МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. Ломоносова

На правах рукописи

Нечаева Наталья Леонидовна

СПЕКТРОСКОПИЯ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОСТРУКТУР СЕРЕБРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ-МАРКЕРОВ И ФЕРМЕНТОВ

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва
2021

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова

Научный руководитель – **Курочкин Илья Николаевич**, доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты – **Горин Дмитрий Александрович**, доктор химических наук, профессор, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», профессор центра фотоники и квантовых материалов

Мерзликин Александр Михайлович, доктор физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и прикладной электродинамики РАН, заместитель директора по научной работе

Дзантиев Борис Борисович, доктор химических наук, профессор, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, руководитель отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики

Защита диссертации состоится «24» июня 2021 года в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1 стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М. В. Ломоносова (Ломоносовкий просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/368387895/

Автореферат разослан «21» мая 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук И. К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Совершенствование существующих химико-аналитических методов, а также разработка новых селективных и высокочувствительных аналитических методик, является актуальной научной задачей. Современные требования к разрабатываемым подходам включают экспрессность, мультиплексность, селективность, простоту проведения анализа, а также возможность неразрушающего исследования и работу в различных растворителях и сложных матрицах (например, биологические жидкости человека). Этим требованиям удовлетворяет спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) благодаря узким пикам в спектре и наличию области «отпечатков пальцев» (500-1800 см$^{-1}$), обеспечивающей высокую селективность. Модификацией метода является гигантское комбинационное рассеяние (ГКР, SERS, surface-enhanced Raman spectroscopy) – эффект усиления интенсивности сигнала КР вблизи или на поверхности наночастиц или наноструктур ряда металлов из-за увеличения напряженности электромагнитного поля по сравнению с исходным лазерным полем. Эта модификация позволяет усилить сигнал КР до 10^{14} раз.

Необходимым условием получения ГКР-сигнала является наличие хорошего ГКР-субстрата, который имеет специфическую наноразмерную морфологию или топологию. Среди ГКР-активных субстратов можно выделить две основные группы: планарные плазмонные структуры (подложки) и золи наночастиц, чаще всего серебра и золота. Подложки характеризуются, как правило, высокой технологичностью и воспроизводимостью получения. Наночастицы в свою очередь имеют бóльшие коэффициенты усиления, что позволяет снижать пределы обнаружения определяемых соединений.

Эффект ГКР связан с усилением напряженности электромагнитного поля в определенных областях наноструктурированных плазмонных структур. На величину ГКР-сигнала оказывают влияние многие факторы: размер и форма плазмонных структур, обеспечивающих усиление; природа анализируемого соединения и характер его взаимодействия с подложкой/золем. Зависимость от столь многих факторов бросает вызов использованию ГКР для количественного определения веществ, что, однако, является вполне выполнимой задачей.

Важными и значимыми с точки зрения молекулярной диагностики объектами исследований являются белки и ферменты крови человека. В настоящее время известно более 1000 белков плазмы крови, из которых не менее 100 ассоциированы с различными заболеваниями, нарушением гормонального обмена, интоксикацией, воспалением и пр. В связи с этим проблема создания чувствительных, селективных и мультиплексных методик

определения таких белков-маркеров стоит особенно остро. Примером таких маркеров могут служить эстеразы, как индикаторы интоксикации фосфорорганическими соединениями и пестицидами, и гликированные белки, как индикаторы нарушения углеводного обмена. Бутирилхолинэстераза (БХЭ) человека необратимо ингибируется высокотоксичными препаратами и нервнопаралитическими соединениями, поэтому динамика изменения уровня БХЭ может являться диагностическим и прогностическим индикатором отравления фосфорорганическими соединениями и карбаматами. Гликированный альбумин (ГА) составляет более 80% от общего количества гликированных белков сыворотки и отражает среднюю концентрацию глюкозы в течение 3 недель. Хроническая гипергликемия при диабете проявляется в возрастающей концентрации гликированных белков, включая альбумин, поэтому ГА может быть использован в качестве индикатора нарушений углеводного обмена. Ранее были опубликованы работы по качественному определению гликированного альбумина, однако количественных измерений в плазме крови не проводилось.

Одним из подходов к проблеме определения таких молекулярных маркеров может стать применение ГКР спектроскопии и создание ГКР-субстратов с определенными особенностями, направленными на количественный и чувствительный анализ. В предыдущих исследованиях описаны ГКР-субстраты на основе серебра, но количественных измерений белков и ферментов с помощью таких структур не проводилось. При решении таких задач преимуществом спектроскопии ГКР являются малые объемы образца, необходимые для исследования.

Целью работы являлось исследование возможности использования наноструктурированных субстратов серебра для определения белков-маркеров и активности ферментов методом спектроскопии ГКР.

Для достижения указанной цели в работе решались следующие задачи:

- создание ГКР-подложки на основе мультиразмерных пластин серебра, характеризация и описание качественного и количественного ее состава, изучение стабильности, расчет коэффициента усиления;

- оценка возможности и разработка методик определения продуктов гидролиза субстратов холинэстераз с использованием ГКР-активных структур (мультиразмерных пластин серебра и золей наночастиц серебра);

- оценка возможности и разработка методики количественного определения концентрации белков-маркеров и ферментов с использованием предложенных ГКР-активных структур для медицинских и медико-токсикологических целей.

Научная новизна. Предложены новые ГКР-активные субстраты (подложки на основе мультиразмерных пластин серебра с и без дополнительного покрытия наночастицами серебра) и на их основе созданы биоаналитические методики, позволяющие количественно определять ферменты и белки-маркеры как в модельных системах, так и в плазме крови человека. Показано, что золи наночастиц серебра могут использоваться для количественного определения продуктов ферментативных реакций.

Практическая значимость диссертационной работы состоит в возможности использования разработанных методик для определения маркеров заболеваний и состояния интоксикации, потенциального определения ингибиторов холинэстераз и ранней диагностики нарушений углеводного обмена.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наличие в структуре ГКР-субстрата разноориентированных мультиразмерных серебряных пластин позволяет значительно усилить сигнал комбинационного рассеяния анализируемого соединения.
2. Использование наноструктур на основе серебра позволяет детектировать тиохолин и количественно оценивать концентрацию бутирилхолинэстеразы методом спектроскопии ГКР.
3. ГКР-подложки позволяют реализовать отложенные измерения концентрации холинэстераз крови – измерение не в момент нанесения и манипуляций с образцом.
4. Модификация ГКР-субстрата 4-меркаптофенилбороновой кислотой позволяет селективно детектировать диол-содержащие соединения.
5. Применение в качестве ГКР-субстрата наночастиц серебра позволяет детектировать тиохолин и количественно оценивать концентрацию бутирилхолинэстеразы.
6. Наночастицы серебра обладают высокими коэффициентами усиления сигнала комбинационного рассеяния, что позволяет снизить пределы обнаружения определяемых соединений.

Диссертационная работа выполнена при поддержке следующих фондов: Грант НАТО SfP №984082 «Наука для мира и безопасности», грант РФФИ №16-08-01246 (а) «Разработка сенсорных подложек на основе микро- и наноструктур серебра для определения холин- и фенолсодержащих продуктов ферментативных реакций методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния», грант РНФ №16-14-00209 «Разработка биоаналитической платформы для определения гликозилированных белков крови на основе усиления комбинационного рассеяния света плазмонными наноструктурами», проект Президиума РАН «Исследование возможностей

специфического определения ультранизких концентраций микробиологических объектов и физиологически активных веществ с использованием метаматериалов, фокусирующих на своей поверхности гигантские электромагнитные поля», программа Президиума РАН «Создание сверхчувствительных методов идентификации биологических объектов с помощью оптических метаматериалов».

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на научных семинарах, научных школах, всероссийских и международных конференциях: XII International Conference on Nanostructured Materials «NANO 2014», Moscow, Russia, 2014; Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни», Москва, Россия, 2014; International Conference «Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications», Moscow region, Russia, 2015; «Saratov Fall Meeting SFM'15», Saratov, Russia, 2015; «Biophysics Biophotonics Biotechnology», Moscow, Russia, 2016; Tenth Winter symposium on chemometrics, Samara, Russia, 2016; First European/10th German BioSensor Symposium, Potsdam, Germany, 2017; 11-th International Conference «BIOCATALYSIS-2017: Fundamentals and Applications», Moscow region, Russia, 2017; Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни.», Москва, Россия, 2019; 12-th International Conference «BIOCATALYSIS-2019», Leonid Sobolev board, Russia, 2019; 2-nd European Biosensor Symposium, Florence, Italy, 2019.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых международных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus, 2 статьи по результатам конференций в спецвыпусках, 2 главы в сборниках и 11 тезисов докладов российских и международных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованных источников литературы (254 наименования), приложения и списка сокращений. Диссертация изложена на 110 страницах, содержит 50 рисунков и 8 таблиц.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. ГКР-подложки

Были рассмотрены различные варианты формирования ГКР-активных подложек. Первый тип оригинальных подложек основан на создании регулярных диэлектрических структур, покрытых тонким слоем серебра. Также были созданы подложки на основе плазмонных наноструктур, обладающих разными размерами и разной ориентацией относительно падающего излучения (мультиразмерные пластины серебра), и комбинация таких подложек с наночастицами серебра. Изучены вопросы термической деструкции ГКР-активных подложек в ходе измерения сигналов ГКР. Высокую воспроизводимость получения, наибольшие интенсивности сигналов и широкий диапазон применения продемонстрировали подложки на основе плазмонных наноструктур различных размеров, поэтому эти подложки будут рассмотрены подробнее.

Серебряные ГКР-активные поверхности были получены методом трафаретной печати с использованием серебросодержащей полимерной пасты на поливинилхлоридной (ПВХ) подложках толщиной 0,2 мм и на алюминиевой основе толщиной 5 мм. Продемонстрирована термическая нестабильность подложки с ПВХ основой при мощности лазера 40 мВт. Разогрев и деструкция подложки и молекул аналита значительно затрудняют детекцию и требуют поиска ГКР-субстратов, обеспечивающих хороший отвод тепла. Подобную проблему разогрева образца и температурной деградации мы наблюдали и при использовании наночастиц золота. Во избежание деструкции подложки ГКР-активную серебросодержащую пасту было решено наносить на алюминиевую основу из-за ее более высокой теплопроводности.

Новые ГКР-активные подложки были охарактеризованы различными физико-химическими методами. Поверхность новых ГКР-подложек была исследована методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Качественный и количественный состав серебросодержащей пасты был охарактеризован методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭРС). Поверхность ГКР-подложки представляет собой гетерогенную слоисто-хлопьевидную структуру (рис. 1) с серебряными частицами разного размера: 300-400 нм фракции формируют агрегаты размером 2 мкм. Эта хаотичная структура с шероховатыми краями способствует локальному усилению электромагнитного поля, что в свою очередь приводит к усилению сигнала комбинационного рассеяния. Основные пики ЭРС спектра характеризуют количественный состав: паста в основном состоит из серебра (>89% вес.), также присутствуют пики углерода (<10%), остальные пики принадлежат кремнию, магнию и кислороду. В течение

6-недельного хранения содержание серебра остается практически неизменным и составляет порядка 90% (таблица 1).

Для выяснения возможности усиления сигнала на новом типе ГРК-подложек был исследован сигнал тиохолина, обладающий ярко выраженным спектром комбинационного рассеяния (рис. 2). Отмеченные на рисунке 2 полосы согласуются с литературой: 500, 773, 900 и 1268 см$^{-1}$. Полоса 773 см$^{-1}$ является самой интенсивной в спектре тиохолина и отвечает «маятниковым» колебаниям метильных групп в триметиламиновой «голове» молекулы ($-N(CH_3)_3^+$). Интенсивность этой полосы была выбрана ориентиром оценки эффективности усиления на ГКР-подложке и основным аналитическим сигналом в дальнейших экспериментах.

Таблица 1. Состав высушенной серебряной пасты в течение 6 недель.

	Время				
Элемент	1 день	2 недели	3 недели	4 недели	6 недель
AgL (wt%)	95±3	90±3	89±3	91±3	93±3
CK (wt%)	3±3	7±3	9±3	8±3	6±3
Остальные элементы	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%

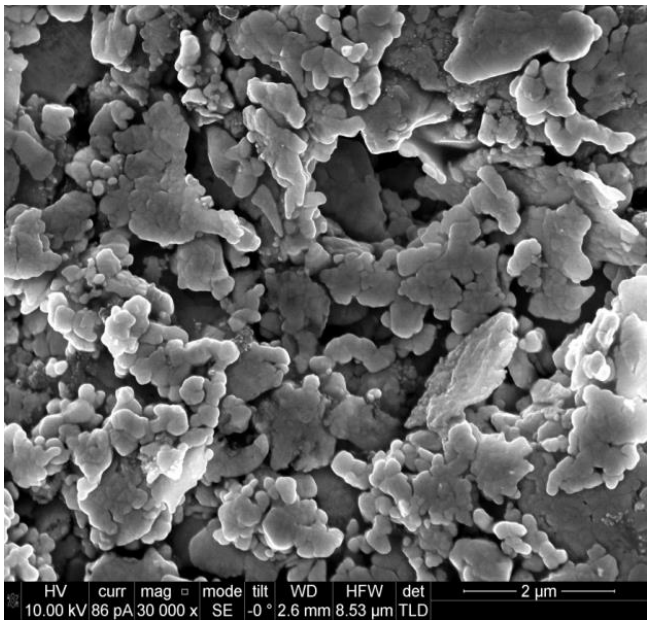

Рисунок 1. СЭМ-изображение серебряной пасты на поверхности ГКР-подложки. Энергетическое разрешение метода 128 эВ. Бар 2 мкм

Сигнал тиохолина, полученный с ГКР-подложки на основе мультиразмерных серебряных пластин, сравнивали с сигналом той же концентрации ТХ, полученным с

различных поверхностей, не обладающих эффектом ГКР: отожженная графитовая паста, кварц, алюминий (фольга), кремний. На рисунке 2 представлены спектры тиохолина в концентрации 100 мкМ, полученные при высушивании на разных поверхностях. Такая концентрация не видна в режиме простого комбинационного рассеяния, но при возникновении эффекта ГКР спектр ТХ проявляется достаточно интенсивно. Характеристические пики тиохолина наблюдаются только в случае серебряной ГКР-подложки, что говорит о ее усиливающих свойствах и возможности регистрировать ГКР-спектры различных соединений.

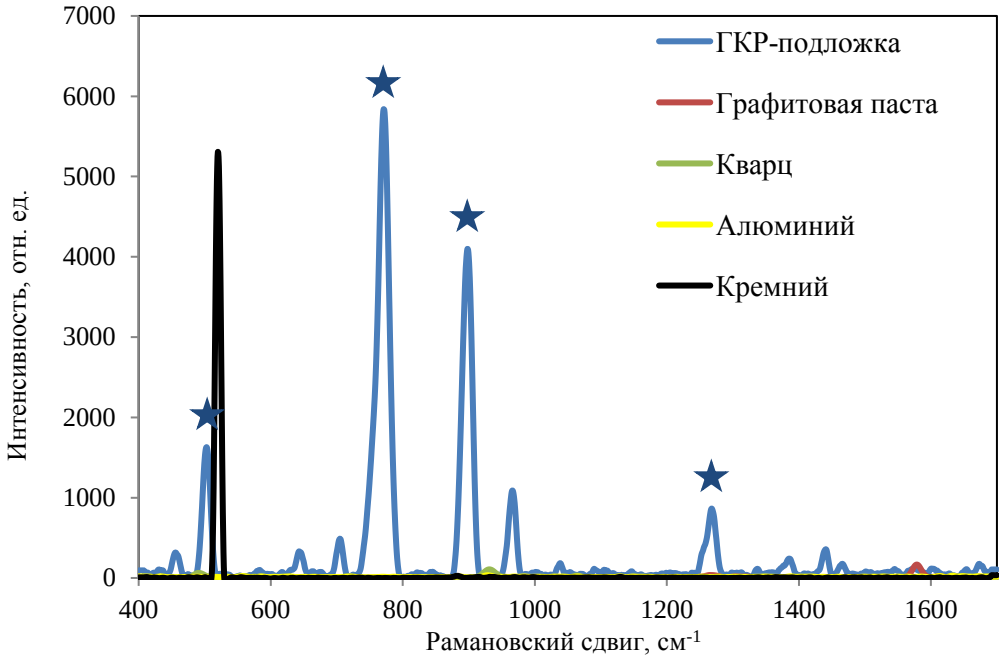

Рисунок 2. Спектры 100 мкМ тиохолина, полученные при высушивании на различных поверхностях. Синий – спектр ГКР тиохолина в концентрации 100 мкМ на серебряной ГКР-подложке с указанием основных характерных пиков: 500, 773, 900 и 1268 см$^{-1}$

Наблюдаемый ГКР-эффект был также описан теоретически. Математическое моделирование ГКР активности новых подложек, проведенное совместно с ИТПЭ РАН с использованием программного обеспечения Comsol Multiphysics, показало, что усиление сигнала КР зависит от расстояния между серебряными частицами и угла падения исходного излучения и является результатом усиления локального электрического поля в зазорах между пластинами. При нормальном падении исходного излучения зависимость интенсивности электромагнитного поля от размеров серебряных частиц демонстрирует максимум в районе 70 нм. Изменение угла падения приводит к росту значения интенсивности и к появлению дополнительного максимума интенсивности в крупных частицах (с полуосью > 300 нм). Такая структура позволяет значительно усилить сигнал

комбинационного рассеяния как за счет образования "горячих точек" на краях серебряных пластин, так и за счет изменения углов падения электромагнитного излучения.

Помимо усиления, обеспеченного структурой серебряной ГКР-подложки, данные ГКР-активные поверхности обладают также потенциалом дополнительного усиления сигнала за счёт нанесения золя наночастиц серебра (НЧС). Наночастицы были синтезированы и охарактеризованы в лаборатории химии поверхности кафедры нефтехимии и органического катализа (А. А. Тепанов, А. А. Кудринский, Химический факультет, МГУ). Наилучший результат показали наночастицы, стабилизированные ПГМБ для обеспечения агрегативной устойчивости. Модификация серебряных подложек наночастицами серебра, стабилизированными полимером ПГМБ, позволяет получить дополнительное усиление сигнала ГКР в 10 раз.

2. Определение бутирилхолинэстеразы

Одним из способов определения концентрации или активности БХЭ является измерение концентрации тиохолина (ТХ), продукта ферментативного гидролиза субстрата бутирилтиохолина (БТХ), накопленного за определенный промежуток времени. Стабильные ГКР-подложки на основе мультиразмерных серебряных пластин были использованы для получения ГКР-спектров тиохолина, которые содержали все характеристические пики этого соединения (рис. 2).

Характер изменения интенсивности спектральных сигналов тиохолина при различных его концентрациях был проанализирован двумя способами: с использованием величины интенсивности основного характеристического пика 773 см$^{-1}$ (рис. 3а) и методом проекции на латентные структуры (ПЛС) (рис. 3б). В первом случае на градуировочной зависимости представлена только величина интенсивности характеристического пика 773 см$^{-1}$. Метод ПЛС использует величины сигналов множества спектральных пиков для описания как можно большей ковариации между независимыми переменными (спектры) и зависимыми (концентрация).

На основе двух полученных градуировочных зависимостей можно рассчитать предел обнаружения тиохолина согласно определению ИЮПАК. В случае ПЛС предел обнаружения рассчитывается с использованием регрессии расчетной концентрации в сравнении с градуировочной концентрацией. Последняя может быть измерена независимым методом или назначена номинально при приготовлении растворов. Для построения градуировочных кривых по тиохолину использовали спектрофотометрический метод Эллмана в качестве независимого измерения.

Градуировочная кривая по интенсивности пика 773 см$^{-1}$ описывается уравнением прямой и позволяет рассчитать предел обнаружения, равный 1,1 мкМ. Кривая, полученная

ПЛС-методом, также описывается уравнением прямой и имеет больший коэффициент корреляции (R^2=0,9999) и меньшие погрешности, так как она учитывает интенсивности всех характеристических пиков ТХ и их взаимное соотношение. Предел обнаружения, рассчитанный по ПЛС-зависимости, составляет 0,261 мкМ.

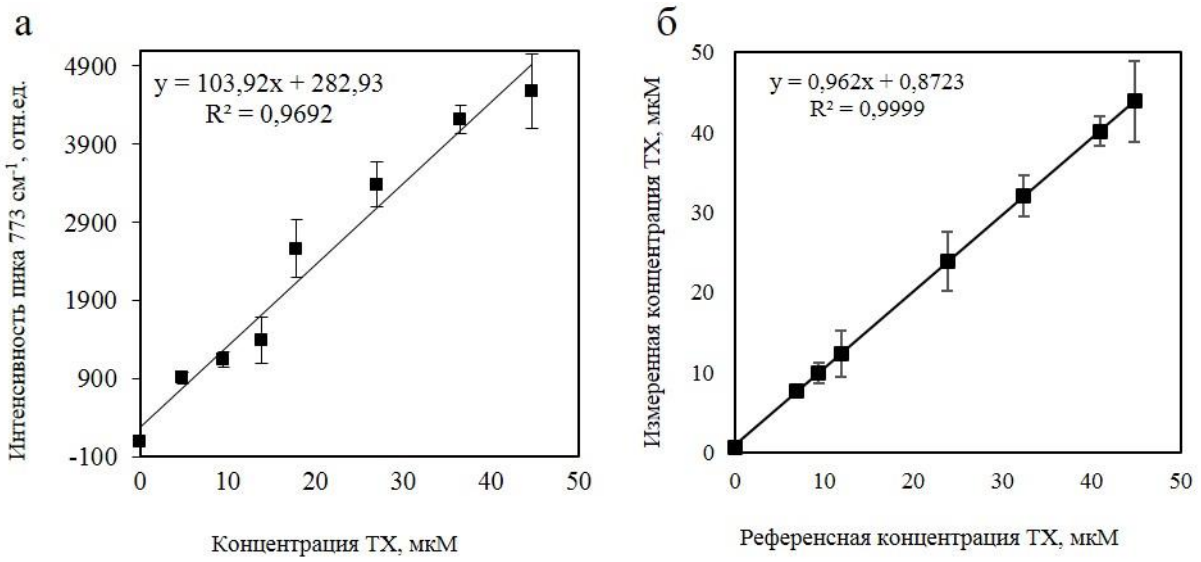

Рисунок 3. Градуировочная зависимость ТХ на серебряных ГКР-подложках: а) по интенсивности пика 773 см$^{-1}$ (R^2=0,9692); б) ПЛС-регрессия тех же спектров (R^2=0,9999)

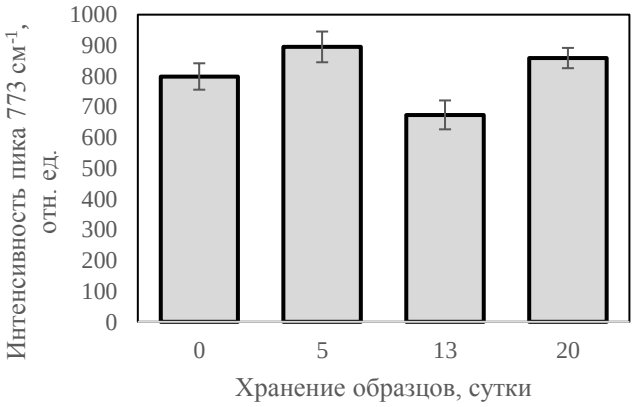

Рисунок 4. Хранение и стабильность образцов тиохолина, нанесенных на серебряную ГКР-подложку.

Была изучена стабильность нанесенных образцов тиохолина на серебряную ГКР-подложку в течение 20 дней (рис. 4). Результаты демонстрируют отклонение среднего значения в пределах погрешности, что позволяет использовать серебряные подложки для иммобилизации образцов в течение длительного времени, вплоть до 20 дней.

ТХ является продуктом ферментативного гидролиза бутирилтиохолина (БТХ). При определении активности БХЭ оба этих вещества присутствуют в реакционной смеси. Поэтому важным шагом на пути к измерению активности фермента с помощью метода ГКР стала оценка возможности детектирования ТХ на фоне БТХ. Были получены спектры ТХ и БТХ при одинаковых концентрациях (50 мкМ) этих соединений (рис. 5). Спектры имеют разную интенсивность и соотношение характеристических пиков, что говорит о различной чувствительности определения этих соединений. Главные отличия относятся к характеристическим пикам ТХ.

Рисунок 6 демонстрирует зависимости интенсивностей пика 773 $см^{-1}$ от концентраций ТХ (черные ромбы) и БТХ (пустые квадраты). Было установлено, что суммарная интенсивность характеристического пика в спектре комбинационного рассеяния прямо пропорциональна концентрации продукта (ТХ). Это означает, что суммарная кривая ферментативной реакции (рис. 6, пунктир) позволяет нам оценить концентрацию ТХ в присутствие БТХ, а значит, и оценить активность БХЭ. За одинаковый промежуток времени раствор с высокой активностью БХЭ произведет больше ТХ, значит, спектр ГКР будет более интенсивный. Раствор с низкой активностью БХЭ будет иметь меньшую интенсивность спектра ГКР из-за низкой концентрации ТХ. Для оценки концентрации БХЭ к разным концентрациям фермента был добавлен избыток субстрата 1 мМ ($S>>K_M$, $V=V_{max}$). По истечении 30 минут реакцию останавливали 40-кратным разбавлением и проводили ГКР измерения; независимым методом сравнения являлся метод Эллмана, неразбавленный наработанный продукт измеряли спектрофотометрически.

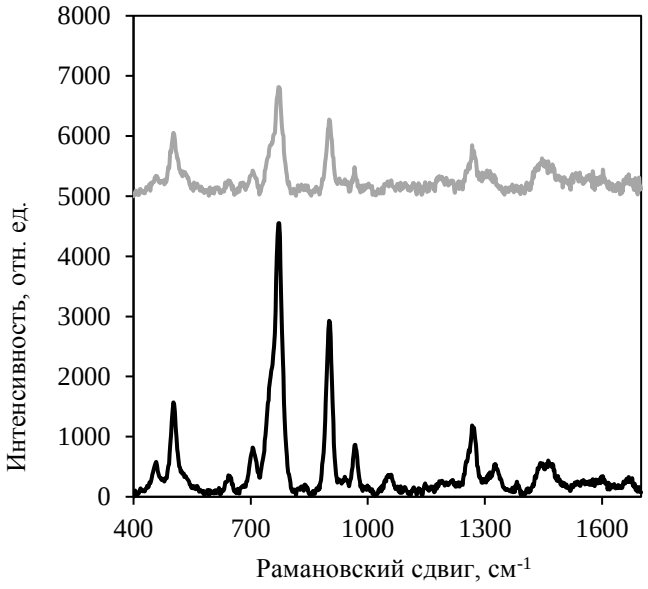

Рисунок 5. ГКР-спектры 50 мкМ ТХ (нижний спектр) и 50 мкМ БТХ (верхний спектр) на серебряных ГКР-подложках. Каждый спектр представляет собой 10 спектров, снятых из разных точек на поверхности подложки и усреднённых.

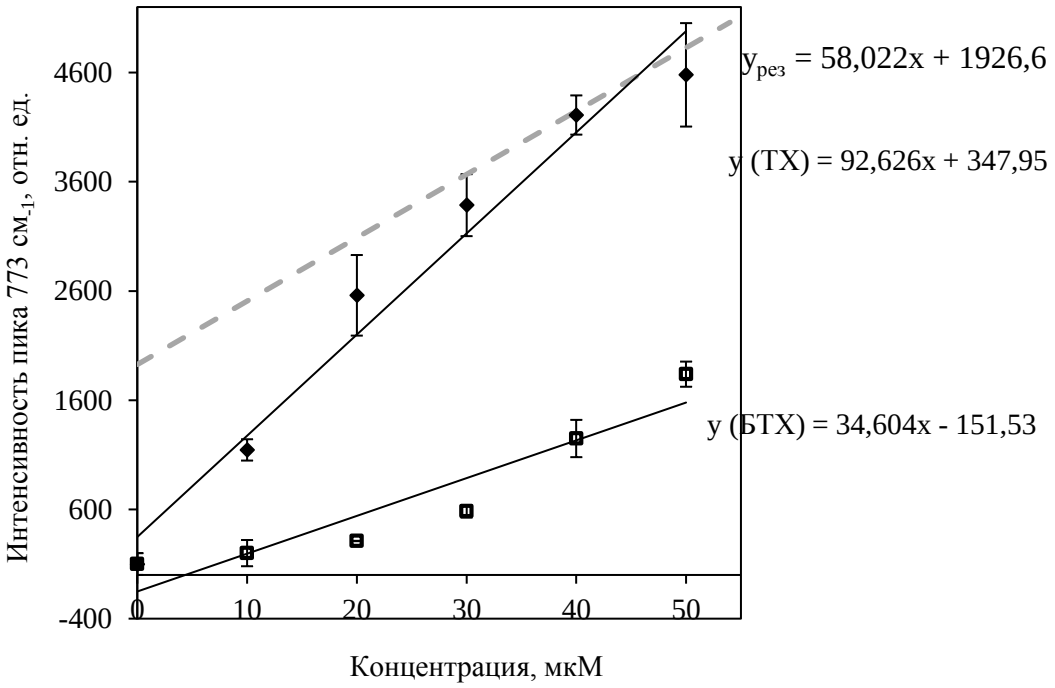

Рисунок 6. Зависимости интенсивностей пика 773 см$^{-1}$ от концентрации ТХ и БТХ на серебряных подложках. Суммарная кривая (пунктир) отображает накопление продукта реакции.

Характер изменения интенсивности спектральных сигналов ТХ при различных концентрациях БХЭ был проанализирован двумя способами: по интенсивности характеристического пика 773 см$^{-1}$ и с помощью метода ПЛС. В первом случае учитывается интенсивность только одного характеристического пика. Нулевой точкой здесь является спектр раствора субстрата 1 мМ бутирилтиохолинхлорида (БТХ) в отсутствие БХЭ. Так как БТХ имеет собственный спектр, градуировочный график выходит не из нуля (рис. 7а). Также стоит обратить внимание, что график имеет два диапазона – большой тангенс угла наклона (11,86) для низких концентраций БХЭ и малый тангенс (3,96) для высоких концентраций БХЭ. Предел обнаружения БХЭ, рассчитанный по начальному участку кривой на рисунке 7а, составляет 33 нг/мл.

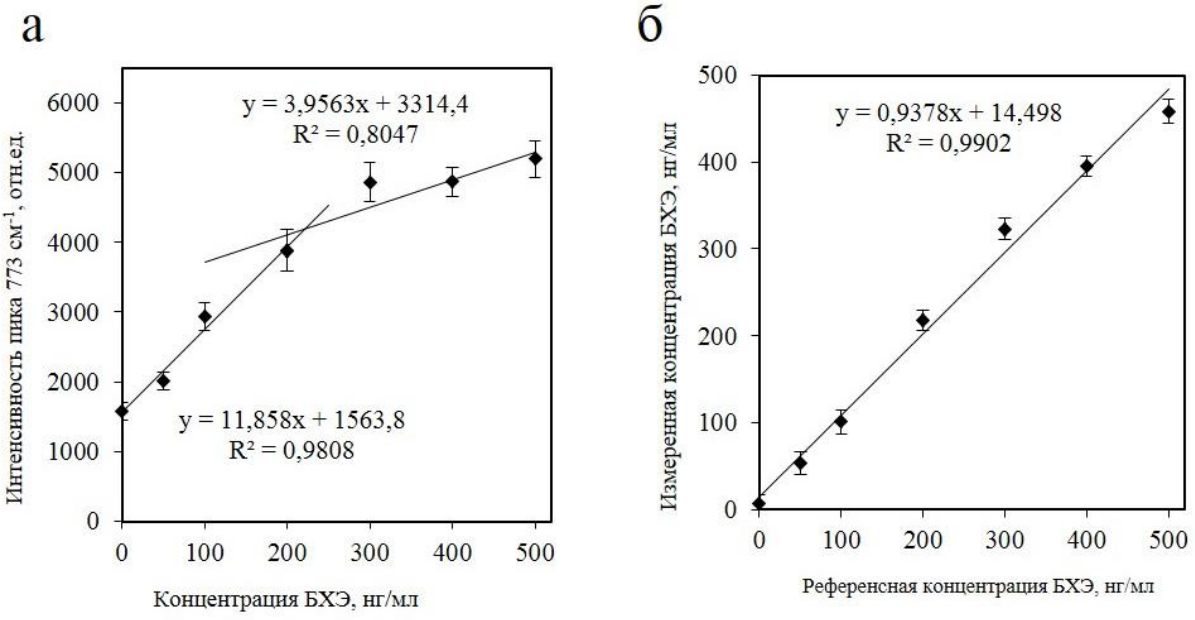

Рисунок 7. Градуировочные зависимости для БХЭ в буферном растворе: а) по интенсивности пика 773 см$^{-1}$ (R^2=0,9808 для начального участка кривой и R^2=0,8047 для высоких концентраций БХЭ); б) ПЛС-регрессия для тех же спектров (R^2=0,9902).

Для построения градуировочной зависимости методом ПЛС использовали значения концентраций, полученные независимым методом (методом Эллмана), в качестве референсных концентраций. В этом случае в отсутствие БХЭ концентрация ТХ равна нулю (рис. 7б). Предел обнаружения БХЭ, рассчитанный с помощью метода ПЛС, составляет 27 нг/мл. ПЛС-график отражает корреляцию между методом спектроскопии комбинационного рассеяния и методом Эллмана, тогда как график по интенсивности пика 773 см$^{-1}$ демонстрирует лишь взаимозависимость активности БХЭ и интенсивности одного пика. Также ПЛС-график имеет более высокий коэффициент корреляции R^2=0,9902 (для графика по пику 773 см$^{-1}$ R^2=0,9808 и 0,8047). В целом оба метода пригодны для оценки активности БХЭ в буферном растворе, о чем свидетельствуют результаты расчета предела обнаружения двумя этими способами.

БХЭ является плазменным белком крови человека. В связи с этим необходимо изучить эффект среды (матрикс-эффект) при измерении активности фермента в реальных образцах. Для спайк-растворов в плазме крови были построены градуировочные кривые двумя способами, как и в случае БХЭ в буфере: по интенсивности пика 773 см$^{-1}$ и с помощью метода ПЛС (рис. 8 а,б). Начальная точка на градуировочной кривой для плазмы находится выше, чем в буфере, так как исходный образец плазмы, в который вносили БХЭ, также содержит фермент. В случае построения градуировочной зависимости по пику 773 см$^{-1}$ наклон кривой равен 4,73, что практически совпадает со

второй частью градуировочной кривой БХЭ в буфере при высоких значениях фермента на рисунке 7а. ПЛС-график для БХЭ также выходит не из нуля, однако тангенс угла наклона кривой в этом случае намного больше, что говорит о лучшей чувствительности метода при обработке спектров методом ПЛС. Как и в случае градуировочной зависимости только по тиохолину, ПЛС-зависимость характеризуется бóльшим коэффициентом корреляции и меньшей погрешностью, так как она учитывает интенсивности всех характеристических пиков ТХ и их взаимное соотношение. Для обеих градуировочных зависимостей наблюдается хорошая корреляция (R^2=0,9538 для графика по пику 773 см$^{-1}$ и R^2=0,9927 для ПЛС-графика). При этом матрикс не влияет на результаты эксперимента. Таким образом, разработанные ГКР-подложки на основе серебряных частиц разного размера могут применяться для определения активности БХЭ в модельных системах и в реальных образцах плазмы крови человека.

ГКР-активные подложки на основе мультиразмерных пластин серебра были применены в анализе ферментов (БХЭ) и продуктов ферментативных превращений (тиохолин) в буфере и плазме крови человека. Неоднородная слоистая структура подложек с частицами серебра разного размера приводит к увеличению сигнала комбинационного рассеяния. Разработанная методика имеет ряд преимуществ: отсутствие дополнительных меток, простота эксперимента и возможность рутинных измерений. Более того, высушивание образца на поверхности подложки позволяет реализовать так называемое «отложенное измерение», то есть не в момент манипуляции с образцом, а позже, вплоть до 20 дней хранения.

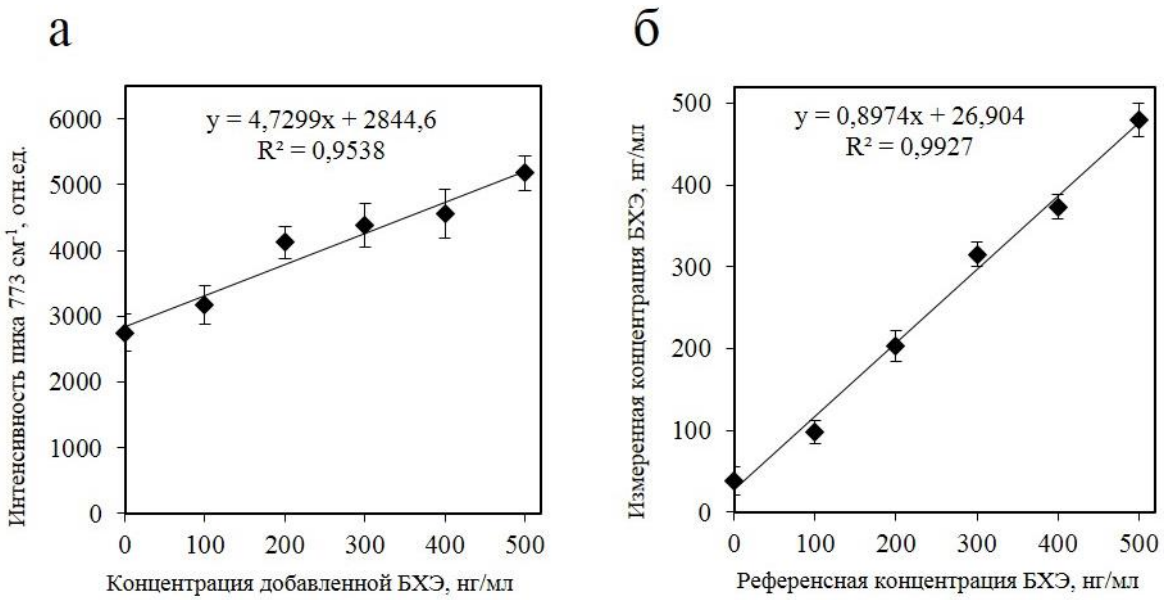

Рисунок 8. Градуировочная зависимость БХЭ в плазме крови человека: а) по интенсивности пика 773 см$^{-1}$ (R^2=0,9538); б) ПЛС-регрессия (R^2=0,9927)

3. Определение гликированного альбумина

ГКР-подложка на основе мультиразмерных пластин серебра была ковалентно модифицирована раствором 4-мФБК. Бороновая группа ковалентно связывается с диолами и образует бороновые эфиры; таким образом, бороновая кислота служит реагентом для определения сахаридов и их фрагментов, в частности, в гликированных белках. Преимуществом именно 4-меркаптофенилбороновой кислоты является наличие тиоловой группы, которая прочно связывается с поверхностью серебра. Для эффективного взаимодействия с этими веществами 4-мФБК должна быть отрицательно заряжена.

Процесс модификации выбранных подложек исследовали путем сравнения спектров ГКР-подложки, обработанной 4-мФБК в буферных растворах с разными величинами pH. Рисунок 9 демонстрирует нормированные на пик 1072 см$^{-1}$ ГКР-спектры 4-мФБК при pH 6,0 и 8,6. Хотя pKa, рассчитанный для 4-мФБК, составляет 8,9, сама кислота ионизируется уже при pH 7,4. Следует отметить, что спектры имеют различия, обусловленные ионизацией. Главные различия наблюдаются при 416, 470, 999, 1021, 1072, 1572 и 1589 см$^{-1}$. Эти изменения могут быть объяснены нарушением симметрии молекулы 4-мФБК и переходом из C_{2v} в C_s из-за ионизации. На вставке рисунка 9 отражены изменения пика 1586 см$^{-1}$ после ионизации. Этот пик отражает значимые изменения в спектре 4-мФБК при связывании и был использован в ранее опубликованной работе (Sun 2014, Analytical Chemistry) для количественного определения фруктозы в буфере и в моче. Наблюдаются очевидные различия в площади, положении максимума, интенсивности и наличия побочного пика (1573 см$^{-1}$). Эти различия подчеркивают разницу между молекулярной HS-Ph-B(OH)$_2$ и ионной HS-Ph-B(OH)$_3^-$ формами 4-мФБК.

Контроль модификации поверхности раствором 4-мФБК проводили посредством сканирования ГКР-подложки по полосе 4-мФБК 1586 см$^{-1}$ как одной из самых интенсивных в спектре. Морфология ГКР-подложки была исследована и соотнесена с интенсивностью сигнала при ГКР-сканированиии (рис. 10а), область сканирования отмечена красным квадратом. Рисунки 10 а,б,в демонстрируют неравномерное распределение интенсивности полосы 1586 см$^{-1}$ из-за гетерогенной морфологии и неоднородного распределения усиления. Соотнесение оптического и ГКР-сканов показывает, что максимальный ГКР-сигнал соответствует возбуждению плазмонов между серебряными пластинами, на неровных краях и границах. Большие плоские частицы почти не имеют усиления ГКР-сигнала, они скорее служат оптическими микроантеннами, которые перенаправляют падающий свет в промежутки между серебряными пластинами. Разработанная методика модификации обеспечивает плотное покрытие поверхности 4-мФБК в отличие от покрытия обычно применяемых в ГКР-анализе золотых наночастиц.

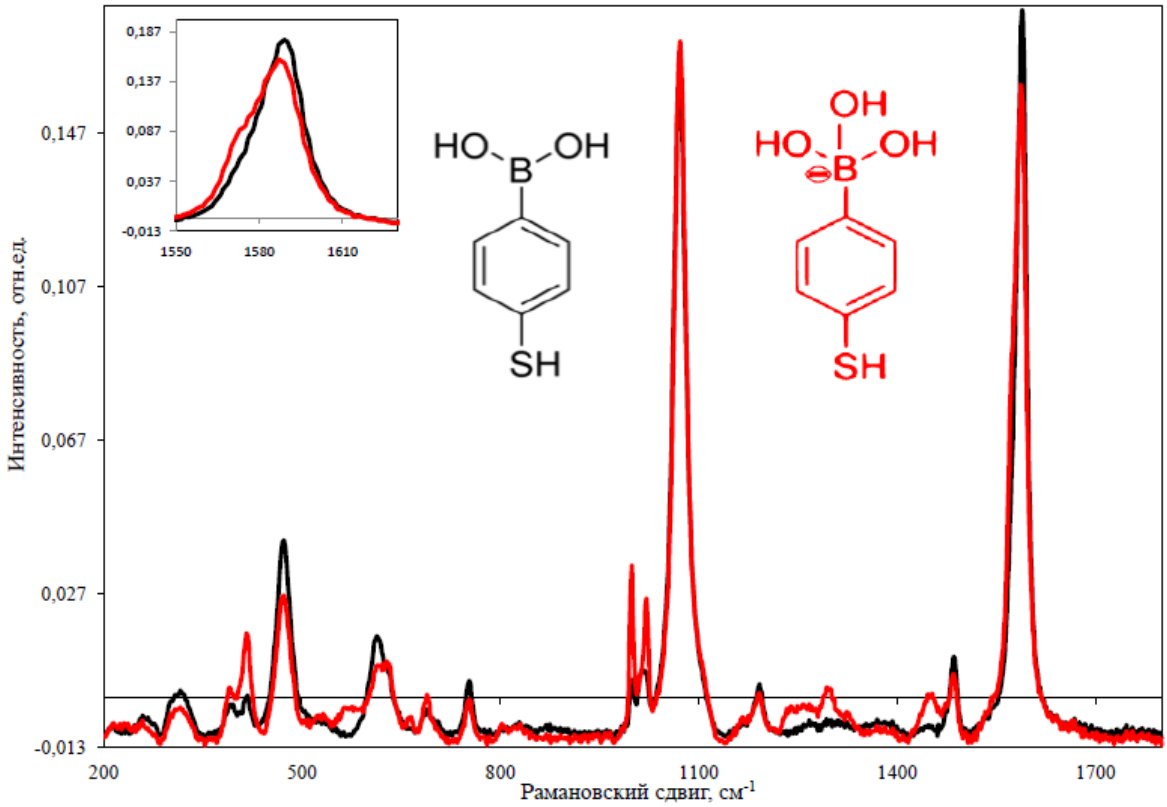

Рисунок 9. Нормированные ГКР-спектры поверхности, модифицированной 4-мБФК при разных pH (черный – pH 6,0, красный – pH 8,6); вставка демонстрирует увеличенный фрагмент спектра в диапазоне 1550-1630 см$^{-1}$

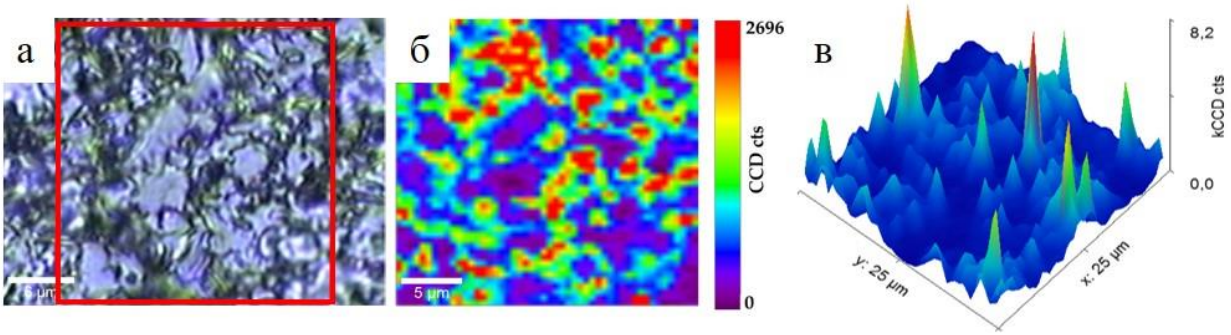

Рисунок 10. Результаты а) оптического и б) ГКР-сканирования подложки, модифицированной 4-мФБК, по полосе 1586 см$^{-1}$; в) трехмерное изображение распределения интенсивности полосы 1586 см$^{-1}$.

ГКР-подложку на основе мультиразмерных серебряных пластин, модифицированную 4-мФБК, использовали в качестве специфического агента для определения сахаридов. Для этого различные сахариды (фруктоза, глюкоза, сахароза, декстран) в виде буферных растворов 1 г/л ковалентно иммобилизовали на

модифицированной ГКР-подложке в течение 1 часа, а затем промывали буфером. Этот метод обеспечивает обнаружение только ковалентно связанных молекул.

Метод главных компонент (МГК) был использован для изучения различий в спектрах сахаридов. На рисунке 11а каждый спектр конкретного сахарида отображается в виде точки. Заметно, что спектры контроля (красные ромбы) достоверно отделяются от спектров всех сахаридов (остальные символы). На рис. 11б показаны нагрузки – ГКР-сдвиги, которые обеспечивают максимальную дисперсию всех спектров в эксперименте. Основные различия, которые помогают отличать спектры сахарида от контроля, лежат в диапазонах 400-500 см$^{-1}$, 950-1100 см$^{-1}$ и 1550-1630 см$^{-1}$. Именно в этих диапазонах наблюдаются также и наиболее сильные колебания 4-мФБК (таблица 2). На рис. 11б почти все спектральные изменения имеют специфическую зигзагообразную форму — это указывает на изменение положения пика после обработки сахаридом. В таблице 2 показано соотнесение КР-колебаний 4-мФБК. Сравнивая рис. 11б и таблицу 2, можно сделать вывод, что отделение спектров сахаридов от спектров контроля обусловлено колебаниями именно 4-мФБК.

Данный эксперимент продемонстрировал возможность использования модифицированной 4-меркаптофенилбороновой кислотой ГКР-подложки для определения диол-содержащих соединений (сахаридов). Пул спектров 4-мФБК, обработанной различными сахаридами, достоверно отделяется от спектров контроля.

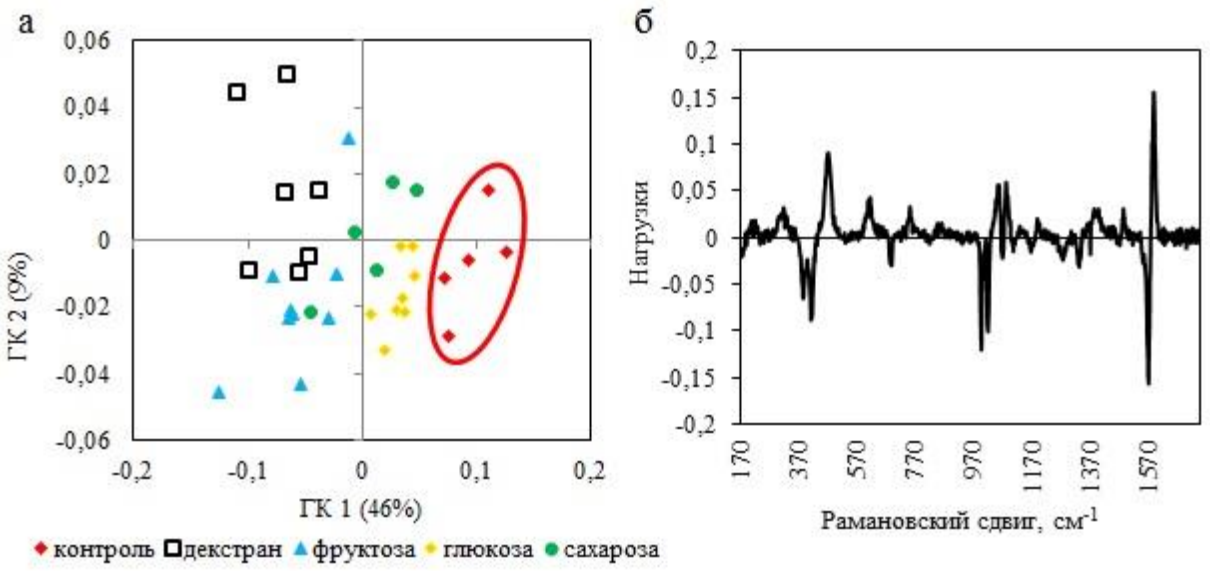

Рисунок 11. а) Общий вид МГК контроля (красные ромбы) и сахаридов (остальные символы). б) График нагрузок в МГК. Различия спектров сахаридов и контроля наблюдаются в диапазонах 400-500 см$^{-1}$, 950-1100 см$^{-1}$ и 1550-1630 см$^{-1}$

Таблица 2. Частоты ГКР-колебаний молекулы 4-мФБК

Положение максимума, $см^{-1}$	Соотнесение	Пояснение
416	7a; $\beta_{CCC} + \nu_{CS}$	«дыхательное» колебание бензольного кольца в плоскости в сочетании с валентным колебанием C-S
470	16b; $\gamma_{CCC} + \beta_{OBO}$	деформационное колебание вне плоскости
999	12; β_{CCC}	«дыхательное» колебание бензольного кольца
1021	18a; β_{CH}	деформационное колебание C-H в плоскости бензольного кольца
1072	1; $\beta_{CCC} + \nu_{CS}$	«дыхательное» колебание бензольного кольца в плоскости в сочетании с валентным колебанием C-S
1572	8b; ν_{CC}	не полностью симметричные валентные колебания бензольного кольца
1589	8a; ν_{CC}	полностью симметричные валентные колебания бензольного кольца

Была изучена возможность определения гликированного альбумина (ГА) на фоне человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Для этого смеси ГА и ЧСА в буфере ковалентно иммобилизовали на модифицированную 4-мФБК ГКР-подложке. В образцах варьировали долю ГА, при этом держали постоянной общую концентрацию белка (ГА+ЧСА) на уровне физиологической – 40 г/л. Раствор ЧСА 40 г/л являлся контролем к эксперименту (0 мкМ ГА). Полученные спектры этих растворов анализировали с применением метода проекции на латентные структуры (ПЛС) (рис. 12). Установлено, что за линейность изменения доли ГА в образце отвечают КР-сдвиги, соответствующие колебаниям 4-мФБК (диапазоны 250-450 $см^{-1}$, 1000-1100 $см^{-1}$ и 1600-1650 $см^{-1}$). На рисунке 12 показана ПЛС-регрессия для ГА, с помощью которой можно рассчитать значение ГА в неизвестных образцах (рис. 12, черные ромбы). Контрольный раствор (40 г/л ЧСА) представляет точку (0;0) на рис. 12. Полученную модель ПЛС-регрессии использовали для измерения значения ГА в плазме крови трех доноров. Плазму от трех разных здоровых доноров разбавляли в 4 раза буфером, чтобы создать необходимый pH, и наносили на поверхность серебряной ГКР-подложки аналогично градуировочным растворам. Каждая красная точка (рис. 12) обозначает отдельного донора. Результатом такого анализа стало численное значение ГА, определенное для каждого донора (табл. 3, первый столбец). Поскольку образцы перед измерением разбавляли буфером в 4 раза, истинное значение в плазме рассчитывали методом умножения на коэффициент 4 (табл. 3, второй столбец). Результаты измерений, полученные методом ГКР, согласуются с результатами независимой лаборатории ИНВИТРО (табл. 3, третий столбец).

Данный эксперимент показал возможность измерения ГА в плазме крови в широком диапазоне концентраций – до 480 мкМ, что позволяет определять норму и патологию согласно стандартам ИНВИТРО (170-285 мкМ). Разработанная методика определения концентрации гликированного альбумина позволяет выявлять предрасположенность к нарушению углеводного обмена. Разработанная методика требует малого объема образца – около 15 мкл – для измерения в четырех повторах.

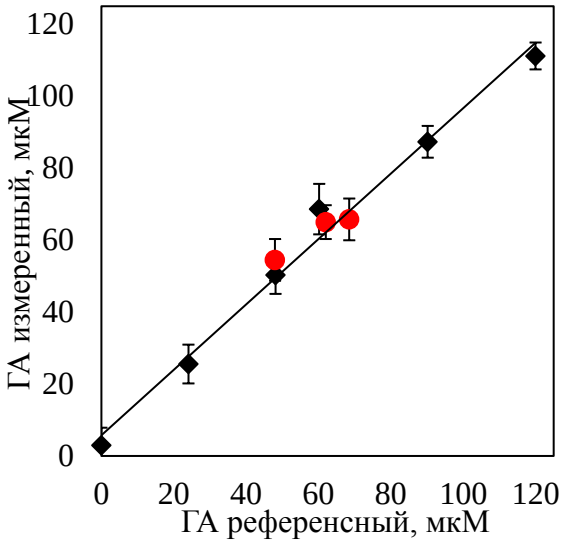

Рисунок 12. ПЛС-регрессия гликированного альбумина. Черные ромбы отображают модель, построенную по спектрам смесей ГА+ЧСА. Значения ГА доноров (красные круглые маркеры) были предсказаны на основании ПЛС-модели в программе The Unscrambler X 10.3.

Таблица 3. ГКР-измерения и референсные значения ГА в плазме человека

Количество в образце, мкМ	Количество в плазме, мкМ	Значение ИНВИТРО, мкМ
62±5	248±20	260
69±6	276±24	263
48±6	192±24	218

4. ГКР-измерения с использованием золей наночастиц серебра

Золи наночастиц (НЧ) серебра получали восстановлением нитрата серебра разными концентрациями гидроксиламина гидрохлорида (ГГ). Полученные НЧ были охарактеризованы спектрофотометрически по ряду параметров (рис. 13, табл. 4) и измерен дзета-потенциал. Параметр λ_{max} позволяет определить размер наночастиц используя теорию Ми. Расчет концентрации наночастиц (шт/мл) проводили из общих соображений, пользуясь известной плотностью серебра (10,5 г/см^3) и рассчитанными размерами.

Параметр A_{500} свидетельствует о наличии крупных агрегатов наночастиц – чем больше абсолютное значение параметра, тем выше концентрация агрегатов.

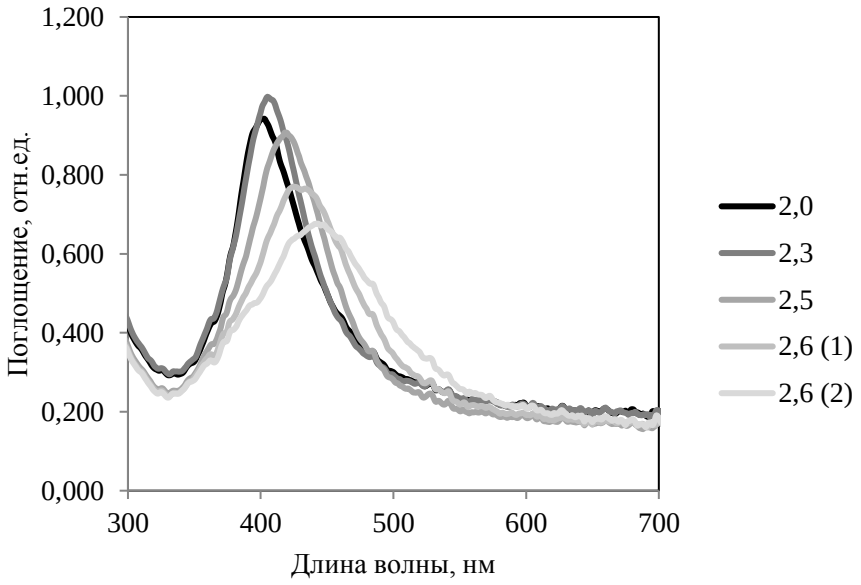

Рисунок 13. Спектры поглощения наночастиц серебра в зависимости от концентрации ГГ в реакционной смеси (от 2,0 до 2,6 мМ ГГ)

Таблица 4. Характеристики полученных наночастиц серебра в зависимости от концентрации ГГ в реакционной смеси

ГГ, мМ	λ_{max}, нм	A_{max}	A_{500}	d, нм	Концентрация, ч-ц/мл	КУ
2,0	402,9	0,9910	0,0743	24	$1{,}4\cdot10^{15}$	$3{,}9\cdot10^{8}$
2,3	406,9	1,0107	0,0667	32	$6{,}0\cdot10^{14}$	$3{,}2\cdot10^{8}$
2,5	416,6	0,8781	0,1168	45	$2{,}2\cdot10^{14}$	$2{,}4\cdot10^{8}$
2,6 (1)	428,0	0,7075	0,2025	57	$1{,}0\cdot10^{14}$	$1{,}7\cdot10^{8}$
2,6 (2)	440,6	0,5678	0,2893	67	$6{,}5\cdot10^{13}$	$1{,}4\cdot10^{8}$

Поверхность частиц заряжена отрицательно за счет сорбции на ней хлорид-аниона, находящегося в избытке в реакционной смеси. Дзета-потенциал полученных частиц стабилен и равен -40 мВ. Для реализации ГКР-эффекта необходимо агрегировать наночастицы. В качестве агрегирующего агента был выбран ацетат натрия, концентрация которого была оптимизирована с целью разработки метода получения образцов для анализа БХЭ. Оптимальной была выбрана концентрация 1 М.

Полученные серебряные НЧ были использованы в качестве ГКР-активного субстрата для количественного определения тиохолина. Спектры ТХ в концентрациях 10 нМ–100 мкМ, полученные данным образом с использованием НЧ размером 24 нм,

представлены на рисунке 14. В результате измерений наблюдается рост характеристических пиков ТХ – 500, 773 и 899 см$^{-1}$ – в диапазоне 10-1000 нМ. Характеристический пик ацетата натрия 929 см$^{-1}$ зависит антибатно от концентрации тиохолина на всем диапазоне концентраций. При более высоких концентрациях (10 и 100 мкМ ТХ) наблюдается резкое падение сигнала ГКР пика 773 см$^{-1}$, что можно объяснить модифицированием поверхности НЧ и перезарядкой поверхности. Постепенное добавление тиохолина к коллоидному раствору вызывает вытеснение отрицательно заряженных стабилизирующих ионов тиохолином за счет образования ковалентной связи, приводя к полной перезарядке поверхности и увеличению абсолютного значения дзета-потенциала.

Такой характер взаимодействия тиохолина с наночастицами позволяет использовать ГКР-методику для обнаружения ТХ в диапазоне 5–1000 нМ, то есть до полной перезарядки поверхности НЧ. Диапазон количественного определения ТХ – от 5 до 500 нМ (рис. 15а) – представляет собой кривую с насыщением. Для выбранного размера НЧ 24 нм был рассчитан предел обнаружения по начальному линейному участку градуировочной кривой (рис. 15б). Предел обнаружения составляет 5,4 нМ, чувствительность определения – 27 отн.ед./1 нМ. Это характеризует определение тиохолина с помощью серебряных наночастиц как надежную и чувствительную методику.

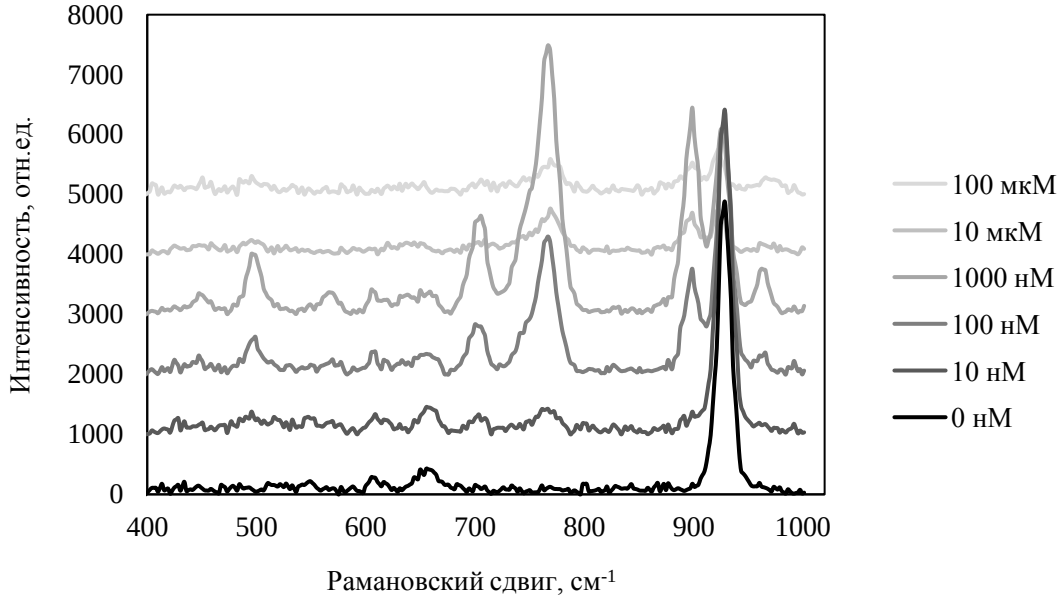

Рисунок 14. ГКР-спектры тиохолина в концентрациях 10 нМ-100 мкМ, полученные с использованием серебряных наночастиц 24 нм. Контрольный спектр – без тиохолина (черный).

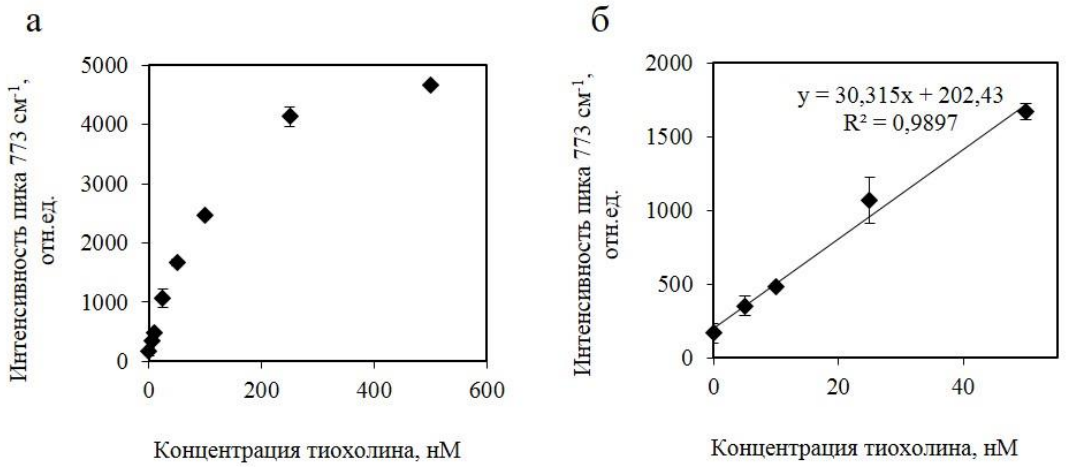

Рисунок 15. Зависимость интенсивности ГКР-пика 773 см$^{-1}$ от концентрации ТХ в диапазоне: а) 0-500 нМ, б) 0-50 нМ, для наночастиц 24 нм.

Для выбранного размера наночастиц 24 нм была исследована возможность количественного определения фермента БХЭ методом спектроскопии ГКР. Чувствительность определения БТХ на основе измерения ГКР-спектров намного ниже чувствительности определения ТХ благодаря наличию негидролизованной связи C–S, вследствие чего БТХ не может связаться ковалентно с поверхностью НЧ как ТХ (рис. 16). Серый спектр (спектр БТХ) отражает спектральную картину в начальный момент времени t=0 мин, когда продукт еще не успел образоваться. Черный спектр (спектр ТХ) отражает спектральную картину при t=30 мин, когда весь субстрат конвертировался в продукт (при условии полной конверсии субстрата). Из рисунка видно, что спектры имеют разную интенсивность и соотношение характеристических пиков. Главные отличия относятся к характеристическим пикам 773, 900, 500, 708 см$^{-1}$. Как и в случае подложек, суммарная интенсивность ГКР-спектров реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации тиохолина и позволяет нам оценить активность БХЭ.

Так как интенсивность пика продукта ферментативной реакции – ТХ – зависит от его концентрации и присутствие субстрата (БТХ) в выбранном разведении не мешает определению ТХ, можно количественно оценить концентрацию БХЭ используя интенсивность пика 773 см$^{-1}$. Для этого к разным концентрациям фермента был добавлен избыток субстрата ($S >> K_M$, $V=V_{max}$). По истечении 30 минут реакцию останавливали 10000-кратным разбавлением и проводили ГКР измерения; независимым методом сравнения являлся метод Эллмана, неразбавленный наработанный продукт измеряли спектрофотометрически.

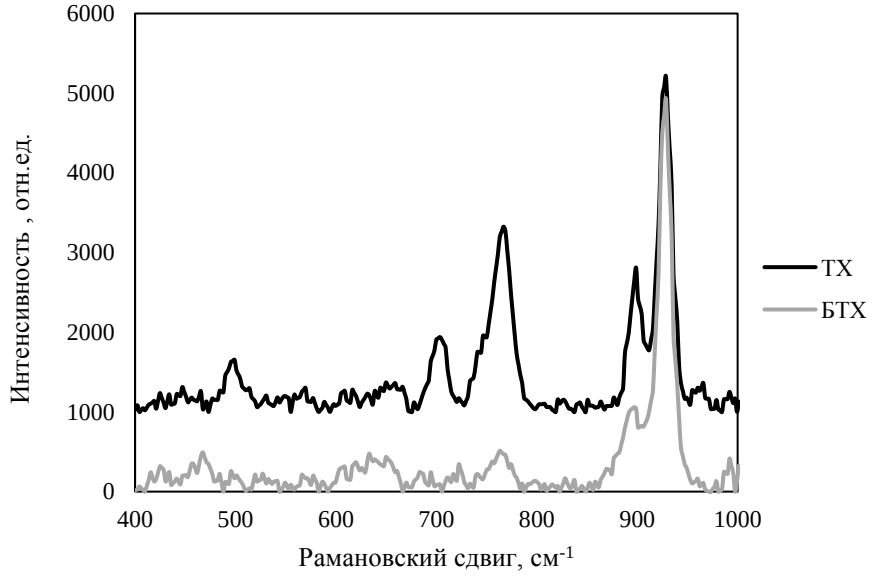

Рисунок 16. ГКР-спектры 100 нМ ТХ (верхний спектр) и 100 нМ БТХ (нижний спектр), полученные с использованием НЧ серебра 24 нм.

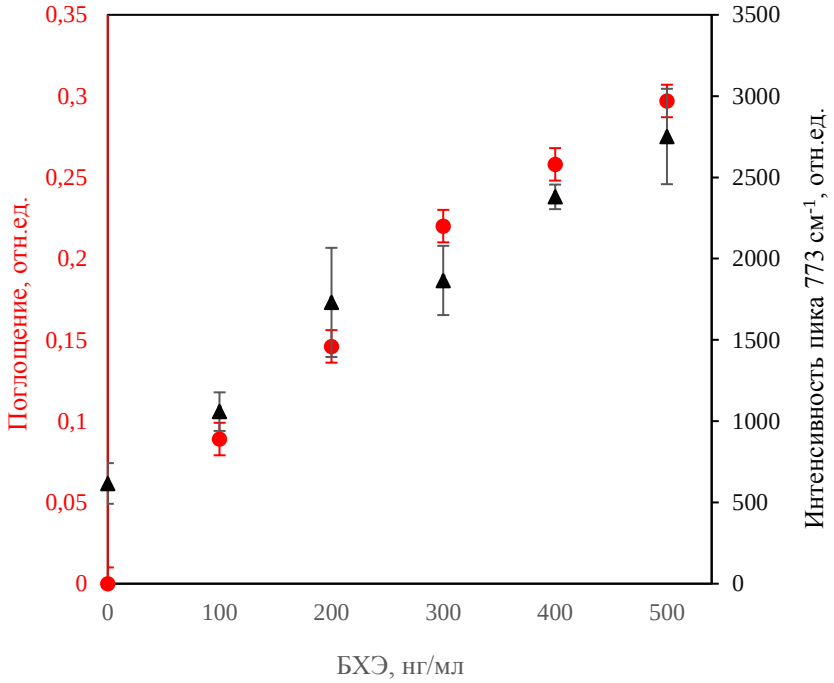

Рисунок 17. Градуировочные зависимости интенсивности поглощения (красные круглые маркеры) и сигнала ГКР (черные треугольники) от концентрации БХЭ, полученные методом Эллмана и методом ГКР с использованием золя серебряных наночастиц, соответственно.

Интенсивность пика 773 см$^{-1}$ пропорциональна концентрации фермента БХЭ (рис. 17, черная кривая), а также коррелирует со спектрофотометрическим измерением концентрации фермента (красная кривая). Согласно полученным результатам, предел

обнаружения БХЭ в модельной системе составляет 74 нг/мл. Данный график говорит о том, что метод спектроскопии ГКР позволяет количественно определять концентрацию фермента с аналитическими характеристиками, сравнимыми с известными методами (Эллмана).

Все пять размеров наночастиц были протестированы раствором 4-мФБК в концентрации 1 нг/мл для экспериментального определения коэффициента усиления. Коэффициент усиления (КУ) был рассчитан по формуле:

$$EF = \frac{I_{SERS}/I_{Raman}}{C_{SERS}/C_{Raman}}$$

Сигнал ГКР 4-мФБК относили к КР-сигналу спиртового раствора 4-мФБК в концентрации 10 мг/мл. Показано, что абсолютные значения КУ обратно пропорциональны размеру наночастиц серебра. То есть, чем больше диаметр наночастиц, тем меньшее усиление ГКР-сигнала для них характерно. При нормировании полученных данных на число наночастиц в мл золя (табл. 4), направление зависимости изменяется: с увеличением размеров наночастиц увеличивается коэффициент усиления. Это связано с количеством частиц серебра в 1 мл каждого препарата. Так как для синтеза всех наночастиц берется одинаковая массовая концентрация серебра, то для наночастиц меньшего размера образуется большее число частиц/мл. Разница концентраций наночастиц/мл в линейке размеров 24-67 нм достигает полутора порядков. Такой характер зависимости КУ от размеров наночастиц согласуется с опубликованными исследованиями по КУ серебряных и золотых наночастиц. Но с точки зрения практического применения описанных наночастиц, целесообразно использовать наночастицы диаметром 24 нм, так как они обеспечивают наибольшие абсолютные значения интенсивности ГКР-сигналов.

Использование наночастиц в качестве ГКР-активного субстрата для количественного определения ТХ позволило расширить диапазон определяемых концентраций и снизить предел обнаружения до 5 нМ. Использование наночастиц позволяет количественно определять концентрацию БХЭ с аналитическими характеристиками, сравнимыми со спектрофотометрией. Помимо улучшения аналитических характеристик методики, использование наночастиц в ГКР-анализе позволило значительно сократить время проведения анализа до 2 минут на образец. Применение НЧ не требует высушивания и может быть использовано в проточных микрофлюидных системах.

ВЫВОДЫ

1. Создана и охарактеризована ГКР-подложка на основе мультиразмерных серебряных пластин. Изучена стабильность подложки, а также воспроизводимость ГКР сигналов тиохолина (ТХ) и 4-меркаптофенилбороновой кислоты (4-мФБК).
2. Разработанная ГКР-подложка на основе мультиразмерных пластин серебра была использована для количественного определения тиохолина с применением спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. Линейный диапазон определяемых концентраций тиохолина составляет от 5 до 50 мкМ. Также показана возможность анализа тиохолина в присутствии бутирилтиохолина.
3. Получены оригинальные ГКР-подложки для определения концентрации БХЭ в синтетической среде (буфере) и реальной (плазма крови человека). Изучена стабильность полученных систем. Разработанная методика позволяет реализовывать так называемые отложенные измерения – измерение не в момент нанесения и манипуляций с образцом – вплоть до 20 дней.
4. Модификация разработанной ГКР-подложки раствором 4-мФБК позволяет детектировать диол-содержащие соединения (в том числе сахариды и гликированный альбумин) в модельной системе и в плазме крови человека. Разработанная методика определения концентрации гликированного альбумина позволяет оценивать патологию и норму и выявлять предрасположенность к нарушению углеводного обмена.
5. Получены и охарактеризованы ГКР-субстраты на основе золей наночастиц серебра. Разработаны научно-методические основы определения тиохолина с использованием наночастиц серебра для медицинских и медико-токсикологических целей методом спектроскопии ГКР. Диапазон определяемых концентраций тиохолина составляет от 5 до 500 нМ. Предел обнаружения тиохолина составляет 5 нМ. Использование наночастиц в качестве ГКР-субстрата позволило достичь низких пределов обнаружения, а также значительно сократить время анализа.
6. Для наночастиц серебра различных размеров определен коэффициент усиления ГКР-сигнала 4-мФБК. Показано, что для всех рассмотренных наночастиц коэффициент усиления находится в диапазоне $1 \cdot 10^8$-$4 \cdot 10^8$ в зависимости от условий получения золя.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Список статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus и Web of Science:

1. **Natalia Nechaeva**, Taisiya Prokopkina, Galina Makhaeva, Elena Rudakova, Natalia Boltneva, Christophor Dishovsky, Arkadiy Eremenko, Ilya Kurochkin. Quantitative Butyrylcholinesterase Activity Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // **Sensors and Actuators: B. Chemical**. – 2018. – V. 259. – P. 75-82. (Scopus, Web of Science IF 7,1)

2. Fabelinsky, V.I., Kozlov, D.N., Orlov, S.N., Polivanov, Y.N., Shcherbakov, I.A., Smirnov, V.V., Vereschagin, K.A., Arzumanyan, G.M., Mamatkulov, K.Z., Afanasiev, K.N., Lagarkov, A.N., Ryzhikov, I.A., Sarychev, A.K., Budashov, I.A., **Nechaeva, N.L.**, Kurochkin, I.N. Surface-enhanced micro-CARS mapping of a nanostructured cerium dioxide/aluminum film surface with gold nanoparticle-bound organic molecules // **Journal of Raman Spectroscopy**. – 2018. – V. 49 (7). – P. 1145-1154. (Scopus, Web of Science IF 2,8)

3. Victor I. Fabelinsky, Dimitrii N. Kozlov, Yury N. Polivanov, Valery V. Smirnov, Sofia N. Bokova-Sirosh, Elena D. Obraztsova, Grigory M. Arzumanyan, Kahramon Z. Mamatkulov, Konstantin N. Afanasiev, Irina A. Boginskaya, Igor A. Budashov, **Natalia L. Nechaeva**. Laser intensity limits in surface-enhanced linear and nonlinear Raman micro-spectroscopy of organic molecule/Au-nanoparticle conjugates // **Journal of Raman Spectroscopy**. – 2019. – V. 50. – P. 1311-1320. (Scopus, Web of Science IF 2,8)

4. A. K. Sarychev, I. V. Bykov, I. A. Boginskaya, A. V. Ivanov, I. N. Kurochkin, A. N. Lagarkov, **N. L. Nechaeva**, I. A. Ryzhikov. Metal-dielectric optical resonance in metasurfaces and SERS effect // **Optical and Quantum Electronics**. – 2020. – 52. – 26. (Scopus, Web of Science IF 1,8)

5. **Nechaeva N.L.**, Boginskaya I.A., Ivanov A.V., Sarychev A.K., Eremenko A.V., Ryzhikov I.A., Lagarkov A.N., Kurochkin I.N. Multiscale flaked silver SERS-substrate for glycated human albumin biosensing // **Analytica Chimica Acta**. – 2020. – V. 1100. – P. 250-257. (Scopus, Web of Science IF 5,9)

Публикации по докладам на конференциях в рецензируемых научных изданиях:

1. Tepanov, A.A., **Nechaeva, N.L.**, Prokopkina, T.A., Kudrinskiy, A.A., Kurochkin, I.N., Lisichkin, G.V. Ag electrode modified with polyhexamethylene biguanide stabilized silver nanoparticles: A new type of SERS substrates for detection of enzymatically generated thiocholine // **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. – 2015. – 98(1). – 012002. (Scopus, Web of Science IF 0,5)

2. Сарычев А.К., Иванов А.В., Быков И.В., Богинская И.А., Лагарьков А.Н., Рыжиков И.А., **Нечаева Н.Л.**, Курочкин И.Н., Бондаренко А.В., Гирель К.В. Гигантское комбинационное рассеяние на резонансной кремний-серебряной метаповерхности // **Нанофотоника**, спецвыпуск «ФОТОН-ЭКСПРЕСС-НАУКА 2019». – 2019. – №6. – С. 271-272. (РИНЦ IF 0,05)

Главы в сборниках:

1. Еременко А. В., **Нечаева Н. Л.**, Курочкин И. Н. «Биоаналитические системы на основе холинэстераз для определения фосфорорганических соединений» в монографии «Фосфорорганические нейротоксины» под редакцией чл.-корр. Варфоломеева С. Д. и проф. Ефременко Е. Н. (Москва, РИОР, 2020).

2. Kurochkin Ilya N., Eremenko Arkadiy V., Evtushenko Evgeniy G., **Nechaeva Natalia L.**, Durmanov Nikolay N., Guliev Rustam R., Ryzhikov Ilya A., Boginskaya Irina A., Sarychev Andrey K., Ivanov A.V., Lagarkov Andrey N. «SERS for Bacteria, Viruses, and Protein

Biosensing» в книге «Macro, Micro, and Nano-Biosensors – Potential Applications and Possible Limitations» под редакцией M. Rai, A. Reshetilov, Y. Plekhanova, A.P. Ingle (Springer International Publishing, 2021).

Тезисы докладов научных конференций

1. **Nechaeva N.L.**, Budashov I.A., Kurochkin I.N. Gold nanoparticles for glycated proteins SERS quantification // XII International Conference on Nanostructured Materials NANO 2014 – Moscow, Russia. – 2014. – P. 788.

2. **Nechaeva N.L.**, Budashov I.A., Kurochkin I.N. Raman spectroscopy in assay of glycated proteins // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни» – Москва, Россия. – 2014. – P. 165.

3. **Nechaeva N.L.**, Prokopkina T.A., Kurochkin I.N. SERS-platform for detection of marker proteins and enzymatic activity // International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications" – Moscow region, Avantel Club Istra. – 2015. – P. 95.

4. **Nechaeva N.L.**, Kurochkin I.N. Surface-enhanced Raman spectroscopy for enzymatic activity detection // "Saratov Fall Meeting – SFM’15" – Saratov. – 2015. – P. 63.

5. **Nechaeva N.L.**, Kurochkin I.N. Cholinesterase activity determination by surface-enhanced Raman spectroscopy // "Biophysics Biophotonics Biotechnology" – Moscow, Russia. – 2016. – P. 16.

6. **Nechaeva N.L.**, Kurochkin I.N. Multivariate data analysis in biomedical spectroscopy: cholinesterase activity determination // "Tenth Winter symposium on chemometrics". – Samara, Russia. – 2016. – P. 33.

7. **Nechaeva N.L.**, Kurochkin I.N. New SERS-substrate for Cholinesterase Detection // "First European/10th German BioSensor Symposium" – Potsdam, Germany. – 2017. – P. 70.

8. **Natalia L. Nechaeva**. Surface-enhanced Raman sensors for protein detection. 11-th International Conference "BIOCATALYSIS-2017: Fundamentals and Applications". – Avantel Club Istra, Московская область, Россия. – 2017. – P. 113.

9. **Нечаева Н. Л.** Количественное определение гликированного альбумина методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни.». – Москва, Россия. – 2019. – P. 468.

10. **N. Nechaeva**, I. Boginskaya, I. Kurochkin. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Glycated Albumin Detection. 12-th International Conference "BIOCATALYSIS-2019". – Leonid Sobolev board. – 2019. – P. 95.

11. **N. Nechaeva**, I. Boginskaya, I. Kurochkin. Glycated Blood Proteins Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. 2-nd European Biosensor Symposium. – Florence, Italy. – 2019. – P. 71.