

Рамановская спектроскопия асцитической жидкости пациентов с онкопатологиями

Л.А. Шамина¹, И.А. Братченко¹, Д.Н. Артемьев¹, А.А. Морятов², Ю.В. Старикова¹,
Е.Н. Тупикова¹, И.А. Платонов¹, С.В. Козлов², В.П. Захаров¹

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34, Самара, Россия, 443086

²Самарский государственный медицинский университет, Чапаевская 89, Самара, Россия, 443099

Аннотация. В настоящем исследовании мы провели анализ спектральных характеристик асцитической жидкости с помощью рамановской спектроскопии и поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (SERS). Использование SERS позволило выявить присутствие компонентов асцитической жидкости, которые недоступны для обнаружения при анализе с помощью только рамановской спектроскопии. Продемонстрирована потенциальная возможность выявления спектрального вклада ряда патогенных микроорганизмов с использованием предлагаемого оптического подхода на основе SERS.

1. Введение

Патологические процессы при канцерогенезе провоцируют ряд осложнений в организме человека. Одним из частых осложнений на метастатических стадиях рака является асцит, характеризующийся скоплением свободной жидкости в брюшной полости. С целью анализа инфицированности содержимого в клинической практике широко используется бактериологический посев. Однако, этот метод требует временных затрат и занимает от двух до десяти дней. Для проведения своевременного лечения при асците необходимо раннее определение и идентификация патогенов в асцитической жидкости [1]. Потенциальную возможность определения компонентного состава содержимого при асците предоставляет метод рамановской спектроскопии (РС). Метод РС применим для исследования асцитической жидкости *in vitro* в течение нескольких минут. Повышение информативности и возможность проведения более детального анализа компонентного состава асцитической жидкости возможно при использовании поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (SERS). Например, применение поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии при исследовании крови позволяет оценить изменения гипоксантина, тогда как по рамановскому спектру определить его наличие невозможно [2]. Более того, поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия применима для идентификации и дискриминации видов дрожжей из различных таксономических групп грибов [3]. Поэтому в данной работе исследованы образцы асцитической жидкости пациентов с онкологическими заболеваниями с помощью рамановской спектроскопии и поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии в ближней ИК-области и оценена возможность применения технологии SERS с используемой

экспериментальной установкой для дальнейших исследований компонентного состава асцитической жидкости.

2. Материалы и методы

2.1. Коллоидный раствор золота

В связи с тем, что регистрация спектров осуществляется в ближнем ИК диапазоне, для создания плазмонного резонанса и достижения эффекта поверхностного усиления наиболее целесообразно использовать наночастицы из золота [4]. Ранее в работе [5] нами установлено, что для используемого экспериментального стенда оптимальное усиление сигнала достигается с помощью золотых микроструктур. Коллоидный раствор золота был приготовлен восстановлением золотохлористоводородной кислоты HAuCl_4 цитратом натрия $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ по методике [6]. В спектре поглощения полученного раствора наблюдается максимум при 525 нм, что, согласно литературным данным [7], соответствует размеру частиц около 40 нм. Полученный коллоидный раствор золотых наночастиц сферической формы подвергнут формированию вторичных частиц за счет агрегации. Для этого соляная кислота (концентрация 0,1М) добавлена к коллоидному раствору золота в соотношении 7/40, соответственно.

2.2. Подготовка образцов

Был проведен стандартизированный отбор проб асцитической жидкости у пациентов со злокачественными новообразованиями. Отобранные пробы помещались в стерильные пробирки. Между отбором проб и непосредственной регистрацией спектральных характеристик образцы хранились в холодильнике при температуре $+2 + 4$ °С. Экспериментальные исследования выполнены в течении 24 часов с момента отбора проб. В исследование были включены пациенты Самарского областного клинического онкологического диспансера.

Для исследования образцов асцитической жидкости методом РС, исследуемые образцы помещались в алюминиевую кювету объемом 0,9 мл.

Подготовка растворов для исследования методом SERS выполнена по следующему алгоритму: образец асцитической жидкости разбавляется дистиллированной водой в десять раз; в полученный разбавленный образец вводится агрегированный коллоид золота в соотношении 1/1; раствор в объеме 6 мкл наносится на алюминиевую фольгу и сушат в течение 30 минут при комнатной температуре.

2.3. Экспериментальная установка

Для исследования спектральных характеристик асцитической жидкости с помощью РС и SERS использован экспериментальный стенд, представленный на рисунке 1. Возбуждение регистрируемых спектров производилось излучением лазерного модуля LuxxMaster Raman Boxx фирмы PD-LD (центральная длина волны 785 нм). Фокусировка зондирующего излучения, захват и фильтрация сигнала осуществлялись с использованием рамановского пробника RPB785 фирмы InPhotonics. Регистрация спектров выполнена с помощью высокоразрешающего спектрометра Shamrock SR-500i-D1-R со встроенной цифровой камерой ANDOR DU416A-LDC-DD, охлаждаемой до -65 °С. Регистрация спектров асцитической жидкости осуществлялась в области 780 – 950 нм. Была выполнена последовательная запись трех спектров для каждого исследуемого образца. Результирующий спектр получен путем усреднения трех регистрируемых спектров. Общее время записи спектра составило 3 минуты.

2.4. Обработка экспериментальных данных

Записанные спектры обрабатывались полиномиальным методом для разделения сигналов автофлуоресценции и РС [8]. Автофлуоресцентная составляющая аппроксимировалась полиномиальной функцией десятого порядка. Рамановская компонента спектра выделялась путем вычитания из регистрируемого спектра автофлуоресцентной составляющей.

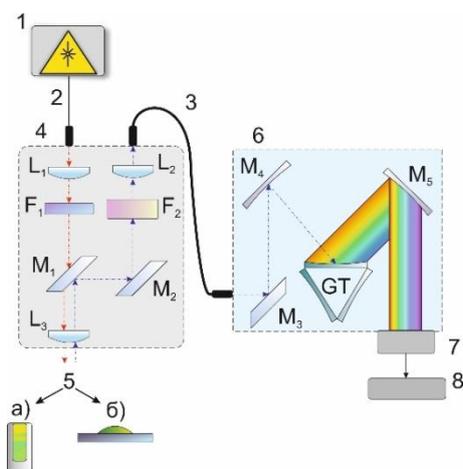


Рисунок 1. Экспериментальный стенд: 1 – лазерный модуль LuxxMaster Raman Boxx; 2, 3 – оптоволоконна; 4 - рамановский пробник RPB785 фирмы InPhotonics; L1 и L2 – согласующие линзы; L3 – фокусирующая линза; F1 - полосовой фильтр; F2 - широкополосный фильтр; M1 – дихроичное зеркало; M2, M3, M4, M5 - отражающие зеркала; 5 – исследуемый образец (а – образец в кювете для исследования методом PC; б – микродоза образца с золем на фольге для исследования методом SERS); 6 - спектрометр Shamrock SR-500i, GT – турель с дифракционными решетками; 7 - встроенная охлаждаемая камера DU416A-LDC-DD; 8 – компьютер.

3. Результаты и обсуждение

Асцитическая жидкость может накапливаться в виде трансудата или экссудата; по инфицированности содержимого возможно: инфицированное содержимое, стерильное содержимое и спонтанный бактериальный перитонит. В работе [9] авторами описан подход к анализу различных штаммов бактерий. Авторы продемонстрировали возможность идентификации возбудителя с помощью рамановской микроспектроскопии и хемометрического анализа для последующего применения при анализе асцитической жидкости. В настоящей работе проанализированы экспериментальные данные, полученные с применением используемого экспериментального стенда без микроскопической системы. На рисунке 2 представлены исходные спектральные характеристики асцитической жидкости без вычитания автофлуоресцентной составляющей.

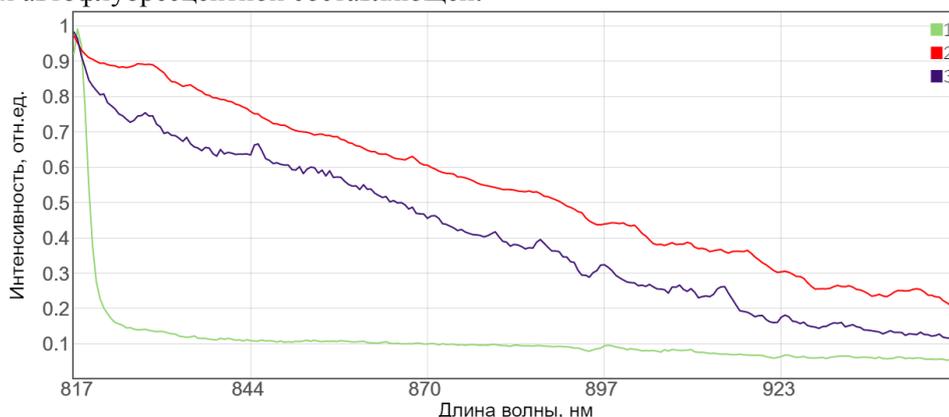


Рисунок 2. Исходные спектральные характеристики асцитической жидкости: 1-микродоза агрегированного коллоида золота на фольге, 2 – асцитическая жидкость в объеме 0,9 мл, 3 – микродоза раствора асцитической жидкости с применением технологии SERS.

Анализ рисунка 2 показывает, что при применении технологии SERS происходит усиление сигнала и появление пиков на ряде спектральных полос. Из рисунка 2 также следует, что спектральный вклад агрегированного коллоида золота в характеристику исследуемого образца

незначителен. Для анализа особенностей спектральных характеристик рамановского рассеяния объемного образца асцитической жидкости и поверхностно-усиленного рамановского рассеяния микродозы образца на рисунке 3 представлены рамановские спектры и анализ вклада различных биохимических компонентов [10-14].

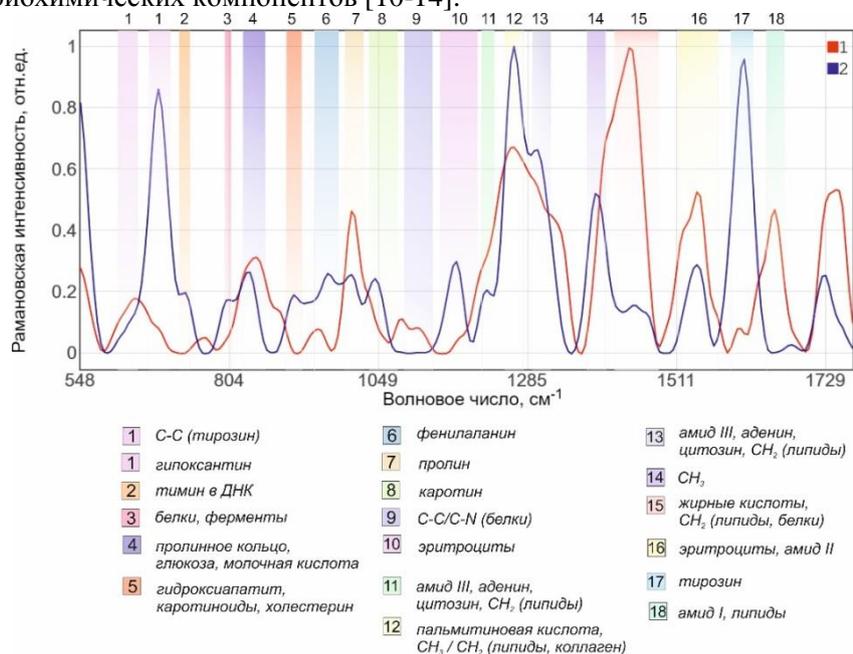


Рисунок 3. Характерные рамановские спектры асцитической жидкости: 1— асцитическая жидкость в объеме 0,9 мл, 2 – микродоза раствора асцитической жидкости с применением технологии SERS.

Спектральные характеристики исследуемых образцов, представленные на рисунке 3, позволяют сделать вывод, что, помимо полос, определяемых при рамановском рассеянии, применение SERS технологии для анализа компонентного состава асцитической жидкости позволяет определить также биохимические изменения, ассоциированные с полосами $718-730\text{ см}^{-1}$, $797-808\text{ см}^{-1}$, $904-915\text{ см}^{-1}$, $1030-1040\text{ см}^{-1}$, $1167-1175\text{ см}^{-1}$, $1220-1230\text{ см}^{-1}$, $1665-1680\text{ см}^{-1}$. Усиление на этих полосах демонстрирует потенциальную возможность выявления спектрального вклада ряда патогенных микроорганизмов при применении SERS технологии с используемым экспериментальным стендом [15, 9].

4. Заключение

Выделенные и проанализированные спектральные особенности образцов асцитической жидкости могут стать основой метода определения биохимических характеристик и анализа инфицированности содержимого при асците, что позволит своевременно подобрать химиотерапию, в частности, для лечения пациентов с онкологическими заболеваниями, осложненными асцитом. Проведенное сравнительное исследование экспериментальных данных рамановского рассеяния и поверхностно-усиленного рамановского рассеяния продемонстрировало, что применение SERS позволяет определить компоненты асцитической жидкости, которые недоступны для обнаружения при анализе с помощью рамановской спектроскопии, а также подтвердило потенциальную возможность выявления ряда патогенных микроорганизмов при применении SERS технологии с используемым экспериментальным стендом для последующих исследований компонентного состава асцитической жидкости.

5. Литература

- [1] Umgelter, A. Failure of current antibiotic first-line regimens and mortality in hospitalized patients with spontaneous bacterial peritonitis / A. Umgelter, W. Reindl, M. Miedaner, R.M. Schmid, W. Huber // *Infection*. – 2009. – Vol. 37. – P. 2-8.

- [2] Premasiri, W.R. Surface Enhanced Raman Scattering of Whole Human Blood, Blood Plasma and Red Blood Cells: Cellular Processes and Bioanalytical Sensing / W.R. Premasiri, J.C. Lee, L.D. Ziegler // *J. Phys. Chem.* – 2012. – Vol. 116(31). – P. 9376-9386.
- [3] Sayin, I. Characterization of Yeast Species Using Surface-Enhanced Raman Scattering / I. Sayin, M. Kahraman, F. Sahin, D. Yurdakul, M. Culha // *J. Appl. Spectrosc.* – 2009. – Vol. 63(11). – P. 1276-1282.
- [4] Sharma, B. SERS: Materials, applications, and the future / B. Sharma, R.R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe, R.P. Van Duyne // *J. Materials Today.* – 2012. – Vol. 15(1-2). – P. 16-25.
- [5] Shamina, L.A. Comparative study of human blood Raman spectra and biochemical analysis of patients with cancer / L.A. Shamina, I.A. Bratchenko, D.N. Artemyev, O.O. Myakinin, A.A. Moryatov, A.E. Orlov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // *Proc. SPIE Saratov Fall Meeting: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX.* – 2018. – Vol. 10716. – P. 107160D.
- [5] Yue, J. Determination of malachite green in environmental water using cloud point extraction coupled with surface-enhanced Raman scattering / J. Yue, M. Pinyi, L. Fanghui, G. Dejiang, W. Xinghua // *Anal. Methods.* – 2013. – Vol. 5. – P. 5609-5614.
- [6] Поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия (SERS): аналитические, биофизические и биомедицинские приложения / под ред. С. Шлюкер. – Москва: Техносфера, 2017. – 49 с.
- [7] Zhao, J. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy / J. Zhao, H. Lui, D. I. McLean, H. Zeng // *J. Applied Spectroscopy.* – 2007. – Vol. 61(11). – P. 1225-1232.
- [8] Kloß, S. Toward Culture-Free Raman Spectroscopic Identification of Pathogens in Ascitic Fluid / S. Kloß, P. Rösch, W. Pfister, M. Kiehntopf, J. Popp // *Analytical Chemistry.* – 2014. – Vol. 87(2). – P. 937-943.
- [9] Chen, N. Surface-enhanced Raman spectroscopy of serum accurately detects prostate cancer in patients with prostate-specific antigen levels of 4–10 ng/mL / N. Chen, M. Rong, X. Shao, H. Zhang, S. Liu, B. Dong, W. Xue, T. Wang, T. Li, J. Pan // *International Journal of Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 5399-5407.
- [10] De Gelder, J. Reference database of Raman spectra of biological molecules / J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenabeele, L. Moens // *Journal of Raman Spectroscopy.* – 2007. – Vol. 38(9). – P. 1133-1147.
- [11] Atkins, C.G. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components / C.G. Atkins, K. Buckley, M.W. Blades, R.F. B. Turner // *Applied Spectroscopy.* – 2017. – Vol. 71(5). – P. 767-793.
- [12] Feng, S. Blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy for non-invasive optical detection of cervical cancer / S. Feng, D. Lin, J. Lin, B. Li, Z. Huang, G. Chen, W. Zhang, L. Wang, J. Pan, R. Chen, H. Zeng // *The Analyst.* – 2013. – Vol. 138(14). – P. 3967-3974.
- [13] Jaychandran, S. Raman Spectroscopic Analysis of Blood, Urine, Saliva and Tissue of Oral Potentially Malignant Disorders and Malignancy-A Diagnostic Study / S. Jaychandran, P.K. Meenapriya, S. Ganesan // *Int. J Oral Craniofac. Sci.* – 2016. – Vol. 2(1). – P. 11-14.
- [14] Su, L. Rapid detection of Escherichia coli and Salmonella typhimurium by surface-enhanced Raman scattering / L. Su, P. Zhang, D. Zheng, Y. Wang, R. Zhong // *Optoelectron. Lett.* – 2015. – Vol. 11(2). – P. 157-160.

Благодарности

Проведенное исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Raman spectroscopy of ascitic fluid from patients with cancer

L.A. Shamina¹, I.A. Bratchenko¹, D.N. Artemyev¹, A.A. Moryatov², J.V. Starikova¹,
E.N. Tupikova¹, I.A. Platonov¹, S.V. Kozlov², V.P. Zakharov¹

¹Samara National Research University, Moskovskoe Shosse 34A, Samara, Russia, 443086

²Samara State Medical University, Chapaevskaya str. 89, Samara, Russia, 443099

Abstract. In the current study we performed investigation of ascitic fluid spectral characteristics by conventional Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). The utilization of SERS made it possible to reveal the presence of ascitic fluid components that are not available for detection during analysis by ordinary Raman spectroscopy.