the size of the nanospheres and the filling factor. The latest method of gold nanoparticle implantation in the surface layer of fused quartz is considered in detail, proceeding from a two-laser scheme with CO<sub>2</sub>-laser and yttrium aluminum laser (Ho:YAG). This technique ensures the production of metrologically stable Au – SiO<sub>2</sub> composite substrates resistant to chemical and mechanical influences. AFM photographs of the resulting sample morphology and optical density spectra are provided. The size of nanoparticles lies in the range of 5 – 50 nm, and the distances between them vary from 50 to 150 nm. A low-frequency absorption band is accounted for based on interzone transitions. A numerical calculation is provided for the near field in the crater of the granules formed during implantation. Such a “hot zone” is capable of enhancing Raman scattering from the molecule with an enhancement factor of 10<sup>6</sup>.

The fourth chapter describes a new method for calculating the dielectric constant of Rhodamine 6G using MATLAB. The calculation results are compared with the Gaussian 09 data showing the consistency of the results obtained. This method can be applied to vibrational transitions of large molecules, taking into account excitation of the molecule nucleus and properties of the solvent if the sample is not dried.

Also, this chapter describes the biochemical properties of the botulinum toxin molecule, serotype varieties, and the mechanism of interaction with living organisms. Methods of detecting botulinum neurotoxin are described, as well as their limitations and their use in clinical biochemistry. The use of known methods proceeds from the patient’s symptoms, which determine whether the patient is tested for the toxin molecule. If primary symptoms are insufficient and/or the body’s immune response affected the result, the search for BoNT becomes complicated since testing depends on specific reagents, such as optical reporters, peptide substrates or antibodies specific to this particular toxin and a certain serotype.

The thesis describes the experiment exploring the Raman spectrum of blood serum samples of patients with myasthenia gravis and the control group.

The main research results are as follows.

1. The paper develops a method of two-laser implantation of gold in the surface layer of fused quartz.
2. The thesis provides a model of coupled oscillators and determines parameters of oscillatory modes and coupling parameters.
3. The plasma frequency is established for oscillations in metals *Ag*, *Al*, and *Au*.
4. The research establishes the optimal distance between two oscillating systems of 20 – 35 nm where the model of coupled oscillators can be used.
5. An original method is proposed and applied to determine the size of gold nanoparticles, which was found to be 6 nm in diameter, starting from where quantum mechanics phenomena begin to dominate over dimensional ones. The calculations of the near field in the “hot spot” as well as Raman scattering enhancement are carried out.
6. A method for calculating the dielectric permittivity of Rhodamine 6G for electronic transitions was developed in MATLAB. The aforementioned method can also be applied in numerical simulations of an experiment with vibrational transitions of large molecules.
7. The Raman spectra of blood serum of patients with myasthenia gravis were studied for the presence of botulinum toxin A. The spectrum was processed considering the high luminescence of the developed substrate and the biological sample.

**Keywords:** Absorption Spectroscopy, Raman Spectroscopy, Dielectric Permeability, Diffraction of Electromagnetic Waves, Polarization, THz Laser, Resonator, Botulinum Toxin A, Bacterial Test, Myasthenia gravis, Protein, Biosensor, Nanoparticles, Polycrystalline Film, Linear Oscillator, Non-Gaussian Light Beams, Diffraction Grating, Blood Serum , TE wave absorption, Field calculation in the far zone, Open resonator, Coupled oscillators, FDTD method, Plasma resonance.