

Совместный Рамановский и автофлуоресцентный анализ для оценки гомеостаза крови и урины

Л.А. Шамина^а, И.А. Братченко^а

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

Аннотация

В работе проведено исследование спектральных особенностей крови и урины с помощью Рамановской спектроскопии и автофлуоресцентного анализа. Анализ характерных спектров позволил установить информативные спектральные полосы, пропорциональные компонентам, с содержанием которых связаны изменения в гомеостазе биожидкостей при различных патологических состояниях. В целом, разрабатываемый подход к анализу биожидкостей может стать основой для практического метода минимально инвазивного скрининга различных патологий.

Ключевые слова: Рамановская спектроскопия; автофлуоресценция; гомеостаз биожидкости; кровь; урина; патология

1. Введение

Патологическое состояние организма провоцирует изменение гомеостаза биожидкостей, поэтому можно использовать анализ компонентного состава урины, крови, слюны и других биожидкостей для выявления таких патологий, как например рак [1]. Сегодня для диагностики рака по биожидкостям широко применяют различные биохимические анализы. Помимо используемых сегодня лабораторных методов анализа, для исследования компонентного состава биожидкостей могут с успехом применяться разнообразные физические и химические методы анализа. При этом достоинствами физических методов являются простота пробоподготовки, широкий динамический диапазон и большая универсальность по сравнению с химическими методами анализа. Поэтому альтернативой уже существующим методам лабораторного анализа могут стать оптические методы анализа биожидкостей. Методы Рамановской спектроскопии (РС) и автофлуоресцентного (АФ) анализа позволяют обнаружить изменения гомеостаза биожидкостей организма на молекулярном уровне и успешно применяются в различных областях клинической медицины и в экспериментальных исследованиях при определении особенностей состава биожидкостей. Поэтому целью настоящей работы является исследование спектральных особенностей крови и урины пациентов с онкопатологиями для установления критериев, позволяющих судить об изменении гомеостаза и наличии онкопатологий.

2. Материалы и методы

2.1. Экспериментальная установка

Для исследования биожидкостей с помощью РС и АФ спектры регистрировались высокоразрешающим цифровым спектрометром Shamrock SR-500i-c D1-R и оцифровывались с использованием охлаждаемой до -65°C цифровой камеры DU416A-LDC-DD фирмы ANDOR. 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. Исследуемые биожидкости помещались в кювету, представляющую собой подложку из ПММА с алюминиевым покрытием. Геометрия кюветы (глубина 6,5 мм, радиус кривизны углубления 19 мм) учитывала фокусное расстояние фокусирующей линзы используемого пробника. Рамановский пробник позиционировался нормально на оси углубления.

2.2. Подготовка исследуемых образцов

Проведен стандартизированный отбор проб крови и урины у пациентов Самарского областного клинического онкологического диспансера. Отобранные пробы помещались в стерильные пробирки. Между отбором проб и непосредственной регистрацией спектральных характеристик биожидкости хранились в холодильнике при температуре $+2 + 4^{\circ}\text{C}$. Экспериментальные исследования образцов выполнены в течении 60 часов с момента отбора проб. В исследование были включены пациенты Самарского областного клинического онкологического диспансера с доброкачественными и злокачественными опухолями различных локализаций; при этом из исследования исключались пациенты с системными заболеваниями и пациенты, принимающие какие-либо медицинские препараты. Проводилась стандартизированная запись спектров, при этом время воздействия лазерного излучения на образец составляло 3 минуты.

2.3. Обработка экспериментальных данных

Регистрация спектров производилась в спектральном диапазоне 780 – 950 нм, время экспозиции составляло 20 секунд. Выполнялась последовательная запись трех спектров для каждого исследованного образца, итоговый спектр строился путем усреднения всех трех зарегистрированных спектров. Полное время регистрации итогового спектра составляло 3 минуты. Для выделения АФ и РС составляющих регистрируемые спектры обрабатывались с помощью метода, предложенного Zeng с соавторами [2]. Анализ экспериментальных данных выполнен с использованием регрессионного анализа. Определение информативных полос спектра при построении регрессионной модели реализовано с помощью анализа распределения *variable importance in projection* (VIP) [3]. В решаемой нами задаче распределение VIP позволяет определить в спектрах крови и урины спектральные особенности, характерные при онкологической патологии легких.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Спектральные характеристики крови

На рисунке 1 представлен характерный Рамановский спектр крови. VIP-показатели матрицы Рамановских спектров образцов крови представлены на рисунке 2.

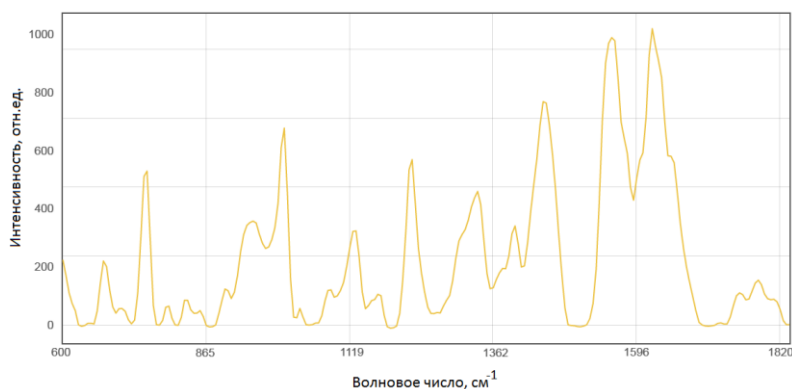


Рис. 1. Характерный Рамановский спектр крови.



Рис. 2. VIP-показатели матрицы Рамановских спектров образцов крови.

Анализ рисунка 2 позволяет установить наиболее информативные спектральные полосы для выявления особенностей Рамановских спектров крови при онкопатологии легких. Спектральная полоса 790-820 см^{-1} соответствует глутатиону. Онкопатологические состояния сопровождаются изменением относительного количества нейтрофилов, это способствует усилению окислительного стресса в крови пациентов. Изменение концентрации глутатиона вызывает понижение антиоксидантной активности плазмы, что делает его информативным критерием для оценки окислительного стресса организма. Канцерогенез характеризуется повышенным распадом белка и увеличением концентрации белков острой фазы. Информативными спектральными Рамановскими полосами, связанными с этими изменениями, являются 946-970 см^{-1} (протеины), 1465-1475 см^{-1} (липиды, протеины), 1640-1660 см^{-1} (протеины, фосфолипиды). Интенсивность спектральной полосы 1135-1140 см^{-1} пропорциональна концентрации маннозы. Нарушение обмена минорных сахаров и изменение концентрации маннозы приводит к изменению синтеза гликопротеинов и к изменению в гликозилировании. В результате этого строятся «анормальные» иммуноглобулины, снижается способность распознавания иммунной системой «анормальных» клеток.

3.2. Спектральные характеристики урины

Кривые, аппроксимирующие АФ исследованных образцов урины, представлены на рисунке 3.

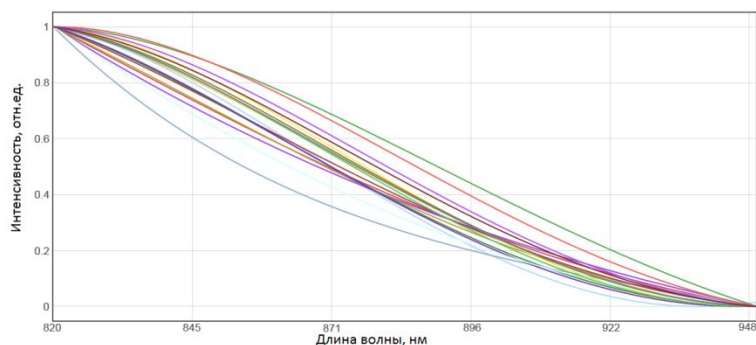


Рис. 3. Полиномиальная аппроксимация АФ.

В областях активного деления клеток накапливаются азотосодержащие пигменты – порфирины, экскретируемые с уриной. Изменения в спектре АФ урины отражает изменение и нарушение порфиринового обмена. По этим причинам при анализе урины интенсивность АФ можно использовать в качестве информативного критерия развития онкопатологии. Спектр АФ порфиринов имеет особенности в красном и ближнем ИК диапазоне спектра, поэтому возбуждение спектра АФ лазером с длиной волны 785нм позволяет оценить наличие порфиринов в исследуемом образце. Анализ распределения VIP-показателей матрицы Рамановских спектров образцов урины позволил выявить, что для онкопатологии наиболее характерные изменения в гомеостазе урины связаны со спектральными полосами $1000-1015\text{ см}^{-1}$ (мочевина), $1525-1560\text{ см}^{-1}$ (триптофан, протеины). Прогрессирующее развитие злокачественного новообразования сопровождается повышенным распадом белка, чему соответствуют изменения интенсивности в спектральной полосе $1525-1560\text{ см}^{-1}$. Образующийся при распаде белка в организме аммиак ферментируется в печени с образованием мочевины. Мочевина является конечным продуктом азотистого обмена при метаболизме белков и является критерием для оценки белкового обмена в клетках организма. Повреждение легочной ткани опухолевыми клетками способствует уменьшению дыхательной поверхности ткани и отсутствию газообмена в этой области. Кровь не оксигенируется, что приводит к изменению кислотно-основного состояния и увеличению угольной кислоты и ее производных, одной из которых является мочевина. Опухолевые клетки отличаются большим потреблением глюкозы. В этом случае расщепление глюкозы происходит анаэробно. Маркером повышенного расщепления глюкозы является лактатдегидрогеназа (ЛДГ). ЛДГ влияет на концентрацию пировиноградной кислоты, соответствующей спектральной полосе $1690-1705\text{ см}^{-1}$ (пируват).

4. Заключение

Выделенные особенности спектров АФ и РС могут являться основой метода диагностики патологий организма и стать альтернативой имеющимся подходам к диагностике патологических состояний с применением лабораторных методов анализа биожидкостей. Помимо исследования спектральных свойств урины и крови, также возможно дополнительное использование других биожидкостей организма в качестве объектов исследований для неинвазивной диагностики различных патологий. В частности, разрабатываемый метод может стать основой для метода неинвазивного скрининга онкологических патологий, например, при использовании в системах Lab-on-a-chip [4] анализа.

Благодарности

Проведенное исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

Литература

- [1] Peedell, C. Concise Clinical Oncology / C. Peedell // Elsevier Health Sciences, 2005. – 395 с.
- [2] Zeng, H. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy / H. Zeng // Applied spectroscopy. –2007. – 61(11). – P. 1225-1232. DOI: 10.1366/000370207782597003.
- [3] 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 // Journal of Chemometrics. –2015. – Vol.29(15). – P. 528-536. DOI: 10.1002/cem.2736.
- [4] Ashok, P. C. Fiber probe based microfluidic Raman spectroscopy / P. C. Ashok, G. P. Singh, K. M. Tan, K. Dholakia // J. Opt Express. –2010. – 18(8). – P. 7642-7649. DOI: 10.1364/OE.18.007642.