

02

## Оптические методы оценки состава комбинированных материалов на основе бактериальной биоцеллюлозы

© Е.В. Тимченко<sup>1,2</sup>, О.О. Фролов<sup>1</sup>, Е.В. Писарева<sup>1</sup>, М.С. Алехин<sup>1</sup>, П.Е. Тимченко<sup>1,2</sup>, М.Ю. Власов<sup>1,2</sup>, Н.А. Кленова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

<sup>2</sup> Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

e-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

В окончательной редакции 20.06.2024 г.

Принята к публикации 30.10.2024 г.

Представлены результаты исследования состава комбинированных материалов на основе бактериальной целлюлозы (БЦ) с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и метода конфокальной флуоресцентной микроскопии. На основе дисперсионного анализа был разработан алгоритм идентификации исследуемых материалов на основе БЦ с помощью дерева решений. Результаты исследований подтверждены микроскопическим анализом.

**Ключевые слова:** бактериальная биоцеллюлоза, рамановская спектроскопия, микроскопический анализ, спектры комбинационного рассеяния, алгоритм идентификации.

DOI: 10.61011/OS.2024.11.59493.6403-24

### Введение

Растущий спрос на материалы бактериальной целлюлозы на биологической основе привлекает все больше внимания к их применению в биомедицинских областях. Комбинированные материалы на основе бактериальной целлюлозы (БЦ) способствуют реэпителизации, стимулируют клеточную адгезию, пролиферацию, миграцию и дифференцировку, что приводит к более быстрому заживлению ран в регенеративной медицине [1]. В то же время приживаемость таких биоматериалов напрямую зависит от их состава. Поэтому актуальной задачей является контроль состава комбинированных материалов на основе бактериальной биоцеллюлозы при их изготовлении.

Такие оперативные, неинвазивные оптические методы анализа биоматериалов, как микроскопический анализ [2], ИК спектроскопия [3] и спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия), нашли широкое применение в биомедицине [4].

В литературе отсутствует информация по исследованию комбинированных материалов на основе БЦ и их анализа с помощью комплекса оптических методов исследований.

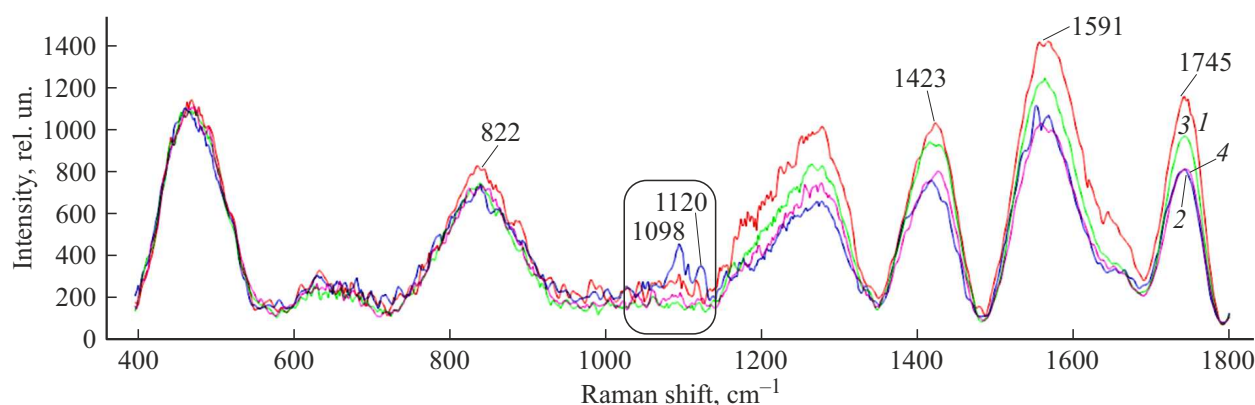
Целью данной работы является применение комплекса оптических методов для оценки состава комбинированных материалов на основе бактериальной биоцеллюлозы.

### Материалы и методы

В работе была исследована бактериальная целлюлоза и комбинированные материалы на её основе, включающие в состав различные добавки, такие как пектин, 1,3-диокил-4-метилимидозалий бромид. Условно все исследуемые образцы были разделены на 4 основные группы: 1 — гель БЦ с содержанием пектина; 2 — гель БЦ без содержания пектина; 3 — 1,3-диокил-4-метилимидозалий бромид БЦ с добавлением пектина; 4 — 1,3-диокил-4-метилимидозалий бромид БЦ без добавления пектина.

Для получения БЦ культивировали ацетобактерии, полученные из культуры *Medusomycesgisevii* путем клонирования с посевом из разведения 1:100000 на агаризованную среду HS (Hestrin Schramm, 1954). Гели БЦ промывали проточной водой и помещали в 0.1N раствор NaOH на сутки при комнатной температуре для удаления оставшихся клеток бактерий. Промывку водой повторяли и помещали в 0.5% раствор HCl также на сутки при комнатной температуре, после чего снова промывали проточной, затем дистиллированной водой до нейтрального значения pH и хранили в 70% этиловом спирте в пластиковой посуде при температуре 25–27°C. Композиты на основе гелевых масс были получены путем синтеза производных имидазолия. Гели замачивали в 250 µg/ml ДМСО растворах производных имидазолия не меньше 24 h и далее использовали для исследования антибиотических свойств.

Спектральные характеристики исследуемых биоматериалов изучались методом спектроскопии комбинаци-



**Рис. 1.** Усредненные спектры КР исследуемых групп (спектры усреднялись в пределах всех спектров группы): группы 1 (красная линия) и 2 (синяя линия), группы 3 (зеленая линия) и 4 (фиолетовая линия).

онного рассеяния, который был реализован с помощью экспериментального стенда, подробно описанного в работе [5]. Использовался лазер с длиной волны 785 nm. Разрешение спектра  $1.5 \text{ cm}^{-1}$ . Математическая обработка спектров КР проводилась с помощью программы RS Tool при помощи линейного дисперсионного анализа.

Метод конфокальной микроскопии был реализован с помощью стенда на базе конфокального оптического микроскопа Olympus IX 71 (Япония) и лазерного комбайна фирмы ANDOR. Стенд обеспечивал два режима работы: режим конфокальной микроскопии в видимом свете и режим лазерной флуоресценции. В качестве источника излучения использовалась галогеновая лампа [6].

## Результаты

На рисунке представлены усредненные спектры КР исследуемых групп (спектры усреднялись в пределах всех спектров группы).

Анализ рис. 1 показывает, что в спектральном диапазоне от  $800\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$  наблюдаются изменения интенсивности основных линий КР, характерных для биоцеллюлозы. Видно, что линия  $822 \text{ cm}^{-1}$ , соответствующая пектину, определяется на спектрах КР в группах 1, 3 (группы с содержанием пектина). Линии КР  $\sim 1098$ ,  $1120$ ,  $1180\text{--}1275$ ,  $1423$  и  $1745 \text{ cm}^{-1}$ , соответствующие колебаниям целлюлозы, наиболее выражены в образцах БЦ без добавления пектина, что, видимо, связано с тем, что соотношение линий КР, соответствующих пектину и целлюлозе, меняется в зависимости от состава исследуемых групп. Причем линия КР  $\sim 1098 \text{ cm}^{-1}$  обнаруживается только в образцах БЦ без содержания пектина. Данная линия довольно высокочувствительна к ориентации микрофибрилл вдоль волокна, поэтому она имеет свойство растягиваться по амплитуде на приведенных спектрах.

Дальнейшая математическая обработка проводилась с помощью LDA анализа и дерева решений в программе RS-Tool. Для повышения информативности полученных спектров комбинационного рассеяния был произведен линейный дисперсионный анализ спектров, который состоит из разложения их на спектральные линии. При моделировании подбирались интенсивность линии от 0 до локального максимума спектра в области  $x_0$ . Переменная  $a$  являлась критерием амплитуды линий, которая зависит от значений независимых регрессоров  $dx$  и  $x_0$ , определяющих начальные условия анализа. Среднее значение коэффициента детерминации спектра от исходного в области  $400\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$  для всех 74 спектров составило  $R^2 = 0.99$ . Рассчитанное значение  $\text{accuracy} = 92.0\%$ ,  $\text{precisionscore} = 36.36\%$ . Дискриминационная адекватность метода характеризуется значением  $\text{AUC} = 0.95$ .

На рис. 2 представлены результаты LDA-сравнения групп образцов. Дискриминантная функция LD-1 описывает дисперсию на  $77.74\%$ . Положительные значения LD-1 характерны для спектров КР образцов геля бактериальной целлюлозы без содержания пектина, а также 1,3-диокил-4-метилимидозалий бромид БЦ без добавления пектина. Области групп 2 и 4 имеют одно пересечение  $\sim 0.5$  из рис. 2. Области групп 1 и 3 имеют области пересечения в  $\sim -0.87$  из рис. 2. Исследуемые группы с пектином и без различаются с помощью LDA-анализа. Основные различия между исследуемыми группами определяются следующими основными линиями КР:  $\sim 1745$ ,  $1591$  и  $1092 \text{ cm}^{-1}$ .

С учетом проведенного дисперсионного анализа и использованием двух из выше указанных линий КР, на которых наблюдаются основные различия между исследуемыми группами, было создано следующее дерево решений: если амплитуда линии КР  $\sim 1092 \text{ cm}^{-1}$  ниже  $0.075 \text{ rel. units}$ , то это спектр БЦ без содержания пектина. Если же амплитуда линии КР  $\sim 1277 \text{ cm}^{-1}$  равна  $0.075 \text{ rel. units}$ , то это спектр БЦ с содержанием пектина. Если амплитуда линии КР  $\sim 1763 \text{ cm}^{-1}$

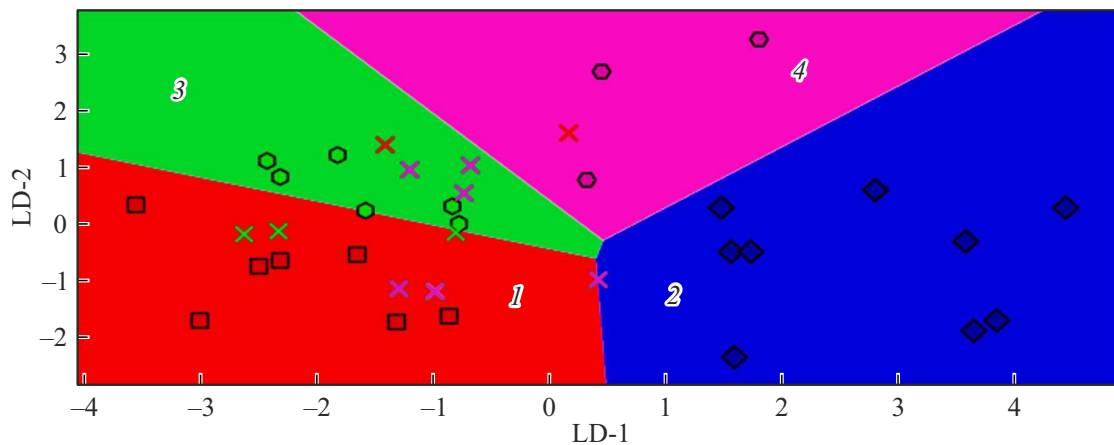


Рис. 2. Результаты LDA. График значений линейной дискриминантной функции (1, 2, 3 и 4 — исследуемые группы).

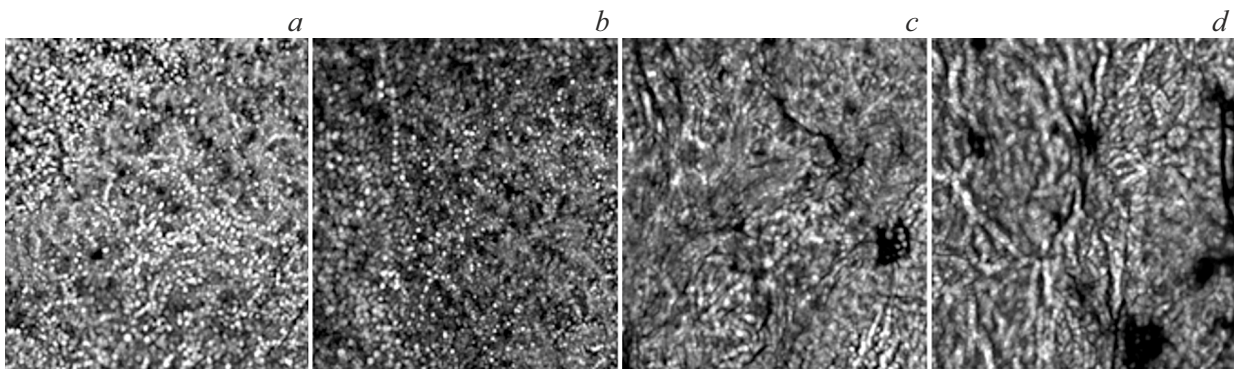


Рис. 3. Микроснимки бактериальной целлюлозы (a — группа 1, b — группа 2, c — группа 3, d — группа 4), полученные с помощью конфокальной микроскопии. Размер поля  $400 \times 400 \mu\text{m}$ .

ниже 0.018 rel. units, то это спектр БЦ с 1.3-диоктил-4-метилимидозалий бромидом с добавлением пектина, если же амплитуда линии КР  $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$  равна 0.018 rel. units, то это спектр БЦ без содержания пектина.

Далее на рис. 3 представлены результаты микроскопического анализа исследуемых объектов.

На рис. 3 представлены микроснимки образцов высушенных гелей БЦ с добавлением пектина и 1.3-диоктил-4-метилимидозалий бромида. Добавление пектина приводило к формированию более крупных гранул БЦ. Образцы имеют зернистую структуру, при этом добавление производного имидозалия привело к частичному упорядочиванию, выстраиванию гранул БЦ в цепочки, что отчетливо видно на рис. 3.

## Выводы

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния и с использованием LDA, а также дисперсионного анализа были выявлены спектральные различия между исследуемыми группами БЦ с добавлением пектина и без него, с добавлением 1.3-диоктил-4-метилимидозалий

бромида. Было установлено, что основные различия в спектрах КР проявляются на линиях  $1745 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1591 \text{ cm}^{-1}$  и  $1092 \text{ cm}^{-1}$ , соответствующих основным линиям бактериальной целлюлозы.

Был разработан алгоритм идентификации объектов на основе БЦ. Установлено, что в случае, если амплитуда линии КР  $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$  равна 0.018 rel. units, то это спектр БЦ без содержания пектина, если же амплитуда линии  $1277 \text{ cm}^{-1}$  равна 0.075 rel. units, то это спектр БЦ с содержанием пектина.

Таким образом, с помощью метода спектроскопии КР можно проводить экспресс-анализ состава исследуемых образцов на основе БЦ.

С помощью микроскопического анализа выявлены изменения структуры БЦ при добавлении пектина во всех исследуемых образцах.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] R. Portela, C.R. Leal, P.L. Almeida, R.G. Sobral. *Microbial Biotechnology*, **12** (4), 586–610 (2019). DOI: 10.1111/1751-7915.13392
- [2] З.Н. Скворцова, Т.И. Громовых, В.С. Грачев, В.Ю. Траскин. *Коллоидный журнал*, **81** (4), 441–452 (2019). DOI: 10.1134/S0023291219040165
- [3] M. Jastrzebska, R. Wrzalik, A. Kocot, J. Zalewska-Rejda, B. Cwalina. *J. Biomaterials Science, Polymer Edition*, **14** (2), 185–197 (2003). DOI: 10.1163/156856203321142605
- [4] *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, ed. by H.-U. Gremlich, Bing Yan (CRC Press, 2000). Practical Spectroscopy series, vol. 24.
- [5] E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, E.V. Pisareva, M.A. Daniel, L.T. Volova, A.A. Fedotov, O.O. Frolov, A.N. Subatovich. *J. Optical Technology*, **87** (3), 161–167 (2020). DOI: 10.1364/JOT.87.000161
- [6] P.E. Timchenko, E.V. Timchenko, L.T. Volova, M. A. Zybin, O.O. Frolov, G.G. Dolgushov. *Optical Memory and Neural Networks*, **29** (4), 354–357 (2020). DOI: 10.3103/S1060992X20040116