

## Рамановская спектроскопия для исследования тканей почек и ее патологических образований

А.А. Лыкина<sup>1</sup>, Д.Н. Артемьев<sup>1</sup>, В.И. Кукушкин<sup>2</sup>, И.А. Братченко<sup>1</sup>,  
Н.С. Александров<sup>3</sup>, В.П. Захаров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34А, Самара, Россия, 443086

<sup>2</sup>ФГБУН Институт физики твердого тела РАН, ул. Академика Осипяна 2, Черноголовка, Россия, 142432

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, ул. Трубецкая 8, Москва, Россия, 119991

**Аннотация.** Данная работа посвящена исследованию спектральных свойств интактных и опухолевых тканей почки. Для возбуждения рамановского рассеяния света и автофлуоресценции использовали лазер с длиной волны излучения 785 нм. В качестве исследуемых образцов использовали визуально и морфологически неизменные ткани почек свиньи и человека, а также опухолевую ткань почек человека. Анализ регистрируемых сигналов осуществлялся при помощи метода проекций на латентные структуры для выделения спектральных особенностей между различными типами новообразований почки. Проведенное исследование показало различие между регистрируемыми сигналами светлоклеточного и хромофобного вариантов рака почки человека, наиболее информативными полосами рамановского спектра для определения светлоклеточного рака почки человека являются: 870-980 см<sup>-1</sup>, 980-1130 см<sup>-1</sup>, 1230-1270 см<sup>-1</sup>, 1360-1420 см<sup>-1</sup>.

### 1. Введение

На сегодняшний день рак почки является одной из ведущих проблем современной онкологии, связанной не только с высокими темпами прироста заболеваемости, но и с трудностью его диагностики. Для исследования патологических процессов в биологических тканях используют гистологическое исследование, которое основывается на изучении строения, жизнедеятельности и развития тканей живых организмов на клеточном уровне. В современных исследованиях биологических тканей применяются спектральные методы, основанные на измерении оптических свойств веществ. Одним из наиболее перспективных методов является рамановская спектроскопия [1,2,3]. Целью данной работы является применение рамановской спектроскопии для выявления патологических изменений в биологических тканях почки. В качестве модельной среды почки использовали биологические ткани почек свиньи двух типов: мозгового (внутри) и коркового вещества (снаружи). На основе модельных экспериментов с тканями почки свиньи исследовали спектральные свойства биологических тканей почки человека как интактных, так и опухолевых. В качестве метода исследования использовалась рамановская спектроскопия, которая позволяла определять изменения в составе тканей по форме и интенсивности регистрируемого сигнала.

## 2. Материалы и методы обработки данных

### 2.1. Экспериментальная установка

Для регистрации рамановских спектров применяли измерительную систему, в состав которой входят узкополосный источник возбуждения – лазер LML-785.0RB-04 (мощность излучения на выходе из пробника 200 мВт, длина волны излучения 785 нм), оптический модуль фильтрации (рамановский зонд, RPB785 фирмы InPhotonics) и регистрирующий приемник – спектрограф Sharmrock SR-500i с интегрированной камерой ANDOR DV-420A-OE с охлаждаемой матрицей до  $-70^{\circ}\text{C}$ , обеспечивающий регистрацию оптических сигналов низкой интенсивности.

Регистрация спектров производилась в спектральном диапазоне 780 – 950 нм, время экспозиции составляло 60 секунд. Выполнялась последовательная запись трех спектров для каждого исследованного образца. Полное время регистрации составляло 3 минуты.

### 2.2. Исследуемые образцы

В качестве модельной среды были исследованы образцы биологических тканей почки свиньи. Биологическая ткань почки свиньи была исследована сразу после удаления (*ex vivo kidney*), потом была помещена в формалин (*ex vivo kidney in formaline*). В дальнейшем был проведен стандартизированный отбор тканей человека (11 образцов), из них 1 образец соответствовал сохранной ткани почки, 9 - светлоклеточный вариант почечноклеточного рака, и 1 образец хромофобный вариант почечноклеточного рака. Исследуемые образцы были получены на базе ПАО Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова. Соответствие образцов тканей к категории сохранных или опухолевых проводили с помощью гистологического и иммуногистохимического методов исследования.

### 2.3. Методы и обработки данных

Для анализа рамановского спектра почки были использованы различные методы предобработки данных: для уменьшения влияния шумов использовался сглаживающий фильтр Savitzky–Golay (*sav\_gol*) [4], в котором задавалось только ширина окна фильтрации. Избавление от фонового излучения осуществлялось коррекцией базовой линии с помощью метода ассиметричных наименьших квадратов (Baseline Correction with Asymmetric Least Squares – baseline ALS ( $\lambda$ ,  $p$ ,  $N$ )) [5], свойства которого задаются с помощью трех параметров:  $\lambda$ ,  $p$ ,  $N$ . Параметр  $\lambda$  отвечает за сглаживание сигнала, который в дальнейшем сравнивается с необработанным сигналом в качестве базовой линии, где за контроль положения базовой линии отвечает параметр  $p$ , а  $N$  количество итераций. Нормирование данных применялось с использованием стандартного отклонения случайной величины с нормальным распределением (Standard Normal Variate - *snv*) [4]. Методы предобработки были реализованы в облачном сервисе TPTcloud (<https://tptcloud.com/>).

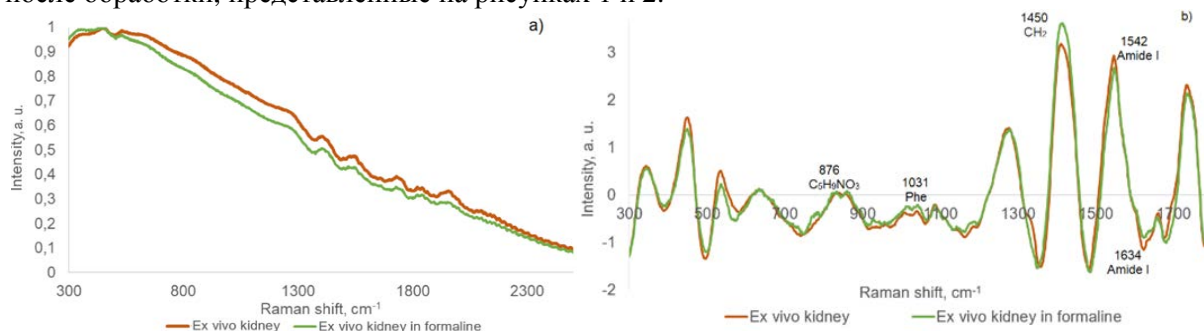
Определение информативных полос рамановского спектра реализовано с помощью анализа распределения независимой переменной в проекции данных (*variable importance in projection, VIP*) [6]. Чем выше VIP-показатель конкретной полосы, тем более значимой она является при построении данной модели. Переменные с низким VIP-показателем менее важны, и могут быть исключены из модели.

## 3. Результаты исследования и обсуждения

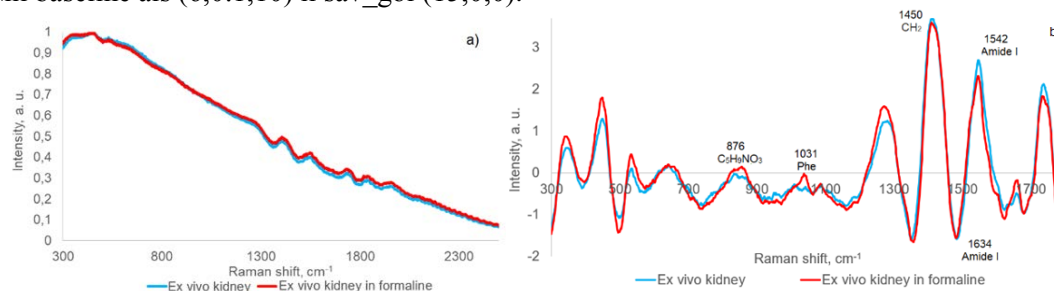
### 3.1. Исследование биологических тканей почек свиньи

На первой стадии был проведен подбор параметров установки и режимов съемки для исключения теплового повреждения образцов. В дальнейшем были проведены модельные эксперименты регистрации рамановского рассеяния света тканей почек и проанализировано влияние формалина на спектральные характеристики. В качестве модельного объекта использовались ткани почки свиньи (корковый и мозговой слои). Исследуя регистрируемые сигналы почек свиньи, были выявлены основные положения пиков белка:  $876\text{ см}^{-1}$  (валентные колебания  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$ -группы (гидроксипролин)),  $1031\text{ см}^{-1}$  (растяжения связей СН кольца

фенилаланина),  $1450\text{ см}^{-1}$  (деформационные колебания  $\text{CH}_2$ ),  $1542\text{ см}^{-1}$  (связь Amide II),  $1634\text{ см}^{-1}$  (колебания Amide I) [1,2]. Для выделения рамановского спектра каждый регистрируемый сигнал проходил предобработку (baseline als (6,0.1,10) и sav\_gol (15,0,0)). Рассмотрим регистрируемые сигналы коркового и мозгового веществ почки в двух средах до и после обработки, представленные на рисунках 1 и 2.



**Рисунок 1.** Оценка влияния формалина на спектральные характеристики коркового вещества свиной почки: а) Регистрируемые сигналы коркового вещества свиной почки; б) Нормированные рамановские спектры коркового вещества свиной почки, обработанные методами baseline als (6,0.1,10) и sav\_gol (15,0,0).



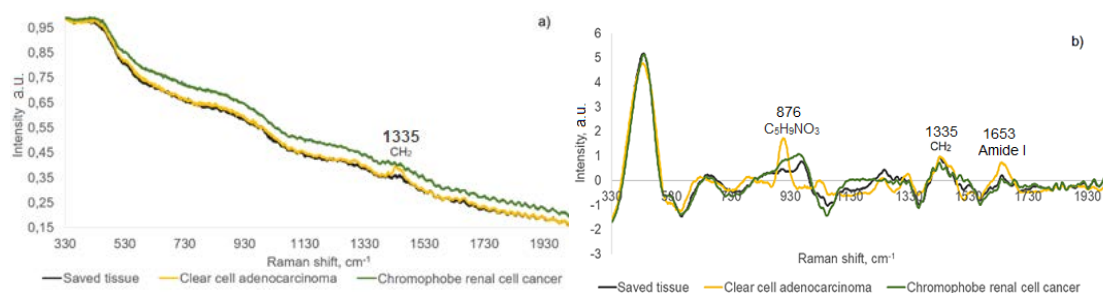
**Рисунок 2.** Оценка влияния формалина на спектральные характеристики мозгового вещества свиной почки: а) Регистрируемые сигналы мозгового вещества свиной почки; б) Нормированные рамановские спектры мозгового вещества свиной почки, обработанные методами baseline als (6,0.1,10) и sav\_gol (15,0,0).

Рассматривая рисунки 1 и 2, видно, что регистрируемые сигналы и рамановские спектры мозгового и коркового веществ свиной почки практически одинаковые, совпадают как форме, так по и интенсивностям рамановских полос. Интенсивность регистрируемого сигнала коркового вещества свиной почки после удаления (а) ниже, чем у регистрируемого сигнала коркового вещества в формалине (б), что не наблюдается у регистрируемых сигналов мозгового вещества. Анализируя полученные данные, можно предположить, что образец свиной почки не пропитался формалином, поэтому интенсивность регистрируемого сигнала мозгового вещества после удаления меньше, чем в формалине.

### 3.2. Исследование биологических тканей почек человека

Следующем этапе исследования являлась регистрация сигналов опухолевых тканей почек, морфологически соответствующих светлоклеточному и хромофобному вариантам почечноклеточного рака. Их сравнивали с регистрируемым сигналом сохранной ткани почки человека. Представим регистрируемые сигналы и рамановские спектры (регистрируемые сигналы после обработки) почки человека на рисунке 3.

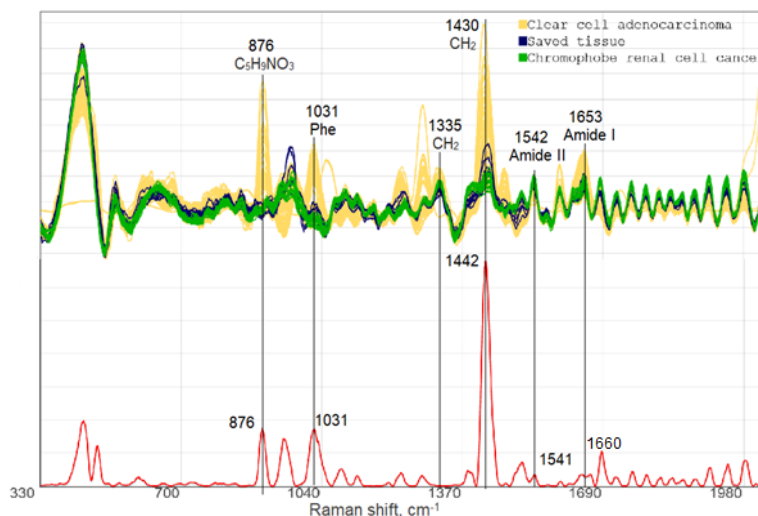
Исследуя регистрируемые сигналы опухолей почки человека, можно сделать вывод, что регистрируемые сигналы сохранной ткани и хромофобного рака почки человека совпадают по форме на всем спектральном диапазоне. Регистрируемый сигнал светлоклеточного рака почки человека имеют выраженные рамановские пики на длинах волн  $876\text{ см}^{-1}$ ,  $1335\text{ см}^{-1}$  (верные колебания  $\text{CH}_2$  в коллагене и нуклеиновой кислоты) и  $1653\text{ см}^{-1}$  (связь Amide I в липидах) [1,3].



**Рисунок 3.** Нормированные регистрируемые сигналы тканей почки человека (а) и их выделенные Рамановские спектры почки человека (б) методами *baseline als* (6,0,1,10) и *sav\_gol* (30,0,0).

Сравнивая рамановские спектры почек человека и свиньи можно заметить, что они имели совпадения на пиках  $876\text{ см}^{-1}$ ,  $1031\text{ см}^{-1}$ , которые соответствуют белкам. На спектральном диапазоне  $1400\text{--}1700\text{ см}^{-1}$  у рамановских спектров почки свиньи наблюдаются пики  $1450\text{ см}^{-1}$ ,  $1542\text{ см}^{-1}$  и  $1634\text{ см}^{-1}$ , сравнивая со спектрами почки человека можно заметить, различия в позициях пиков на  $2\text{--}10\text{ см}^{-1}$  и их распределения интенсивности, хотя спектральные особенности обоих видов аналогичны.

На рисунке 4 представлены регистрируемые сигналы опухолевых и сохраненных тканей почки человека, обработанными методами *baseline als* (6,0,1,10) и *sav\_gol* (30,0,0). Для определения информативных полос рамановских спектров тканей почки человека были построены VIP-показатели для выделения светлоклеточного рака среди всех образцов, представленные на рисунке 4.



**Рисунок 4.** VIP-переменные PLS модели для дискриминации светлоклеточного рака человеческой почки от других типов тканей (Phe- phenylalanine).

Сравнивая рамановские спектры сохраненной ткани, тканей светлоклеточного и хромофобного рака почки человека, было обнаружено, что на спектральном диапазоне  $300\text{--}500\text{ см}^{-1}$  позиция полос совпадает у всех трех тканей, при этом интенсивность АФ сохраненной ткани и хромофобного рака почки человека выше, чем у интенсивности АФ светлоклеточного рака. Наблюдается совпадение позиций пиков на длинах волн  $876\text{ см}^{-1}$ ,  $1335\text{ см}^{-1}$ ,  $1542\text{ см}^{-1}$ ,  $1653\text{ см}^{-1}$ , которые представляют собой основные компоненты в тканях почки человека [1,3]. Для светлоклеточного рака наиболее информативными рамановскими пиками являются  $876\text{ см}^{-1}$ ,  $1031\text{ см}^{-1}$  и  $1430\text{ см}^{-1}$ , которые принадлежат белкам и липидам. Исследуя полученные данные, можно предположить, что VIP-переменные, выбирая наиболее информативные значения на рамановских спектрах, немного смещают положение рамановских полос. Это объясняется, тем что рамановские полосы имеют широкий спектральный диапазон, и при построении модели

VIP-переменные считывают наиболее значимый пик, который располагается внутри рамановской полосы. Исследуя рамановские спектры хромофобного рака почки человека, были выделены наиболее информативные пики на длинах волн  $1335\text{ см}^{-1}$ ,  $1430\text{ см}^{-1}$ , которые соответствуют веерным и деформационным колебаниям  $\text{CH}_2$  в коллагене и белке [3]. В работе [3] были исследованы образцы хромофобного варианта почечноклеточного рака, где наиболее информативными пиками были выявлены на  $1002\text{ см}^{-1}$ ,  $1035\text{ см}^{-1}$ ,  $1120\text{ см}^{-1}$ ,  $1316\text{ см}^{-1}$ ,  $1336\text{ см}^{-1}$ ,  $1450\text{ см}^{-1}$ ,  $1612\text{ см}^{-1}$  и  $1672\text{ см}^{-1}$ . Это типичные пики рамановского рассеяния света в полученных спектрах, которые были отнесены к фенилаланиновому кольцу, растяжения связей  $\text{CH}$  кольца фенилаланина, растяжения связей  $\text{CC}$  в липидах, веерным колебаниям  $\text{CH}$  ( $1316\text{ см}^{-1}$  и  $1336\text{ см}^{-1}$ ), деформационные колебания  $\text{CH}$ , растяжениям связей  $\text{CC}$  фенилаланина и тирозина, а также растяжение связей  $\text{C}=\text{O}$  амида I соответственно. Позиции рамановских пиков у тканей почки человека в работе [3] и исследуемых в нашей работе имеют совпадения на волновых числах  $1035\text{ см}^{-1}$  и  $1336\text{ см}^{-1}$ , при этом характерно смещение положений рамановских полос, которое может быть обусловлено различием оптических характеристик экспериментальных установок. Оптическое разрешение ( $9\text{ см}^{-1}$ ) в работе [3] ниже, чем спектрографа Sharmrock SR-500i ( $1\text{ см}^{-1}$ ), используемого в данной работе. Спектральные различия биологических тканей почки человека могут быть вызваны тем, что в компонентном составе клеток рака присутствуют более высокие концентрации митохондрий в цитоплазме [7].

#### 4. Заключение

Результаты исследования показали, что интенсивность регистрируемых сигналов рамановского рассеяния мозгового вещества свиной почки сразу после удаления выше, чем интенсивность регистрируемых сигналов мозгового вещества в формалине, для спектральных сигналов коркового вещества обратная картина.

Проведенное исследование позволило выявить различия компонентного состава между сохранной тканью, тканей светлоклеточного и хромофобного рака почки человека по виду рамановских спектров. Для выделения класса светлоклеточного рака почки человека были использованы VIP-переменные PLS модели, позволяющие определить наиболее информативные рамановские полосы  $370\text{-}500\text{ см}^{-1}$ ,  $870\text{-}980\text{ см}^{-1}$ ,  $980\text{-}1130\text{ см}^{-1}$ ,  $1230\text{-}1270\text{ см}^{-1}$ ,  $1360\text{-}1420\text{ см}^{-1}$ , которые соответствуют колебаниям связей в белках.

#### 5. Литература

- [1] Huang, N. Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model / N. Huang, M. Short, J. Zhao, H. Wang, H. Lui, M. Korbelik, H. Zeng. – Optics Express, 2011. – 22892 p.
- [2] Lorincz, A Raman Spectroscopy for Neoplastic Tissue Differentiation: A Pilot Study / A. Lorincz, D. Haddad, R. Naik, V. Naik, A. Fung, A. Cao, P. Manda, A. Pandya, G. Auner, R. Rabah, S.E. Langenburg, M.D. Klein // J. Pediatr. Surg. – 2004. – P. 953-956 p.
- [3] Stewart, S. Distinguishing between renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma using Raman molecular imaging / S. Stewart, H. Kirshner, P. J. Treado, R. Priore, M. Tretiakova // J. of Raman spectroscopy, 2014. – 274 p.
- [4] Esbensen, K.H. Multivariate Data Analysis / K. H. Esbensen. – New Jersey: In Practice 4-th Ed., 2000. – 587 p.
- [5] Eilers, P.H.C. Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing / P.H.C. Eilers, H.F.M. Boelens // United States: Leiden University Medical Centre, 2005.
- [6] Farrés, M. Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation / M. Farrés, S. Platikanov, S. Tsakovski, R. Tauler // United States: Journal of Chemometrics, 2015. – 528 p.
- [7] Kalasinsky, K.S. Raman chemical imaging spectroscopy reagentless detection and identification of pathogens: signature development and evaluation / K.S. Kalasinsky, T. Hadfield, A.A. Shea, V.F. Kalasinsky, M.P. Nelson, J. Neiss, A.J. Drauch, G.S. Vanni, P.J. Treado // United States: Anal. Chem., 2007. – 2658 p.

## Raman spectroscopy for kidney tissue and its neoplasms research

A.A. Lykina<sup>1</sup>, D.N. Artemyev<sup>1</sup>, V.I. Kukushkin<sup>2</sup>, I.A. Bratchenko<sup>1</sup>, N.S. Aleksandrov<sup>3</sup>, V.P. Zakharov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samara National Research University, Moskovskoe Shosse 34A, Samara, Russia, 443086

<sup>2</sup>ISSP RAS, 2 Academician Ossipyan str., Chernogolovka, Russia, 142432

<sup>3</sup>Sechenov University, 8-2 Trubetskaya st., Moscow, Russia, 119991

**Abstract.** This work is devoted to the study of the spectral properties of intact and tumor kidney tissues. For excitation of Raman scattering and autofluorescence a laser with a wavelength of 785 nm was used. Visually and morphologically unchanged tissues of pigs and human kidneys as well as tumor tissue of human kidneys were used as the test samples. The analysis of registered signals was carried out using the method of projection on latent structures to isolate the spectral features between tissue types. The study showed a difference between the registered signals of the clear-cell adenocarcinoma and chromophob types of human kidney cancer, the most informative bands of the Raman spectrum for the determination of the light-celled human kidney cancer were 870-980 cm<sup>-1</sup>, 980-1130 cm<sup>-1</sup>, 1230-1270 cm<sup>-1</sup>, 1360 -1420 cm<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Raman spectroscopy, Kidney, Projection on latent structures.