

Рамановская микроспектроскопия в биомедицинских исследованиях

Условное обозначение проекта: **Биофотоника**

СПИСОК АВТОРОВ В АЛФАВИТНОМ ПОРЯДКЕ ПО ИНСТИТУТАМ,
РАСПОЛОЖЕННЫМ В АЛФАВИТНОМ ПОРЯДКЕ ПО ГОРОДАМ

Дубна, ОИЯИ, ЛНФ:

Арзуманян Г.М., Воробьева М.Ю., Кучерка Н., Маматкулов К.З.

Армения, Ереван, ННЛА, Ереванский физический институт

Арутюнян В.В.

Беларусь, Минск, БГУИР

Бондаренко А.В.

Минск, СОЛ инструментс

Копачевский В.Дж.

Болгария, София,

Генова Ю.

Россия, Москва, ИОФ РАН

Смирнов В.В., Верещагин К.А.

Москва, МГУ

Шайтан К.В.

Москва, МОНИКИ

Волков А.Ю.

Румыния, Бухарест, NIMR

Байбарак М.

Словакия, Кошице, PJSU

Грубовчак П.

Руководители проекта: Арзуманян Г.М., Кучерка Н.

Зам. руководителя проекта: Маматкулов К.З.

ДАТА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПРОЕКТА В НОО _____

ДАТА НТС ЛАБОРАТОРИИ 14.05.2020 НОМЕР ДОКУМЕНТА

ДАТА НАЧАЛА ПРОЕКТА: 01.01.2021

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА

Рамановская микроспектроскопия в биомедицинских исследованиях**Биофотоника**

ШИФР ТЕМЫ: 04-4-1133-2021/2023

Руководители проекта: Арзуманян Г.М., Кучерка Н.

УТВЕРЖДЕН ДИРЕКТОРОМ ОИЯИ	ПОДПИСЬ	ДАТА
СОГЛАСОВАНО		
ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ОИЯИ	ПОДПИСЬ	ДАТА
ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ	ПОДПИСЬ	ДАТА
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР	ПОДПИСЬ	ДАТА
НАЧАЛЬНИК НОО	ПОДПИСЬ	ДАТА
ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ	ПОДПИСЬ	ДАТА
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛАБОРАТОРИИ	ПОДПИСЬ	ДАТА
РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА	ПОДПИСЬ	ДАТА
ЗАМ. РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА	ПОДПИСЬ	ДАТА
ОДОБРЕН		
ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ	ПОДПИСЬ	ДАТА

Рамановская микроспектроскопия в биомедицинских исследованиях

Оглавление

• Аннотация	4
• Введение.....	5
• Современное состояние исследований по проекту, включая литературу.....	6
• Описание предлагаемого исследования.....	12
• Оценка кадровых ресурсов и бюджета.....	18
• Приложения 3, 4 (формы 26 и 29).....	19
• План-график работ на 2021-2023.....	21
• Список публикаций и конференций.....	22
• Рекомендация НТС ЛНФ.....	25

Аннотация проекта

В последние несколько десятилетий рамановская спектроскопия стала чувствительным инструментарием для биомедицинских исследований. Прогресс в области приборостроения, методологии и анализа данных позволили использовать рамановскую микроспектроскопию в различных приложениях, от клеточного анализа *in vitro* до клинической визуализации *in vivo*. Достижения в области спонтанного комбинационного рассеяния, усиленного наночастицами рассеяния света (SERS, TERS), а также нелинейные методы (CARS, SRS) – все они продемонстрировали значимые перспективы рамановской спектроскопии для широкого спектра лабораторных и клинических применений.

Основная цель проекта направлена на применение современных методов рамановского рассеяния в некоторых биомедицинских задачах, которые по своей сути связаны с биосенсорикой и диагностикой. Проект включает в себя фундаментальные и прикладные сегменты. В части фундаментальных исследований, работы будут нацелены на выявление и понимание механизмов соотношения интенсивности компонентов антистокс / стокс в спектре поверхностно-усиленного рамановского рассеяния (SERS). Это позволит сформулировать условия для получения воспроизводимых спектров SERS при разработке биосенсоров. Прикладные задачи связаны (i) со спектроскопическими исследованиями НЕТОЗ-а: в частности, с поиском рамановских маркеров этого явления, а также с определением механизмов запуска процесса стерильной активации нетоза под действием УФ излучения, и, (ii) липид-белковым взаимодействием с использованием современного мембранного миметика – липодиска.

Для реализации предлагаемого проекта будет использована мультимодальная оптическая платформа на базе микроскопа «КАРС», атомно-силовая микроскопия (АСМ), динамическое рассеяние света (ДРС), электронная микроскопия (СЭМ, ПЭМ), малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН) и другой инструментарий. Также,

рамановская спектроскопия сверхнизких частот ($\sim 5 \text{ см}^{-1}$) станет одним из ключевых методов проекта.

В проекте будет задействован квалифицированный и опытный в данном направлении коллектив Сектора Рамановской спектроскопии ЛНФ ОИЯИ в тесном сотрудничестве с заинтересованными партнерами из различных стран и организаций. Финансирование проекта запрашивается на уровне $\sim 130 \text{ k\$}$ ежегодно.

Введение

Проект нацелен на развитие высокочувствительной оптической биосенсорики, а также спектроскопической характеристики процесса программируемой клеточной гибели – НЕТОЗ-а, методом спонтанной и усиленной рамановской спектроскопии. С этой целью планируется:

- *изучение особенностей стоксовых и антистоксовых компонент спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) молекул-аналитов на наноструктурированных поверхностях благородных металлов и формулировка условий регистрации воспроизводимых ГКР-спектров;*
- *стабилизация мембранных белков и исследования их структуры с использованием липодисков методами рамановского рассеяния, электронной микроскопии и МУРН;*
- *поиск спектральных/раман маркеров НЕТОЗ-а и исследование механизмов стерильного формирования НЕТОЗ-а под действием УФ излучения.*

В последнее время в мире наблюдается интенсивный рост интереса в исследованиях биосенсорики различными оптическими методами в сочетании с наноматериалами, которые способны обнаруживать молекулы в физиологических жидкостях и живых клетках при чрезвычайно низких концентрациях (рис. 1, вставка).

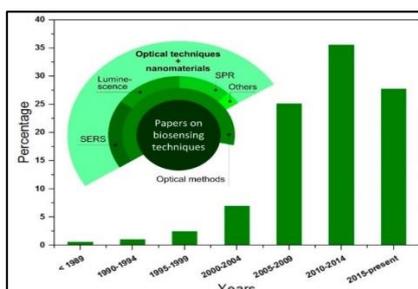


Рис. 1. Количество работ по биосенсорике по годам; на вставке – распределение работ по биосенсингу на основе оптических методов (Google Academy, 30 ноября 2018)

Основными целями этих исследований являются неинвазивные тесты, медицинская диагностика и лечение различных видов заболеваний, в т.ч. онкологии, вирус-индуцированных болезней, и других патологий опасных для здоровья человека. Точность и надежность являются важными требованиями биосенсинга, чтобы максимально уменьшить риск ложных результатов. В этой связи, рамановская спектроскопия, как один из наиболее информативных, чувствительных и неинвазивных методов светового анализа молекулярных структур конденсированных сред, рассматривается как очень эффективный инструмент для таких целей.

Для более глубокого понимания подходов при разработках биосенсоров, необходимо, в том числе, проводить исследования в антистоксовой части рамановского спектра, где в ряде случаев наблюдаются отношения интенсивностей антистоксовых и стоксовых компонент ГКР спектров, отличные от ожидаемых равновесных (Больцмановских) значений. Природа этих явлений до конца не ясна. Поэтому целью предстоящих экспериментов будет выявление физических

механизмов, приводящих к наблюдаемым аномалиям в ГКР спектрах. Это особенно актуально для достижения уровня воспроизводимой регистрации ГКР-спектров при создании высокочувствительных биосенсоров.

Значительный интерес представляет вопрос глубокого и всестороннего изучения пептид-мембранного взаимодействия, которое, в определенных условиях, может привести к опасным нейродегенеративным заболеваниям. Для изучения спектроскопических особенностей этого процесса, в проекте намечено использование инновационной разработки мембранного миметика – липодисков. Актуальность задачи, несомненно, имеет высокую социальную значимость.

Другой прикладной задачей проекта является поиск спектральных/раман маркеров НЕТОЗ-а – малоизученной к настоящему времени программируемой клеточной гибели. Нейтрофилы являются первой линией защиты организма от бактериальных, грибковых и, в некоторых случаях, вирусных инфекций. Ранняя диагностика НЕТОЗ-а чрезвычайно важна при ряде заболеваний и патологиях.

Все вышеперечисленное находится в русле мировых тенденций развития рамановской микроспектроскопии, и, тем самым, обуславливает современный инновационный характер предлагаемого к рассмотрению проекта.

Современное состояние исследований по проекту

1. Физическая природа аномального отношения a_{St}/St в ГКР спектрах

Одним из важных и окончательно не решенным вопросом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) является вопрос о физической природе часто наблюдаемого в спектрах ГКР "аномального" отношения значений интенсивностей антистоксовых и стоксовых компонент (далее a_{St}/St), отличные от ожидаемых равновесных (Больцмановских) значений. Решению этого вопроса посвящен ряд исследований, но основная часть экспериментов при этом проводилась с использованием непрерывных лазеров. Весьма перспективным для решения этой задачи является применение лазеров пикосекундной длительности, т.к. эта длительность соответствует масштабу времен потоков и перераспределения энергии в наноструктурированных материалах с адсорбированными на них молекулами-аналитами.

Внимание ГКР-сообщества к этой проблеме было привлечено в 1996 году после публикации пионерской работы [1], где ее авторы впервые сообщили о наличии вибрационной (рамановской) накачки в условиях ГКР (из-за неожиданно большого сечения ГКР). В работе [1] изучалась зависимость отношения (a_{St}/St) рамановских линий красителей Rhodamine 6G (Rh6G) и Crystal Violet (CV) от мощности накачки с использованием лазерного возбуждения 830 нм при комнатной температуре. Более того, было высказано предположение, что этот метод (зависящая от мощности колебательная накачка) может стать возможным инструментом для оценки сечения ГКР процесса.

Интерпретация этих экспериментальных результатов стала предметом значительных дискуссий в соответствующей научной литературе, при этом многие авторы отрицают существование комбинационной накачки и приписывают экспериментальные наблюдения либо лазерному нагреву, различным резонансным эффектам, либо их комбинациям [2-7] с выводом, что никаких доказательств ГКР-индуцированного нетеплового распределения населенностей между колебательными состояниями (колебательная рамановская накачка) адсорбированных молекул не найдено. Тем не менее, спустя десять лет существование рамановской накачки в ГКР было подтверждено проведением

измерений отношения a_{St}/S_{St} как функции температуры до 10 К при низкой интенсивности лазерного возбуждения [8]. В обзорной работе [9] проанализированы и интерпретированы основные принципы колебательной накачки в поверхностно-усиленном рамановском рассеянии в рамках их исторического развития.

Несмотря на эти исследования, дискуссия относительно «нагрев против накачки» все еще продолжается. Поэтому целью предстоящих экспериментов по данному проекту будет выявление физических механизмов, приводящих к наблюдаемым аномалиям в ГКР спектрах. Для этого будут проведены сравнительное исследование поведения интенсивностей линий ГКР аналита в Стоксовой и антиСтоксовой областях спектра в зависимости от мощности излучения накачки как в импульсном, так и в непрерывном режимах. Выявление нелинейного поведения интенсивностей линий в спектрах ГКР, в том числе подобных когерентному антистоксово рассеянию света (КАРС) [10-11], также будет в фокусе внимания предлагаемых в проекте исследований.

Наноструктуры с управляемыми и четко определенными структурами с компьютерным моделированием являются мощными инструментами для понимания плазмонных свойств металлических наноструктур. Однако, по сравнению с такими структурами, агрегированные сборки наночастиц могут демонстрировать необычное и непредсказуемое поведение. Поэтому прикладным аспектом решения описанной задачи является формулировка условий регистрации воспроизводимых спектров ГКР от молекул-аналитов, осажденных на поверхность нано-структурированных подложек, которые необходимо соблюдать при создании высокочувствительных ГКР-биосенсоров.

По нашим сведениям, базирующимся на научной литературе, экспериментальные работы в этом направлении в России не ведутся.

Основные мировые научные конкуренты

1. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA (group of Prof. Kneipp)
2. University of California, Irvine, USA. (group of Prof. Abkarian)
3. Imperial College London, London, UK (group of Prof. Maher)

2. Мембранные белки и липодиски

Изучение мембранных белков (МП) является одной из основных и актуальных задач в современных исследованиях в области молекулярной биологии. Известно, что мембранные белки составляют 20-30% протеома человека [12]. Знание их структуры помогает развитию медицины и фармакологии – среди белков, являющихся мишенями лекарственных препаратов, доля мембранных белков составляет до 50 % [13-14]. При этом мембранные белки практически не поддаются кристаллизации, и поэтому для исследования их структуры неприменим традиционный метод рентгеноструктурного анализа. Данный проект посвящен развитию методики стабилизации мембранных белков и исследования их химической структуры методом Рамановской спектроскопии с использованием липодисков – фрагментов липидной мембраны (мембранная миметика), ограниченных амфифильными полимерами. По липодискам, в отличие от липид-белковых нанодисков, стабилизированных в растворе аполипопротеином или специальным амфифильным белком MSP (membrane Scaffold Proteins), имеется относительно мало работ, хотя эти объекты

представляют значительный интерес с точки зрения структурной биологии и проведения экспериментов с единичными молекулами или их комплексами.

В последнее время, большую популярность получили липодиски, сформированные с использованием сополимера стирола и малеиновой кислоты (SMA, XIRAN) [15-20].

Преимущества липодисков:

Липодиски, имеют ряд преимуществ перед традиционным способом выделения и солюбилизации мембранных белков с помощью детергента. Во-первых, считается, что липодиски позволяют сохранить вокруг белка небольшое количество липидов, которые окружали его в составе мембраны, и эти липиды помогают сохранить конформацию мембранного белка неизменной. Во-вторых, в отличие от близких по структуре нанодисков, сформированных с помощью белка MSP, липодиски сформированные с помощью амфифильных полимеров, могут быть сформированы с минимальным количеством экспериментальных шагов – путем добавления амфифильного полимера к мембранной фракции клеток или непосредственно к клеткам. В-третьих, могут быть приготовлены двухкомпонентные липодиски, состоящие из липида и сополимера, и они для некоторых аналитических методов выступают как удобный референсный образец.

Для анализа структуры белка, встроенного в липодиски, используют просвечивающую электронную микроскопию, ПЭМ. Она позволяет на основании множества изображений отдельных молекул построить модель распределения электронной плотности в белке. Цель данного проекта состоит в том, чтобы улучшить существующие процедуры выделения и исследования структуры мембранных белков с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния света, получить новую информацию о структуре липодисков с мембранными белками и «пустых» липодисков.

В проекте предусмотрено решение следующих задач в этой области:

1. Отработать методику получения КР-спектров от образцов липодисков с мембранными белками и «пустых» липодисков.
2. Выделить характеристические линии в спектрах, которые связаны с присутствием каждой из трех компонент – липида, белка и сополимера.
3. Подтвердить встраивание мембранного белка в липодиски и определить особенности его строения.
4. Исследовать состав белков и липидов, содержащихся в липодисках.

Ожидается, что предлагаемая инновационная структура «липодиска» и чувствительная рамановская спектроскопия, позволит продвинуться в таком непростом процессе, как липид-белковые взаимодействия.

3. НЕТОЗ: спектральные маркеры и УФ активация нейтрофилов

Нейтрофильные лейкоциты - первая линия защиты от бактериальных и некоторых вирусных инфекций.

Когда количество или качество этих клеток отклоняется от нормы, люди подвержены серьезным, часто угрожающим жизни инфекциям. Кроме того, такие нарушения могут быть маркером многих системных, аутоиммунных заболеваний. В этой связи проведение лабораторных

биомедицинских исследования исследований, в т.ч. и спектроскопического характера, несомненно, являются и актуальными и социально значимыми.

В отличие от хорошо известных и исследованных двух других типов клеточной смерти – апоптоза и некроза, нетоз в настоящее время мало изучен. Особенно это касается спектроскопических, в т.ч. рамановских исследований этого явления. Пионерской работой по НЕТОЗ-у считается публикация Бринкмана в 2004 году [21]. Он и ввел термин NETs – Neutrophil Extracellular Traps (внеклеточные ловушки нейтрофилов).

Нейтрофилы (также известные как нейтроциты) являются наиболее распространенным типом гранулоцитов и наиболее распространенным (от 60 до 70%) типом белых кровяных клеток у большинства млекопитающих и образуют важную часть врожденной иммунной системы [22]. Нейтрофилы являются клетками типа фагоцитов и обычно находятся в кровотоке. Они очень пластичны и подвижны, и способны проникать в те части ткани, куда другие клетки не способны. К основным защитным функциям нейтрофилов относятся: фагоцитоз, дегрануляция хроматина и образование внеклеточных ловушек - NETs. Эти внеклеточные ловушки нейтрофилов включают в себя ткань из волокон, состоящих из хроматина, которые ловят и убивают внеклеточных патогенных микроорганизмов.

В научной литературе по нетозу есть немало публикаций о способах и механизмах активации нейтрофилов, а также положительных и негативных последствий этого явления [23-27]. Обзорные работы можно найти в [28,29]. Однако следует отметить, что в настоящее время работ, посвященных спектральным маркерам этого явления и стерильной – УФ-активации нетоза, пока единицы [30-33]. Последнее весьма актуальная тема, поскольку человечество ежедневно в той или иной дозе подвергается солнечному, в т.ч. и УФ спектру облучению, что имеет и негативные последствия. Именно эти две задачи – поиск рамановских маркеров нетоза и стерильная УФ-активации, являются ключевыми этапами исследований предлагаемого проекта в части нетоза.

Литература

1. Kneipp K., Wang Y., Kneipp H., Itzkan I., Dasari R., Feld M. Population Pumping of Excited Vibrational States by Spontaneous Surface-Enhanced Raman Scattering. *Phys. Rev. Lett.* 1996, **76**, 2444–2447.
2. Haslett T. L., Tay L., Moskovits M. Can surface-enhanced Raman scattering serve as a channel for strong optical pumping? *J. Chem. Phys.* 2000, **113**, 1641–1646.
3. Brolo A. G., Sanderson A. C., Smith A. P. Ratio of the surface-enhanced anti-Stokes scattering to the surface-enhanced Stokes-Raman scattering for molecules adsorbed on a silver electrode. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* 2004, **69**, 045424.
4. Maher R. C., Hou, J., Cohen L. F., Le Ru E. C., Hadfield J.M., Harvey J. E., Etchegoin P. G., Liu F. M., Green, M., Brown, R.J., Milton, M. J. Resonance contributions to anti-Stokes/Stokes ratios under surface enhanced Raman scattering conditions. *J. Chem. Phys.* 2005, **123**, 084702.
5. Le Ru E. C. and Etchegoin P. G. Vibrational pumping and heating under SERS conditions: fact or myth? *Faraday Discuss.*, 2006, **132**, 63–75.
6. Maher R. C., Cohen L. F., Le Ru E. C., and Etchegoin P. G. A study of local heating of molecules under Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) conditions using the anti-Stokes/Stokes ratio. *Faraday Discuss.*, 2006, **132**, 77–83.
7. Kevin T. Crampton, Alexander Fast, Eric O. Potma, and V. Ara Apkarian Junction Plasmon Driven Population Inversion of Molecular Vibrations: A Picosecond Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Study. *Nano Lett.*, 2018, 9, 5791-5796
8. Maher R. C., Etchegoin P. G., Le Ru E. C., and Cohen L. F. A Conclusive Demonstration of Vibrational Pumping under Surface Enhanced Raman Scattering Conditions. *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 11757-11760.
9. Maher R. C., Galloway C. M, Le Ru E. C., Cohen L. F. and Etchegoin P. G. Vibrational pumping in surface enhanced Raman scattering (SERS). *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37, 965–979.
10. S. Lefrant, I. Baltog, M. Baibarac Surface-enhanced Raman scattering studies on chemically transformed carbon nanotube thin films. *J. Raman Spectrosc.* 36, 676-698, 2005
11. I. Baltog, M. Baibarac, I. Smaranda, S. Lefrant Abnormal anti-Stokes Raman emission as a CARS process in disordered media. *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.* 44, 095401, 2011.
12. Wallin E, von Heijne G (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7:1029–1038
13. von Heijne G (2007) The membrane protein universe: what's out there and why bother? *J Intern Med* 261:543–557.
14. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5:993–996.
15. Jonas M. Durr, Stefan Scheidelaar, Martijn C. Koorengeve, et al. The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *Eur Biophys J* (2016) 45:3–21
16. N. Voskoboinikova, W. Mosslehy, A. Colbasevici, T. T. Ismagulova, D. V. Bagrov, K. V. Shaitan, et al. Characterization of an archaeal photoreceptor/transducer complex from *Natronomonas pharaonis* assembled within styrene–maleic acid lipid particles. *RSC Adv.*, 2017, 7, 51324-51334
17. Long A.R., O'Brien C.C., Malhotra K., et al. A detergent-free strategy for the reconstitution of active enzyme complexes from native biological membranes into nanoscale discs. *BMC Biotechnology* 2013, 13, 41.
18. J. M. Dorr, S. Scheidelaar, M. C. Koorengevel, J. J. Dominguez, et al. The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *Eur. Biophys. J.*, 2016, 45, 3–21.

19. S. C. Lee and N. L. Pollock, Membrane proteins: is the future disc shaped? *Biochem. Soc. Trans.*, 2016, 44, 1011-1018.
20. T. J. Knowles, R. Finka, C. Smith, Y. P. Lin, T. Dafforn and M. Overduin. Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 7484–7485.
21. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303:1532–1535.
22. Scapini P., Lapinet-Vera J. A., Gasperini S., Calzetti F., Bazzoni F., Cassatella M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews*. 2000; 177: 195–203.
23. Segal, AW. How neutrophils kill microbes. *An. Rev Immunol*. 2005, 23 (5), 197–223.
24. Fuchs, TA; Brill, A, Duerschmied, D, Schatzberg, D, Monestier, M, Myers DD Jr, Wroblewski, SK, Wakefield, TW, Hartwig, JH, Wagner, DD (Sep 7, 2010). "Extracellular DNA traps promote thrombosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 107 (36): 15880-5. Bibcode, 2010, PNAS,10715880F.
25. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013, 5.
26. Konig MF, Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Front Immunol*. 2016, 7, 461.
27. Khan MA, Palaniyar N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. *Sci Rep*. 2017, 7, 41749.
28. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ*. 2018, 25, 486–541.
29. Stojkov D, Amini P, Oberson K, Sokollik C, Duppenhaler A, Simon HU, et al. ROS and glutathionylation balance cytoskeletal dynamics in neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2017, 216, 4073–4090.
30. Elsa Neubert, Katharina Maria Bach, Julia Busse et al. Blue and Long-Wave Ultraviolet Light Induce in vitro Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2428.
31. Dhia Azzouz, Meraj A. Khan, Neil Sweezey and Nades Palaniyar. Two-in-one: UV radiation simultaneously induces apoptosis and NETosis. *Cell Death Discovery*, 2018, 4:51
32. Marcin Zawrotniak, Dominika Bartnicka, Maria Rapala-Kozik. UVA and UVB radiation induce the formation of neutrophil extracellular traps by human polymorphonuclear cells. *J. of Photochemistry & Photobiology, B*: 2019, 196:111511.
33. Arzumanyan G.M., Gurev A.S., Kravtsunova D.E., Mamatkulov K.Z., et al. Micro Raman spectroscopy for NETosis detection. *JRS, SPECIAL ISSUE*, .2020,1-9.

Описание предлагаемого исследования

Предмет исследования:

Выявление физической природы аномального отношения антиСтоксовой и Стоксовой компонент в спектрах гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) с целью формулировки условий регистрации воспроизводимых спектров для биосенсоров. Изучение структурно-спектральных характеристик липодисков с внедренными белками. Поиск спектральных маркеров НЕТОЗ-а и механизмы стерильной УФ активации нейтрофилов.

Допущения и гипотезы:

Несмотря на большой прогресс в прикладных аспектах ГКР, отдельные фундаментальные вопросы этого процесса все еще остаются открытыми. Одним из таких нерешенных до конца вопросов является физическая природа часто наблюдаемого эффекта аномального соотношения интенсивностей полос аСт / Ст компонент в ГКР спектрах. В настоящее время нет точных данных о так называемой «колебательной, или рамановской» накачке, приводящей к этой аномальности. Хорошо известно, что при термодинамическом равновесии отношение аСт / Ст определяется фактором Больцмана:

$$\frac{I_{as}}{I_s} = \left(\frac{\omega_L + \omega_V}{\omega_L - \omega_V} \right)^4 \exp\left(-\frac{\hbar\omega_V}{kT} \right)$$

где ω_L , ω_V , \hbar , k и T – это частота возбуждения, колебательная частота, постоянная Планка, постоянная Больцмана и температура, соответственно.

Однако, не редки случаи, когда в реальных экспериментах этот фактор нарушается и спектр в аниСтоксовой части выглядит как на рис.2 ниже:

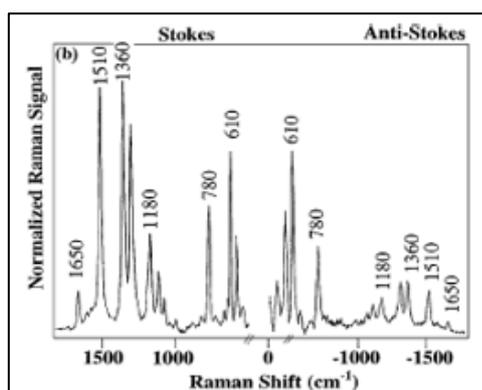


Рис.2. ГКР спектр (аСт и Ст) родамина 6Ж

Кроме того, в ряде опубликованных исследований, авторами были допущены гипотезы также и о нелинейном, резонансном характере интенсивностей пиков в антиСтоксовой области в зависимости от мощности накачки. А таких резонансов может быть несколько, в т.ч. плазмонный резонанс от одной изолированной наночастицы, коллективный плазмонный резонанс от ансамбля частиц, прямой рамановский резонанс (например, в случае красителей), связанное плазмонно-резонансное состояние молекулы и др. Все эти резонансы могут по-разному влиять на стоксовы и антистоксовы интенсивности в спектрах ГКР, и, поэтому, могут быть источником разных аномалий, описанных в литературе.

С учетом выше перечисленных допущений, в предлагаемом проекте намечается исследовать зависимость интенсивностей аСт / Ст не только от мощности накачки, но и от длины волны излучения, и, что на наш взгляд крайне важно, в

сравнительном режиме при непрерывной и импульсной (пс) режимах накачки. Таких опубликованных работ нам в настоящее время неизвестно. А именно импульсный режим может внести определенную ясность в аномальность измеряемых спектрах ГКР.

В части проекта, касающегося УФ активации нетоза, некоторыми авторами справедливо допускается, что в определенных случаях ультрафиолетовое облучение может вызывать не только нетоз, но и апоптоз. Для выявления и дифференциации этих механизмов гибели клеток, планируется исследовать процесс активации: (i) при различных дозах облучения и (ii) при различных длинах волн облучения, попадающих как в область УФ-А (400-315) нм, так и в область УФ-В (315-280) нм. Это мотивируется тем, что эти условно две области спектра солнечного УФ излучения достигают поверхности Земли, правда в разных пропорциях.

Предлагаемые методы и подходы, описание экспериментальной установки.

Для реализации предлагаемого проекта будут использоваться следующие методы и подходы:

1. Для каждой из выбранных систем (образец с ГКР-активной поверхностью + молекула-аналит) предполагается проводить комплекс как линейных (КР и ГКР), так и нелинейных (КАРС, ГКАРС) спектроскопических исследований, направленных, на выяснение природы соотношения $a_{Ст} / Ст$, причин появления резонансных и нерезонансных вкладов в сигналы ГКР.
2. Для импульсного возбуждения ГКР-процесса будет использоваться один из двух каналов выхода пикосекундного лазерного излучения, установленных на КАРС микроспектрометре.
3. Эти исследования планируется дополнить атомно-силовой микроскопией морфологии поверхностей ГКР-активных подложек, и динамическим рассеянием света при использовании коллоидных растворов наночастиц серебра или золота. В экспериментах планируется использовать базовую установку Сектора рамановской спектроскопии – КАРС-микроспектрометр с пикосекундными импульсами лазерного излучения (см. далее описание).
4. Для регистрации антиСтоксовой части спектра на начальном этапе будут использоваться фильтры от компании Semrock (США). Однако полоса пропускания этих фильтров начинается от 350 см^{-1} , что не позволит регистрировать низкие и ультранизкие волновые числа ни в ГКР спектрах, ни в спонтанном рамане при исследовании нетоза. Для решения этого исключительно ключевого вопроса проекта, намечается приобретение специального рамановского спектрометра, оснащенного брэгговскими фильтрами. Это позволит регистрировать спектры в непосредственной близости от линии возбуждения $\sim 5 \text{ см}^{-1}$.
5. Для обработки и анализа спектральной информации будут использоваться как имеющиеся алгоритмы и программы, так и модифицированные и специальное программное обеспечение и алгоритмы (NanoSP, ImageSP и др.), разработанные поставщиком КАРС микроспектрометра.
6. В качестве образцов с ГКР-активной поверхностью будут, прежде всего, использоваться опыт и разработка нашего надежного партнера – Белорусского государственного университета информатики и электроники (БГУИР). Это подложки с серебряными наночастицами, локализованными на подложке из

мезопористого кремния. Кроме того, некоторые коммерчески доступные ГКР-подложки (АТО-ID и др.) также будут использованы в экспериментах.

7. По наночастицам типа «ядро-оболочка» для люминесцентных исследований будет использоваться опыт синтеза таких частиц в секторе рамановской спектроскопии ЛНФ в 2019-2020 гг.
8. По образцам липодисков и клеткам нейтрофилов предполагается использовать профессиональный опыт партнеров кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и сотрудников МОНИКИ, соответственно.
9. Для УФ активации нейтрофилов намечается закупка относительно недорогих диодных лазеров на 3-4 разных длинах волн.

Многомодальная оптическая платформа – «КАРС» микроскоп.

Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп «КАРС» представляет собой лазерно-оптико-механический комплекс (рис.3), выполненный в компактной конфигурации и установленный на виброустойчивой платформе SDANDA (Литва).



Рис.3. Общий вид установки микроскопа «КАРС»

В 2016 году оптическая платформа была модернизирована, в результате чего на платформе были развернуты эксперименты по ГКР, по поляризованной КАРС микроскопии (П-КАРС), КР спектроскопии на длине волны 785 нм со слабым люминесцентным фоном для биологических образцов. На рис.4 представлена модернизированная оптическая схема прибора.

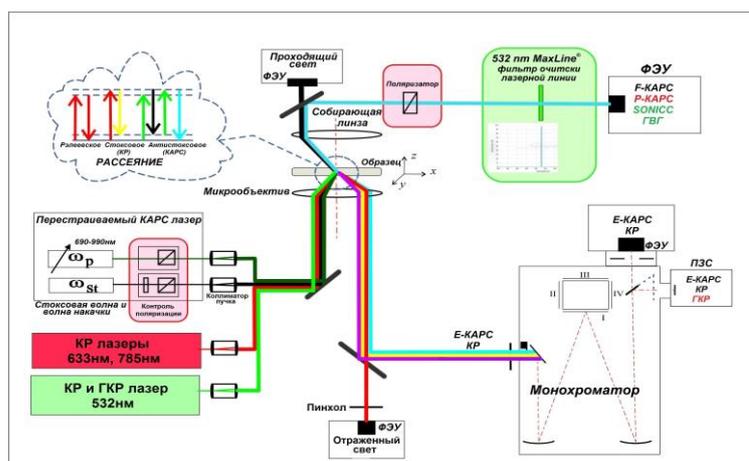


Рис.4. Оптическая схема платформы после модернизации в 2016 г.

Таким образом, в настоящее время для спонтанного комбинационного рассеяния и ГКР используется, в зависимости от задачи и образца, три лазерных источника с длинами волн 532нм, 633нм, и 785 нм. Для генерации же КАРС процесса на платформе установлен пикосекундный перестраиваемый Nd:YVO₄ лазер модели PT257-SOPO, EKSPLA, Литва. Частота следования импульсов составляет 85 МГц, длительность импульса ~ 6пс.

Хорошо известно, что импульсы длительностью в несколько пикосекунд являются подходящим компромиссом между высокой интенсивностью и узкой шириной линии необходимой для КАРС-микроскопии. Кроме того, интенсивность таких пучков достаточна для генерации и регистрации других нелинейных процессов, в частности генерации второй гармоники, суммарной частоты, и т.д.

Для перестройки длины волны излучения с целью резонансной настройки волны накачки на молекулярные колебательные уровни анализируемого образца, в данной модели лазера реализована схема внутррезонаторной перестройки длины волны излучения с помощью оптического параметрического генератора (ОПГ), работающего в режиме синхронной накачки (SOPO – synchronously pumped optical parametric oscillator). Накачка нелинейного кристалла LBO в ОПГ осуществляется второй гармоникой (532 нм, 6 пс, 2 Вт) основного излучения, а перестройка длины волны происходит за счет изменения температуры кристалла LBO в пределах от 107°С до 148°С (некритичный по температуре фазовый синхронизм). Это обеспечивает перестройку длины волны накачки в широком спектральном диапазоне от 690 нм до 990 нм. Во всей перестроечной спектральной полосе ширина линии излучения составляет от 5 до 7 см⁻¹ с длительностью импульса 5-6 пс при типичных значениях выходной мощности от 50 до 200 мВт и при частоте повторения импульсов 85 МГц, задаваемой лазером накачки. В качестве Стокс-волны используется лишь небольшая часть (около 10%) от основного излучения (1064 нм). В резонаторе предусмотрена также контролируемая от компьютера оптическая линия задержки, позволяющая с большой точностью синхронизовать и совмещать во времени волну накачки со Стоксовой волной.

Для установки образцов в системе используется автоматизированный столик, встроенный в микроскоп NIKON TE-2000S. Для фокусировки лазерного пучка используются разные по светосиле и конфигурации микрообъективы. С целью достижения высокого пространственного разрешения для КАРС-микроскопии используется водно-иммерсионный объектив Olympus UPLSAPO 60x с высокой числовой апертурой NA=1.2.

Используя параметры применяемых лазеров и соответствующей оптики, образец можно спектрально-селективно визуализировать в диапазоне волновых чисел (1000-3580)см⁻¹, который охватывает все наиболее важные колебательные моды биомолекул. Пять каналов регистрации позволяют записывать рамановские и люминесцентные сигналы в прямом и в обратном направлениях.

Автоматизированный XY-гальванометр (GSI-Lumonics VM1000) обеспечивает быстрое сканирование образца в продольной фокальной плоскости объектива. Время интегрирования сигнала при КАРС-микроскопии составляло 3 мкс/пиксель, в результате общее время скана КАРС-имиджа (карты) составляло не более 3с (включая время передачи изображения и время визуализации изображения). Микрообъектив смонтирован на управляемой компьютером Z-пьезоподвижке для получения и записи 3D-изображений с минимальным шагом сканирования 0,1 мкм.

Основные ожидаемые по окончании работ результаты.

1. Сравнительный анализ соотношения интенсивностей линий ГКР в аСт/Ст областях спектра в зависимости от мощности излучения накачки.
2. Определение особенностей соотношения интенсивности аСт/Ст в зависимости от длины волны возбуждения молекул-аналитов.
3. Выявление, сравнение и характеристика механизмов формирования аСт/Ст компонент ГКР-спектров в непрерывном и импульсном режимах.
4. Детальный анализ и интерпретация рамановских спектров липодисков с различными мембранными белками.
5. Подтверждение встраивания мембранного белка в липодиски и определение особенностей его строения.
6. Получение новой информации о структуре липодисков с мембранными белками и «пустых» липодисков.
7. Выявление рамановских маркеров НЕТОЗ-а в различных областях рамановского спектра.
8. Определение механизмов формирования НЕТОЗ-а под действием УФ-излучения.
9. Освоение методики рамановской спектроскопии сверхнизких частот $\sim (5-10) \text{ см}^{-1}$.

Экспериментальный задел по проекту к настоящему времени

В 2020 году в секторе рамановской спектроскопии ЛНФ была начата предварительная работа практически по всем задачам предлагаемого к реализации проекта, а по нетозу была опубликована первая работа в рейтинговом профильном журнале J. Raman Spectroscopy.

1. Были измерены стокс и антистокс компоненты для некоторых образцов как в спонтанном режиме рамановского рассеяния, так и в условиях ГКР. Соответствующие результаты приведены на рисунках 5 и 6.

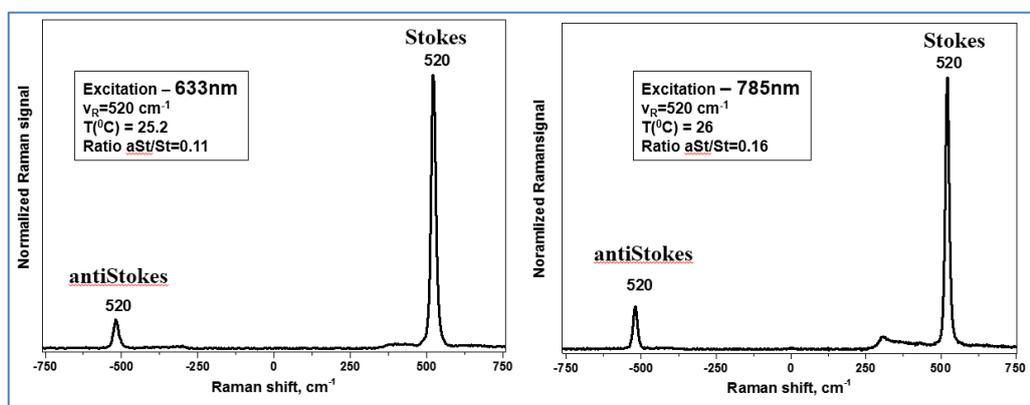


Рис.5. Рамановские спектры кристаллического кремния в аСт и Ст областях

Из рис. 5 видно, что в спонтанном раман-спектре не наблюдается никакой аномалии в антиСтоксовой части спектра и температура образца соответствует ожидаемой, т.е. комнатой.

А на рис.6 приведены ГКР спектры, полученные от аналитов красителя

метиленового синего и кислоты DTNB.

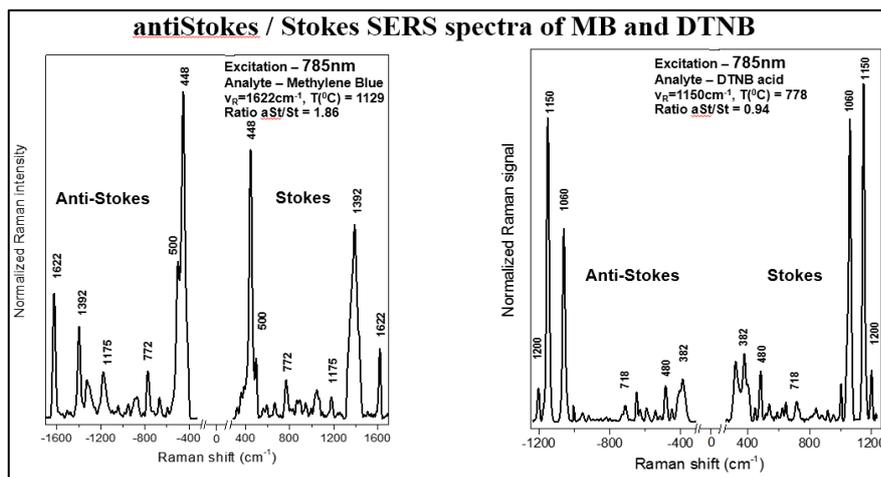


Рис.6. ГРП-спектры метиленового синего (слева) и DTNB (справа) в аСт и Ст областях спектра

И по интенсивности пиков в антиСтоксовой части спектра и по температуре одного из пиков очевидно, что есть некая «аномалия», которая требует своего дальнейшего объяснения.

2. На КАРС микроспектрометре, была апробирована регистрация рамановских спектров липодисков со встроенным белком Kv7.1 (рис.7).

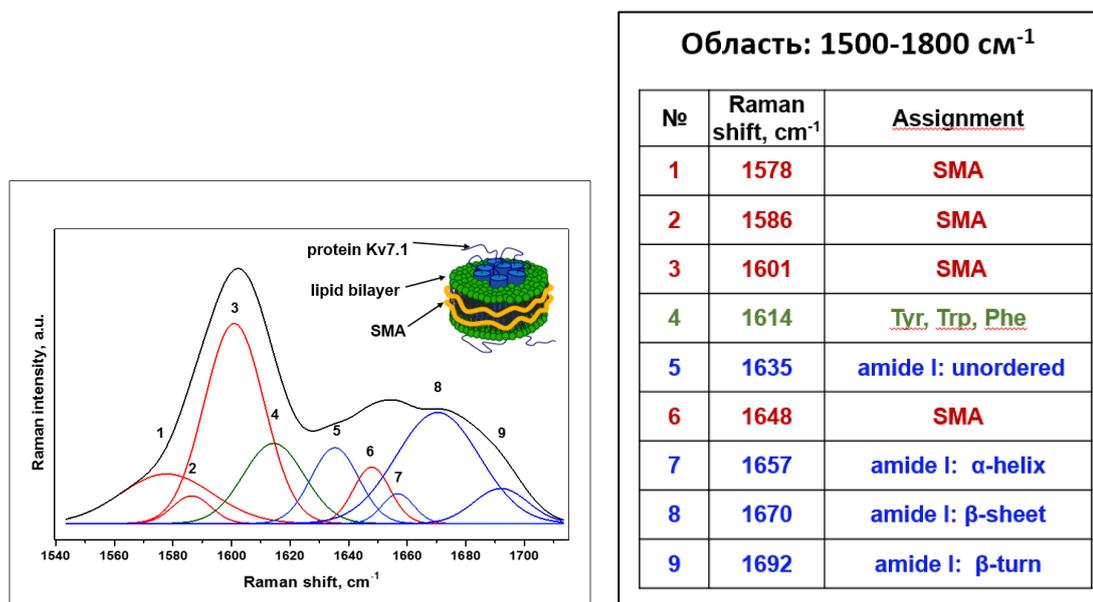


Рис.7. Аппроксимация (деконволюция) рамановского спектра белка Kv7.1 встроенного в липодиск. Справа расшифровка спектра

Полученный предварительный результат по аппроксимации рамановского спектра (см. таблицу справа о рис.7) показал неоспоримое преимущество колебательной, рамановской спектроскопии по идентификации тонкой химической структуры данных образцов. Перспективы и инновационный характер этих исследований позволят, на наш взгляд, пролить свет на липид-мембранные взаимодействия.

3. Еще один крупный сегмент предлагаемого проекта относится к нетозу. Выше уже было отмечено, что здесь экспериментальный задел коллектива сектора

рамановской спектроскопии вышел на уровень первой значимой публикации в журнале Journal of Raman Spectroscopy в 2020 году. Ссылка на эту публикацию приведена в списке литературы под номером 33 на стр. 11.

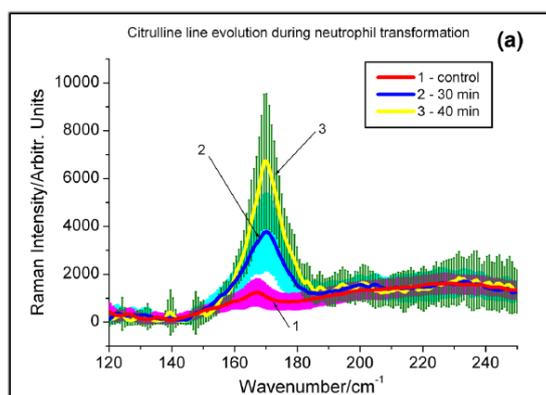


Рис.8. Низкочастотный пик цитруллина в рамановском спектре нейтрофилов.

На рис.8 продемонстрирован низкочастотный рамановский пик цитруллина после активации клеток нейтрофилов в течении 30 и 40 минут. Для сравнения приведен также контроль. Цитруллирование гистонов напрямую указывает начало процесса нетоза (преднетоз) и может служить спектроскопическим маркером для ранней диагностики нетоза.

Оценка кадровых ресурсов и бюджета.

Практически вся рамановская спектроскопия и микроскопия по предлагаемому проекту будет выполняться на установке «КАРС» микроскоп в ЛНФ ОИЯИ. За прошедшие 5 лет персонал сектора Рамановской спектроскопии приобрел достаточно высокий профессиональный уровень и навыки, чтоб успешно справиться с выполнением нового проекта. Это подтверждается также и рядом публикаций в высокорейтинговых журналах и участием в крупных международных конференциях, в том числе с приглашенными докладами, за прошедший отчетный период (список прилагается). Роль партнеров проекта также нельзя недооценивать как в плане поставки уникальных образцов липодисков и клеток нейтрофилов, так и в плане анализа и обсуждения результатов.

В секторе Рамановской спектроскопии в настоящее время работают 11 сотрудников (5 из них с неполным рабочим временем). Семеро из них – молодые ученые и инженера в возрасте до 35 лет. В составе сектора функционирует группа нелинейной микроспектроскопии. Весь состав Сектора полноценно будет задействован в реализации предлагаемого нового проекта.

Таким образом, вышеописанная оптическая платформа своими современными характеристиками для рамановской микроспектроскопии и люминесцентных исследований, потенциально готова к выполнению нового проекта в рамках продления темы и нового проекта «Биофотоника».

В тоже время, ключевой позицией в новом проекте становится дополнение имеющейся приборной инфраструктуры низкочастотным рамановским спектрометром.

**Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления
Проекта «Рамановская микроспектроскопия в биомедицинских
исследованиях».**

Наименования затрат, ресурсов, источников финансирования		Стоимость (тыс. долл.). Потребности в ресурсах	Предложение лаборатории по распределению финансирования и ресурсов		
			1 год	2 год	3 год
Затраты	Основные узлы оборудования, работы по его обновлению, наладке и т.п. (спектрометр сверхнизких частот, микро-объективы, фильтры, измерительная аппаратура и др.)	220	85	70	65
	Материалы	50	10	20	20
Источники финансирования	Бюджетные средства	270	95	90	85
	Внебюджетные средства	-	-	-	-
	Затраты из бюджета, в том числе инвалютные средства				
	Вклады коллаборантов. Средства по грантам. Вклады спонсоров. Средства по договорам. Другие источники финансирования и т.д.				

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

Г.М. Арзуманян

Н. Кучерка

**Смета затрат по проекту
«Рамановская микроспектроскопия в биомедицинских исследованиях».**

№№ пп	Наименование статей затрат	Полная стоимость, тыс.\$	Расходы по годам (тыс. \$)		
			1 год	2 год	3 год
5.	Материалы	50	10	20	20
6.	Оборудование	220	85	70	65
9.	Оплата НИР, выполняемых по договорам	26	9	9	8
10.	Командировочные расходы, в т.ч.	69	23	23	23
	а) в страны нерублевой зоны		17	17	17
	б) в города стран рублевой зоны		6	6	6
	в) по протоколам		-	-	-
	Итого по прямым расходам:	365	127	122	116

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

Г.М. Арзуманян

Н. Кучерка

ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ

В.Н. Швецов

ВЕДУЩИЙ ИНЖЕНЕР-ЭКОНОМИСТ ЛНФ

Л.С. Овсянникова

План-график работ на 2021-2023 гг.

Наименование работ		План работ по годам		
		2021	2022	2023
1.	Исследование особенностей соотношения интенсивностей аСт / Ст в спектрах ГКР в зависимости от мощности и длины волны накачки.			
2.	Определение механизмов формирования аСт / Ст спектров в непрерывном и импульсном режимах.			
3.	Систематические эксперименты, нацеленные на формулировку условий регистрации воспроизводимых ГКР-спектров для биосенсорики.			
4.	Отработка методики регистрации и анализа рамановских спектров «пустых» липодисков и со встроенными мембранными белками .			
5.	Исследование влияния липидного окружения на структуру мембранного белка.			
6.	Получение новой спектроскопической информации о структуре липодисков с мембранными белками.			
7.	Поиск спектральных/раман маркеров НЕТОЗ-а.			
8.	Исследование механизмов стерильной активации НЕТОЗ-а под действием УФ излучения.			
9.	Рамановская спектроскопия сверхнизких частот $\sim (5-10) \text{ см}^{-1}$			

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

Г.М. Арзуманян

Н. Кучерка

Основные публикации

1. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., et al., "Surface-enhanced micro-CARS mapping of a nanostructured cerium dioxide/aluminum film surface with gold nanoparticle-bound organic molecules", JRS, 49, 2018, 7(2), pp. 1145-1154.
2. Арзуманян Г.М., Мудрый А.В., Дымшиц О.С. и др., «Фотолюминесценция и структурные характеристики стеклокерамики, содержащей нанокристаллы оксида цинка и ионы европия», Труды конференции ФТТ-2018, 24-28 сент. 2018, Т.2, с.254-257.
3. Poimanova O.Yu., Radio S.V., Arzumanyan G.M., et al., "Hexakis (dimethylsulfoxide-O)-cobalt(II) hexatungstate, [Co(C₂H₆OS)₆][W₆O₁₉]: synthesis from aqueous diethylsulfoxide solution, crystal structure determination, FT-IR and Raman spectroscopy analysis, and surface micromorphology", J. Coord. Chem., 71(3), 2018, pp. 1-19.
4. Sarychev A.K., Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., et al., "Optical properties of mesoscopic, multiscale silver films: surface plasmon localization and giant SERS", Proceedings of SPIE-2018, Paper No.: OP101-87
5. Пойманова Е.Ю., Медведь А.О., Арзуманян Г.М. и др., «Декавольфрамат никеля [Ni(C₂H₆SO)₅(H₂O)]₂[W₁₀O₃₂]: синтез из водно-диметилсульфоксидного раствора, определение кристаллической структуры, ИК- и КР-спектроскопический анализ, микроморфология поверхности», Ж. структ. химии, 59(1), 2018, с. 149-157.
6. Арзуманян Г.М., Линник Д.С., Маматкулов К.З., Глазунова В.С., «Синтез ап-конверсионных наночастиц SrF₂:Yb,Er@SrF₂», Труды III межд. конф. «Донецкие чтения-2018», 25 окт. 2018, Т.2, с. 122-124
7. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., et al., "Laser intensity limits in surface-enhanced linear and nonlinear Raman micro-spectroscopy of organic molecule/ Au-nanoparticle conjugates", JRS, 2019; 50,
8. Arzumanyan G.M., Linnik D.S., Mamatkulov K.Z., Vorobeva M.Yu., et al., "Synthesis of NaYF₄:Yb,Er@SiO₂@Ag core-shell nanoparticles for plasmon-enhanced upconversion luminescence in bio-applications", Annals of Biomedical Science and Engineering, 2019, 3, pp 013-019.
9. Zavatski Sergey, Khinevich Nadia, Arzumanyan Grigory, Bandarenka Hanna et al., "Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Lactoferrin Adsorbed on Silvered Porous Silicon Covered with Graphene", Biosensors, 2019, 9, 34, pp. 1-19.
10. Арзуманян Г.М., Марченко А.С., Маматкулов К.З., Верещагин К.А., Волков А.Ю., "К вопросу о спектральной идентификации активированных и не активированных нейтрофилов методом комбинационного рассеяния света". Труды 61-ой Всероссийской научной конференции МФТИ, Москва, 2019, стр. 27-28.
11. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., et al., "Micro-SECARS Studies of Organic Molecules on Randomly -Nanostructured SERS-Active Surfaces",

Proceedings of the 18-th European conference on non-linear optical spectroscopy (ECONOS), 2019, April 7-10, Rouen, France, p.74, (Microspectrometer “CARS”).

12. Yakimchuk D.V., Kaniukov E.Yu., Arzumanyan G.M., et al., "Self-organized spatially separated silver 3D dendrites as efficient plasmonic nanostructures for Surface-enhanced Raman spectroscopy applications", J. Appl. Phys, 2019, 126
13. Arzumanyan G.M., Gur'ev A.S., Mamatkulov K.Z., et al. "Micro Raman spectroscopy for NETosis detection", JRS, 2020, 1-10

Конференции

1. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., Int. conference “Actual Problems of Raman Scattering – 90 years of Raman effect”, 28 May – 01 June 2018 г., Novosibirsk, Russia. Invited report
2. Arzumanyan G.M., “Polarization-sensitive CARS imaging and surface-enhanced micro-CARS of organic molecules”, BIT’s 2nd International Biotechnology Congress-2018, October 14-16, 2018, Fukuoka, Japan. Oral report.
3. Doroshkevich N.V. “IC-ANMBES 2018”, 23-25 May, 2018, Brasov, Romania. Poster
4. Sarychev A.K., Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., et al., Int. conf. SPIE-2018, 19-23 August, 2018, San Diego, California, United States. Oral report.
5. Mudrii A.A., Arzumanyan G.M., «Photoluminescence and structural characteristics of glass-ceramics”. VIII International conference SSP-2018. 24 – 28 September 2018, Minsk, Belarus. Oral report
6. Bandarenka H.V., Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., et al., 02–05 July, 2018, ETH Zurich, Switzerland. Oral report.
7. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., “First International Conference on Molecular Modeling and Spectroscopy, 2019, 19-22 February, Cairo, Egypt. Keynote report
8. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Fabelinsky V.I., 2019, 08-10 July, Prague, Czech Republic. Keynote report
9. Arzumanyan G.M., “Modern Trends in Raman Microspectroscopy”, International School of Nuclear Physics «JINR Days in Bulgaria», 2019, 13 -17 May, Borovets, Bulgaria. Oral report
10. Mamatkulov K.Z., Vorobeva M.Yu., Bandarenko H.V., Arzumanyan G.M. ICNBME-2019, September 18-21, 2019, Chisinau, Moldova. Oral report
11. Vereshchagin K.A. Volkov A.Yu., Gurev A.S., Kravtsunova D.E., Mamatkulov K.Z., Marchenko A.S., Arzumanyan G.M., “18-th European conference on non-linear optical spectroscopy (ECONOS), 2019, 7-10 April, Rouen, France. Oral report
12. Rudnikh S.K., Vorobyeva M.Yu., Mamatkulov K.Z., Arzumanyan G.M., Openbio-2019, Novosibirsk Region, Koltsovo, 22-25 October, 2019 г. Oral report
13. Bandarenka Hanna, Khinevich Nadia, Zavatski Sergey, Mamatkulov Kahramon, Vorobyeva Maria and Grigory Arzumanyan, VI International Caparica Conference on Analytical Proteomics 2019, 08 – 11 July 2019, Caparica, Portugal. Oral report

14. Marchenko A.S., Arzumanyan G.M., 26-st scientific-practical conference of students and young specialists of Dubna state university, Dubna, 18-19 April 2019. Oral report
15. Marchenko A.S., Vereshchagin K.A., Volkov A.Yu., Mamatkulov K.Z., Arzumanyan G.M., International Conference on Radiation Applications (RAP 2019), September 16-19, 2019, Serbia, Belgrade. Poster
16. Vorobeva M.Yu., Mamatkulov K.Z., Bandarenka H.V., Arzumanyan G.M., EuroSciCon Conference on Nanotechnology and Smart Materials, 2019, 08-10 July, Prague, Czech Republic, Oral report
17. Arzumanyan G.M., Bandarenko H.V., Mamatkulov K.Z., 2020, Feb. 21-22, EuroSciCon-2020, Amsterdam, Netherlands, Keynote report