

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра общей и неорганической химии

**Разработка сенсоров на основе гигантского комбинационного рассеяния
для неинвазивного мониторинга глюкозы в биологических жидкостях**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 411 группы

Направления 04.03.01 «Химия»

Института химии

Бакал Виктории Александровны

Научный руководитель

профессор кафедры

д. х. н., профессор

подпись, дата

С.П.Курчаткин

Зав. кафедрой

д. х. н., профессор

подпись, дата

И.Ю.Горячева

Саратов 2025

ВВЕДЕНИЕ

Разработки, позволяющие усовершенствовать химико-аналитические методы являются актуальной задачей современной науки. Новые системы должны позволять проводить анализ в сложных биологических матрицах, быть селективными, воспроизводимыми, экспрессными и простыми в использовании.

Для покрытия данных требований может быть использована спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), а точнее её разновидность – гигантское комбинационное рассеяние (ГКР), данный эффект связан

с усилением напряженности электромагнитного поля вблизи наночастиц/наноструктур металлов (Au, Ag, Cu).

Преимущества использования наночастиц в качестве активных ГКР – субстратов связаны с их химической стабильностью и наличием плазмонного резонанса. Варьирование различных параметров наноструктур (материал, размер, форма) помогает управлять поверхностно-плазмонным резонансом.

Прямое определение глюкозы методом ГКР осложнено слабым собственным комбинационным сигналом молекулы. Для решения этой задачи применяются косвенные подходы, например, иммобилизация фермента глюкозооксидазы (GOx), которая катализирует окисление глюкозы. Это позволяет преобразовать биохимическую реакцию в детектируемый ГКР-сигнал, связанный с изменением локального химического окружения.

Цель настоящей дипломной работы – разработка и оптимизация наноструктурированных серебряных субстратов для неинвазивного определения уровня глюкозы методом спектроскопии ГКР с применением алгоритмов машинного обучения.

Основными задачами работы являются:

1. Синтез и оптимизация наночастиц серебра методами боргидридного восстановления и реакции «серебряного зеркала» для создания стабильных ГКР-активных подложек.

2. Исследование оптических (УФ-спектроскопия) и морфологических (СЭМ) характеристик синтезированных субстратов, включая анализ их

коллоидной стабильности и структурных изменений при контакте с биологическими жидкостями.

3. Оценка биосовместимости материалов на клеточной линии L929 и изучение их антимикробной активности в отношении *S. aureus*.

4. Разработка фермент-иммобилизованного биосенсора на основе GOx для детектирования глюкозы с установлением корреляции между интенсивностью ГКР-сигнала и концентрацией аналита.

5. Применение ансамблевых алгоритмов машинного обучения для прогнозирования концентрации глюкозы с учетом нормализации спектральных данных.

Основное содержание работы

Во введении аргументирована актуальность темы исследования выпускной квалификационной работы, сформулированы цель и задачи исследования.

В первом разделе (обзоре литературы) представлена общая информация о спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) и наночастицах серебра (НЧС) с акцентом на получение субстратов ГКР, способах их функционализации ферментом, определении аналитов, а также приведена формула для расчета коэффициента усиления. Представлена общая информация о способах синтеза наночастиц серебра, их свойствах. Особое внимание уделено определению уровня глюкозы в биологических жидкостях, обозначена значимость мониторинга для медицины.

Во втором разделе перечислены реагенты и аппаратура, используемые в работе, а также описана техника эксперимента. Объектом исследования является ГКР подложка на основе наночастиц серебра.

В качестве матрицы использовали нетканый материал – полиакрилонитрил.

Регистрация спектров КР и ГКР проводилась на приборе Renishaw inVia (Renishaw, Великобритания). Измерение спектров поглощения проводили на микропланшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия).

Изображения ГКР-подложек были получены с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе MIRA II LMU (Tescan, Чехия) в режимах вторичных и обратно отражённых электронов.

Общая методика получения ГКР-субстратов

Для придания сенсорной функциональности материалам были использованы следующие стратегии: восстановление агрегатов серебряных наночастиц на поверхности материала по реакции «серебряного зеркала»; использование боргидридного синтеза для покрытия волокон. Синтез проводили с использованием ПАН размером 1×1 см, размещённых в пластиковом контейнере размером $1 \times 1 \times 1$ см.

Предварительный анализ эффективности субстратов

Эксперименты по определению оптимального субстрата проводили с использованием модельного соединения 4-меркаптобензойной кислоты.

Пик в области $1072\text{--}1078\text{ см}^{-1}$ соответствует валентному колебанию связи $\nu(\text{C}\text{--}\text{S})$ в ароматическом кольце, тогда как пик при $1584\text{--}1589\text{ см}^{-1}$ относится к «дыхательному» режиму колебаний самого ароматического кольца. Молекула 4-МБК связывается с подложкой за счёт ковалентной связи $\text{Ag}\text{--}\text{S}$. Появление пика в диапазоне $240\text{--}267\text{ см}^{-1}$ указывает на хемосорбцию тиольной группы на поверхность серебра, а не на простую физическую адсорбцию (рисунок 1).

Для сравнения усиления во всех образцах в качестве универсального маркера был выбран пик при 1586 см^{-1} , поскольку он наблюдался во всех спектрах независимо от условий синтеза. Исходя из воспроизводимости и стабильности усиления, образец 2m1M был определен как оптимальный субстрат.

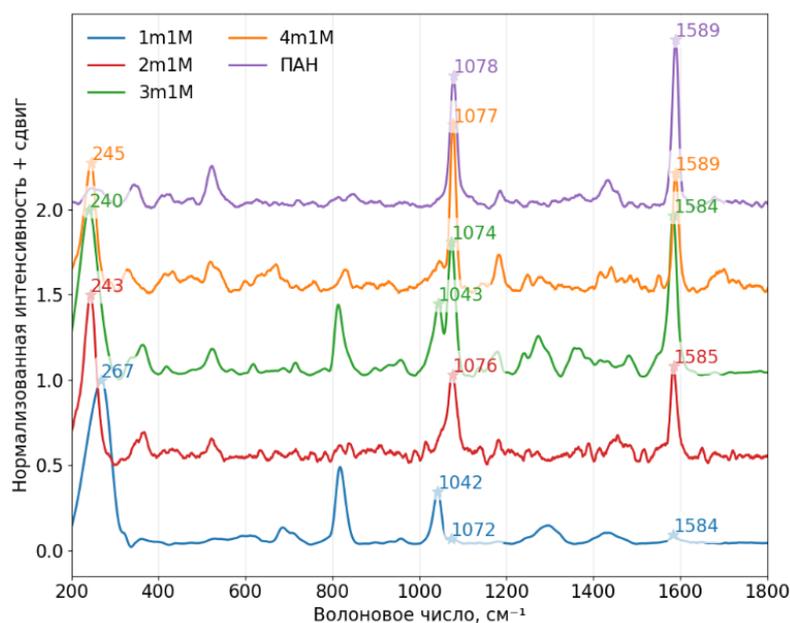


Рисунок 1 – Расширенные ГКР-спектры (200–1800 cm^{-1}) 10^{-4} М 4-МБК, адсорбированного на подложках НЧС@ПАН, синтезированных методами 1м–4м. Для сравнения также представлен спектр 10^{-2} М 4-МБК на ПАН (без серебра).

Из всех подложек образец 2m1M показал наиболее воспроизводимый сигнал между сериями и подложками, несмотря на меньшую интенсивность по сравнению с образцами 2m2M, 2m3M и 4m1M (рисунок 2). Именно поэтому он был выбран как оптимальный для дальнейших количественных измерений.

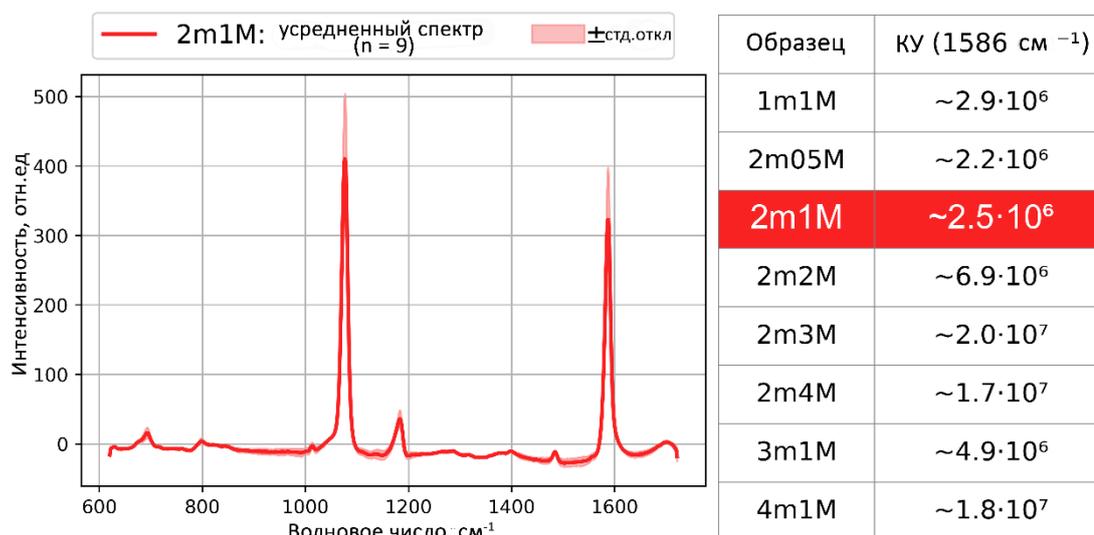


Рисунок 2 – Средний ГКР спектр подложек 2m1M с стандартным отклонением (3 отдельные подложки, 3 карты на подложку, 15×15 спектров на карту); КУ на 1586 cm^{-1} для разных образцов, суммированный.

ГКР-спектры также были получены для серии образцов (ВН1–ВН6) при детектировании модельного соединения 4-МБК (рисунок 17). Для образцов ВН1–ВН3 наблюдались характерные пики 4-МБК при $\sim 1073 \text{ см}^{-1}$ и $\sim 1583 \text{ см}^{-1}$, что указывает на стабильное усиление сигнала на этих подложках. КУ для этих образцов составляли от 1.2×10^4 до 3.2×10^4 при 1073 см^{-1} и от 4.9×10^4 до 1.8×10^5 при 1583 см^{-1} , демонстрируя высокую чувствительность (см. таблицу 1).

Образец	КУ	
	1073 см^{-1}	1583 см^{-1}
ВН1	2.4×10^4	1.4×10^5
ВН2	2.4×10^4	1.1×10^5
ВН3	3.2×10^4	1.8×10^5
ВН4	1.2×10^4	4.9×10^4
ВН5	2.9×10^4	1.1×10^5
ВН6	2.3×10^4	1.3×10^5

Таблица 1. Коэффициенты усиления спектров ГКР при 4-МБК (10^{-4}M) для характерных пиков.

Спектры для ВН1–ВН3 соответствовали ожидаемой реакции на 4-МБК, что подтверждает пригодность этих подложек для последующих экспериментов с глюкозой.

Оценка цитотоксичности

Под нетканым материалом, модифицированным наночастицами серебра наблюдались в основном мертвые и округлые клетки, что указывает на цитотоксические эффекты, вероятно, вызванные локально повышенными концентрациями ионов серебра. В переходной зоне присутствовала смешанная популяция клеток, включающая как мертвые округлые клетки, так и удлиненные адгезивные фибробласты, что указывает на частичный токсический

эффект. В области, удаленной от образца, клетки L929 образовали монослой, что указывает на сохраненную способность к пролиферации и адгезии в условиях совместной инкубации с разработанными датчиками (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Оптическая микроскопия клеток, культивируемых в присутствии 2m1M. Масштабный отрезок составляет 100 мкм.

Учитывая воздействие субстратов ГКР на клетки L929, не рекомендуется длительный контакт с кожей человека.

Антимикробные свойства

Установлено, что модифицированный нетканый материал способен подавлять рост бактерий на поверхности агара. Вокруг образца визуализируются четко выраженные зоны полного (рисунок 4а) и частичного (рисунок 4б) ингибирования роста бактерий, составляющие $1,9 \pm 0,3$ и $2,1 \pm 0,2$ соответственно (относительно площади образца). Общая зона ингибирования составляет $4,0 \pm 0,1$. Подавление роста *S. aureus* обусловлено диффузией ионов серебра в питательную среду.

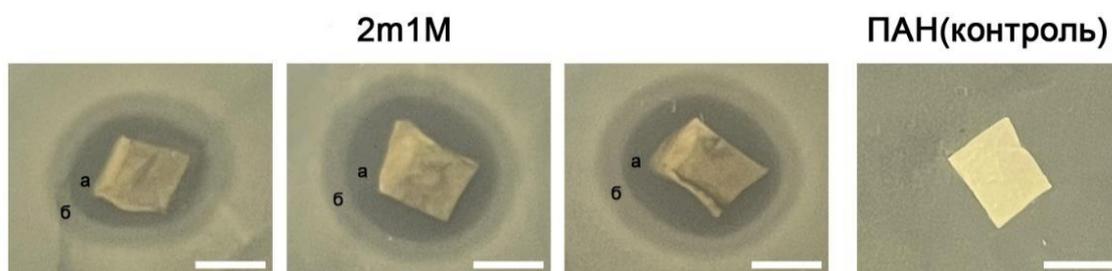


Рисунок 4 – Подавление роста *S. aureus* после инкубации с образцами нетканого материала: (а) полное, (б) частичное. Масштабный отрезок составляет 5мм.

Анализ данных проводили с использованием регрессионных моделей: полученные зависимости между предсказанными и фактическими концентрациями водных растворов глюкозы представлены для метода случайного леса (рисунок 5а) и градиентного бустинга (рисунок 5б). Каждое волновое число в спектрах КР и ГКР рассматривали как отдельный признак для обучения моделей. В качестве маркеров анализировали не продукты ферментативной реакции (например, D-глюконо- δ -лактон или перекись водорода), а динамика изменения концентрации глюкозооксидазы при добавлении глюкозы.

Полученные зависимости между предсказанными и фактическими концентрациями водных растворов глюкозы представлены на рисунке 5а–б. Идентифицированы характерные полосы рамановского рассеяния при 820 см^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{C})$, $\nu(\text{C}-\text{O})$), 895 см^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{O})$, $\delta(\text{C}-\text{C}-\text{C})$), 955 см^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{C})$), 1040 см^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$), 1380 см^{-1} ($\delta(\text{C}-\text{H})$, $\delta(\text{O}-\text{H})$), $1400\text{--}1430\text{ см}^{-1}$ ($\delta(\text{C}-\text{H}_2)$, $\delta(\text{O}-\text{H})$), соответствующие глюкозе (рисунок 5в).

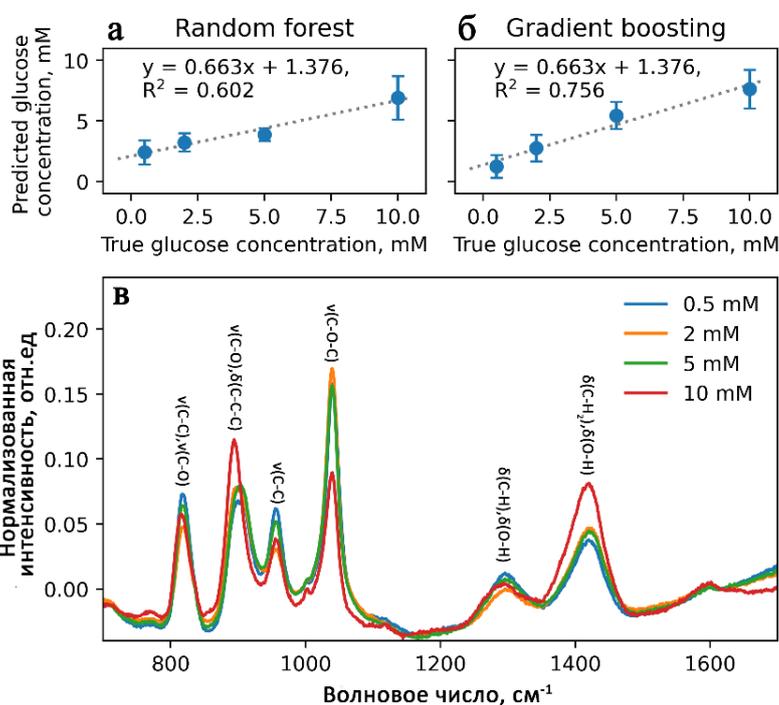


Рисунок 5 – Результаты обучения моделей случайного леса (а) и градиентного бустинга (б) на нормализованных спектрах глюкозы (0.5, 2, 5 и 10

mM), полученных на подложках 2mM+GOx. Средние спектры (15×15 карта) анализируемых наборов данных (в).

Аналогично водным растворам глюкозы, наиболее эффективной моделью для анализа спектров глюкозы в искусственном поте оказалась регрессия с градиентным бустингом. Результаты эффективности полученной модели представлены на рисунок 6. Модель градиентного бустинга позволяет определить значимость признаков, указывая, какие волновые числа оказывают наибольшее влияние на результаты анализа. Волновые числа с важностью более 1% для регрессионной модели выделены серым цветом. Концентрации растворов глюкозы в искусственном поте указаны в легенде графика.

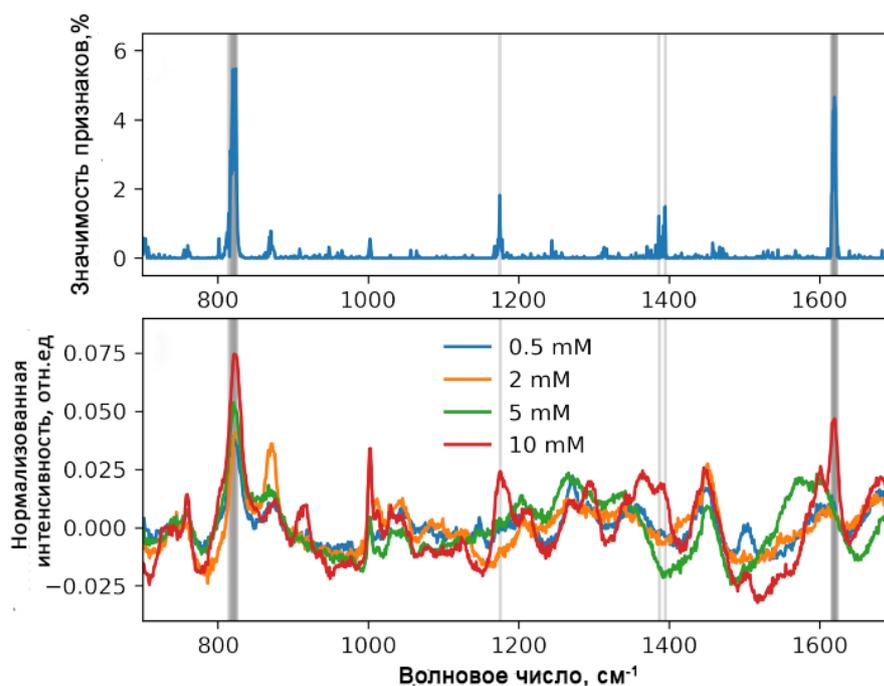


Рисунок 6 – Результаты модели регрессии с повышением градиента, построенной на нормализованных данных. Значение признака в процентах (а), данные усреднены по 900 нормализованным спектрам (б).

Результаты применения регрессионных (GradientBoostingRegressor) и классификационных (GradientBoostingClassifier) моделей к данным, полученным для подложек, синтезированных боргидридным методом (BH2), представлены на рисунках 7-8 (а-б) соответственно. Метод случайного леса не

использовался для анализа, так как показал низкие значения R^2 соответственно его реализация на полученных данных не имеет смысла.

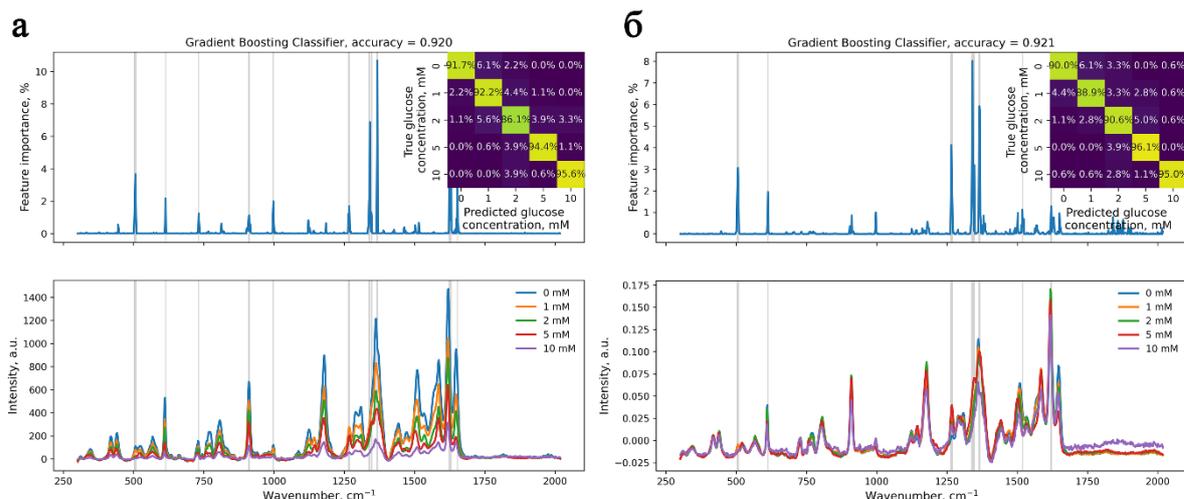


Рисунок 7 – Результаты классификационной модели с использованием градиентного бустинга на ВН2: ненормализованные (а) и нормализованные (б).

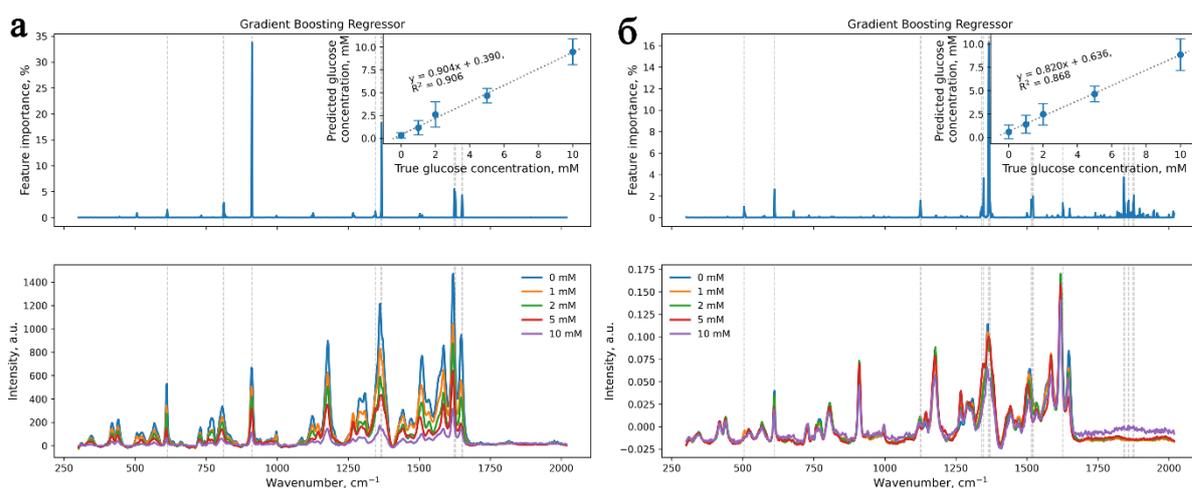


Рисунок 8 – Результаты регрессионной модели с использованием градиентного бустинга для ВН2: ненормализованные (а) и нормализованные (б) Оба набора данных показывают, что модель успешно предсказывает концентрацию глюкозы, о чем свидетельствуют высокие коэффициенты точности и соответствующие значения R^2 .

В таблице 2 приведены показатели производительности для двух моделей повышения градиента: GradientBoostingRegressor (R^2) и GradientBoostingClassifier (точность). Эти значения приведены как для нормализованных, так и для ненормализованных данных и измерены для трех подложек (ВН1, ВН2, ВН3).

Нормализация данных улучшает производительность модели, это может быть связано с тем, что она помогает устранить различия в масштабах признаков, делая обучение модели более стабильным и эффективным. Исключение составил образец ВН2 в регрессионной модели (*GradientBoostingRegressor*), где нормализация привела к незначительному снижению R^2 (0.868 против 0.906). Это может объясняться особенностями распределения данных для ВН2, где исходный масштаб признаков уже был оптимальным для обучения.

Модель	Образец	Нормализованные данные	Ненормализованные данные
<i>GradientBoostingRegressor</i> (R^2)	ВН1	0,601	0,493
	ВН2	0,868	0,906
	ВН3	0,744	0,690
<i>GradientBoostingClassifier</i> (Точность)	ВН1	0,682	0,562
	ВН2	0,921	0,920
	ВН3	0,679	0,707

Таблица 2 – Сравнение производительности моделей машинного обучения для подложек ВН1–ВН3.

GradientBoostingClassifier продемонстрировал более высокую точность по сравнению с показателями R^2 *GradientBoostingRegressor* для всех образцов. Это

свидетельствует о том, что задача дискретной классификации (определение концентрации глюкозы) подходит для экспериментальных данных.

Благодарность за помощь в проведении проверки антибактериальных свойств автор выражает Пластун Валентине Олеговне, в проведении клеточных экспериментов автор выражает к.ф.-м.н. Гусяковой Ольге Игоревне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1) Оптимизированы условия получения ГКР-подложек на основе наноструктур серебра, включая боргидридное восстановление ($\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$) и реакцию «серебряного зеркала» ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{AgNO}_3/\text{L}$ -аскорбиновая кислота).
- 2) Исследованы оптические свойства синтезированных наночастиц серебра методом УФ-спектроскопии. Установлено, что полученный коллоидный раствор обладает высокой стабильностью ($\Delta\lambda \approx 4$ нм за 3 ч). С помощью морфологического анализа выявлены структурные различия между НЧС@ПАН@ и образцами после контакта с искусственным потом. Обнаружено формирование кристаллических структур с «цветочной морфологией», приводящих к неоднородности распределения электромагнитного поля.
- 3) Оценка биосовместимости. Локальная цитотоксичность в зоне прямого контакта с клеточной линией L929 (снижение жизнеспособности). Антибактериальная активность в отношении *S. aureus* (зона ингибирования: 4.0 ± 0.1)
- 4) Создан биосенсор для определения глюкозы путём иммобилизации глюкозооксидазы на серебряной подложке. Установлена линейная зависимость ГКР-сигнала от концентрации глюкозы в диапазоне 0–10 мМ ($R^2 = 0.92$) для ВН2.
- 6) Проведено сравнение эффективности алгоритмов ансамблевых методов для прогнозирования концентрации глюкозы. Нормализация спектральных данных позволила значительно повысить точность моделей машинного обучения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ «Носимые сенсорные устройства на основе гибких подложек для детекции метаболитов и маркеров социально значимых заболеваний в биологических жидкостях» (№22-79-10270)