

УДК 535.212

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ВРМБ МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ОНКОМАРКЕРОВ В МОЧЕ

© 2019 г. Т. Ю. Могильная^{1,2,*}, А. М. Васильев^{1,2}, А. Г. Ботиков³

¹Закрытое акционерное общество “СЭРВЭТ”, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

“Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)”, Москва, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

*E-mail: mogilnay@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2018 г.

После доработки 20.11.2018 г.

Принята к публикации 20.01.2019 г.

Рассмотрена возможность разработки ВРМБ метода для контроля онкозаболеваний на ранней стадии. Проведены экспериментальные исследования ВРМБ спектров биологических структур, близких к онкомаркерам, с целью возможности диагностики в случае наличия одновременно нескольких маркеров в растворах, этилового спирта, белково – цитратного раствора, сыворотки крови. Проведены оценочные расчеты отношения логарифма интенсивности метилмеркаптана к гиппуровой кислоте, которые показали, что метод позволяет с большой вероятностью определить наличие этих элементов в биологических средах, в том числе и непосредственно в моче.

DOI: 10.1134/S0367676519050454

ВВЕДЕНИЕ

Основная цель данного исследования – разработка метода когерентной спектроскопии, позволяющей проводить раннюю диагностику онкологических заболеваний. Основой разрабатываемого метода является явление вынужденного рассеяния Манделштамма–Бриллюэна (ВРМБ). Лазерное излучение с интенсивностью близкой к пороговой, пропускается через раствор с интересующим нас объектом. Вынужденная люминесценция биологических и наноструктур, складывается с лазерным излучением. Интенсивность общего поля становится выше пороговой. В спектрах прямого и обратного рассеивания появляются стоксовые и антистоксовые составляющие, интенсивность которых зависит от концентрации растворенного компонента, а частота является функцией только частоты лазерного излучения структуры и типа компонента и не зависит от концентрации. При этом стоит заметить, что растворенные компоненты, которые не дают вторичного излучения не проявляются в спектрах, что резко уменьшает количество шумов и значительно упрощает систему обработки информации [1]. Как показали наши предыдущие исследования, этот метод хорошо подходит для наночастиц, нанополномерных структур и объектов, содержащих ДНК.

Известно, что для точной диагностики онкозаболеваний необходимо наличие нескольких метаболитов в растворе. При этом известно также, что моча является сложным раствором, с включениями

различного типа (аминокислоты, кетоновые тела, креатин, гиппуровая кислота). Мы показали ранее, что белковые соединения не дают вклад в люминесценцию в ИК области, а, следовательно, и не увеличивают шум. В то время как гиппуровая кислота ($C_9H_9NO_3$), которая существует в моче в виде кристаллов, может внести свой вклад в шумовые характеристики процесса. Для выяснения этих вопросов были проведены дополнительные экспериментальные и теоретические исследования.

Анализ структуры молекул метаболитов показал, что наименьшая энергия связи у соединений углерод азот (C–N) и углерод сера (C–S) при этом связь (C–N) с наибольшей вероятностью является первой связью, которая разрывается при возбуждении лазером. Именно эта энергия разрыва идет на увеличение суммарной энергии излучения в системе и как следствие вызывает эффект ВРМБ. Таким образом, в качестве имитаторов для исследования были взяты объекты, представляющие собой биомолекулы большой массы, в структуре которых наличествовала подобная связь с той же энергией. Поэтому, в качестве аналога онкомаркеров [2] были взяты объекты, содержащие такую связь в близкой структурной конфигурации, а именно кишечная палочка (*E. coli* 1257), Колифаг MS-2 и вирус оспы кролика. В качестве основного имитатора базового раствора (моча), помимо воды, этилового спирта, белково – цитратного раствора, была взята сыворотка крови, поскольку

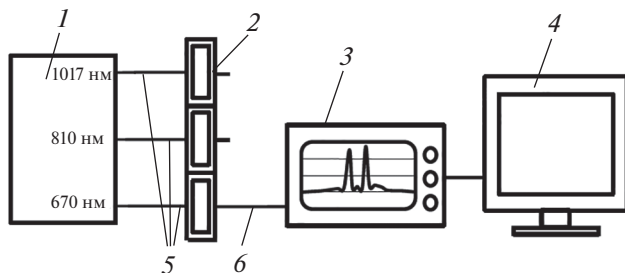


Рис. 1. Схема установки: 1 – лазеры, 2 – кювета с раствором, 3 – спектроанализатор, 4 – компьютер, 5 – одномодовое волокно, 6 – многомодовое волокно.

именно из нее почки отфильтровывают патологические маркеры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были подготовлены образцы по следующей методике.

Подготовка *E. coli* 1257 – приготавливали из суспензии суточной культуры микроорганизма. Для ее приготовления выращивали культуру на мясо-пептонном агаре в течение 24 ч, затем производили смыв стерильным физиологическим раствором, устанавливали по стандарту оптической плотности концентрацию 10^9 микробных клеток \cdot мл $^{-1}$. Затем путем десятикратных разведений готовили суспензии, содержащие от 10^8 до 10^7 микробных клеток \cdot мл $^{-1}$ (м. к./мл).

Подготовка Колифага MS-2 – штаммы, полученные в институте ГосНИИгенетика, разводили 2, 4, 8 и 16 раз, после чего каждый раз отбирали пробы.

Методика подготовки образцов вируса оспы кролика аналогична методике, приведенной в работе [2].

ЭКСПЕРИМЕНТ

Были исследованы спектры пропускания вируса оспы кролика в различных растворах (вода, спирт, белково – цитратного раствор при следующих концентрациях: концентрации вирусов от 10^0 до 10^9 кл. \cdot мл $^{-1}$).

Эксперимент проводили следующим образом (рис. 1). Лазерное излучение от источников (последовательно с длиной волны 670, 810, 1027 нм) (1) по одномодовому оптическому волокну (5) поступало к кювете с соответствующим раствором (2). Из кюветы излучение поступало по многомодовому оптоволокну (6) на вход спектроанализатора “Agilent” со спектральным разрешением 0.05 нм, или “Yokogawa” с разрешением 0.01 нм, оснащенных встроенным микрокомпьютером (3) для обработки и передачи спектров в память компьютера (4). В отличие от установки, приведенной в работе [1], связь через оптические волокна

позволяла выводить на компьютер, как излучение от одной кюветы, так сразу от трех и таким образом сравнивать эксперименты, проведенные одновременно, и исследовать динамику образования спектральных характеристик. Кюветы наполняли предварительно подготовленными растворами, содержащими подвергаемые контролю объекты. Излучение с блока лазеров одновременно или поочередно подается на кювету с образцом, рассеянное раствором излучение собирающей оптикой направляется на спектроанализатор и далее через последовательный порт спектральные распределения передаются в память компьютера. Готовые спектральные распределения передаются на компьютер, где происходит их обработка. Спектральные распределения с накоплением по 10, 20, 50 для каждой концентрации оспы кролика или смеси Колифаг MS-2, *E.coli* 1257 снимались на протяжении 20–30 минут, в непрерывной динамике и дискретно, (с шагом 1 мин). Суммарная база спектральных распределений основывалась на 500 спектрах.

На рис. 2 в качестве примера представлены спектры проходящего излучения вируса оспы кролика в различных растворителях, длина волны возбуждения 810 нм, распределения нормированы по интенсивности на максимум. Аналогичные спектральные распределения получены и для длин волн 670 и 1017 нм.

Для проверки возможности диагностики сложных биомолекул в растворах, содержащих микрочастицы, были сняты спектры смеси колифага MS-2, и *E. coli* 1257 в различных растворителях. На рис. 3 предстален пример спектров MS-2, и *E. coli* 1257 в белково-цитратном растворе для длины возбуждения 810 нм; 1 – пик соответствующий соответствующий *E-coli*, 2 – пик соответствует колифагу MS-2, 3 – пик, соответствующий лазерному излучению, 4 – шум.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании спектров вируса оспы кролика (рис. 2) генерация дополнительной линии наблюдалась на всех длинах волн. Для длины лазерного излучения 670 нм наблюдалось полное поглощения второй моды излучения лазера и усиление третьей, пропорционально логарифму концентрации вируса, что свидетельствует, о том, что именно вирус является источником этого явления. При этом степень поглощения слабо зависит от типа растворителя, если растворителем является КРС или спирт. В случае если растворителем является вода, уменьшается общая мощность генерации моды.

Анализ спектральных составляющих лазера на длине волны 810 нм, показал, что спектральные распределения составов вируса с растворителем, сильно отличаются от спектральных распределений чистых растворителей. Однако максимум из-

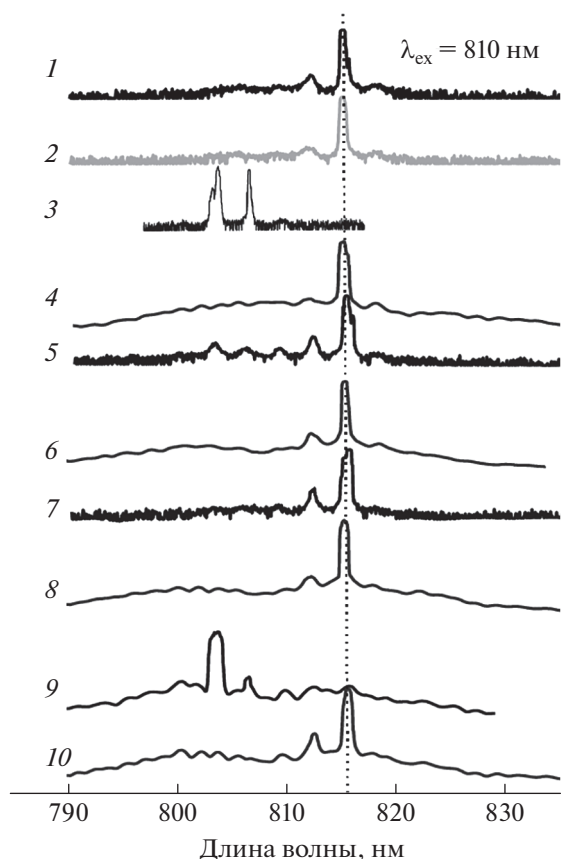


Рис. 2. Спектры излучения вируса оспы кролика в различных растворителях, длина волны возбуждения 810 нм; 1 – спектр лазерного излучения, 2 – спектр кюветы, 3 – спектр этилового спирта, 4 – спектр вируса в спирте, 5 – спектр белково-цитратного раствора, 6 – спектр вируса в белково-цитратном растворе, 7 – спектр сыворотки крови КРС, 8 – спектр вируса в сыворотки крови КРС, 9 – спектр воды, 10 – спектр вируса в воде.

лучения совпадает с максимумом излучения лазера, а интенсивность при наличии вируса возрастает. Это говорит о том, что длина волны 810 является резонансной для этого объекта. Однако, как показывают наши предыдущие исследования, данная длина волны является резонансной для любого типа возбудителей ДНК, имеющей строение близкое к вирусу и скорее всего во всех объектах только одна связь (С–N) дает вклад в появление нелинейного эффекта (ВРМБ).

Анализ экспериментальных данных для длины возбуждения 1017 нм показал, что во всех спектрах сред без вируса сохраняется линия возбуждающего излучения с длиной волны 1017 нм. За исключением воды, в спектрах сред с вирусами эта линия исчезает. Для этой длины волны, в среде содержащей вирус возникает генерация излучения, которая производит преобразование линии с длиной волны 1017 нм в линию с длиной волны 1023 нм, логарифм интенсивности которого является функцией концентрации вируса, а величина волнового сдвига

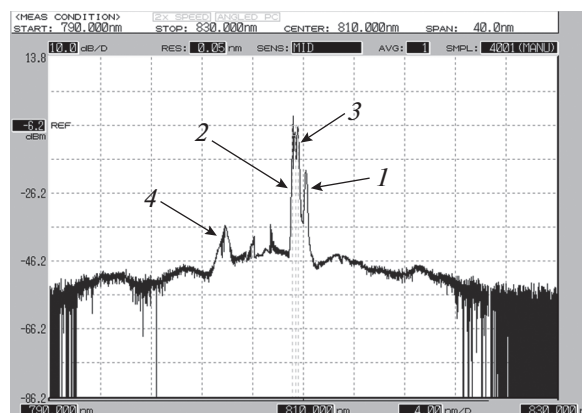


Рис. 3. Пример спектра смеси *E. coli* и колифага MS-2 в белково-цитратном растворе для длины возбуждения 810 нм; 1 – пик соответствующий *E. coli*, 2 – пик колифагу MS-2, 3 – длине волны лазерного излучения, *E. coli* 1257 4 – шум.

не зависит от типа растворителя. Интенсивность нового пика генерации зависит от растворителя в высокой степени. Зависимость величины интенсивности от концентрации объектов носит логарифмический характер при низких и средних концентрациях вируса, для всех типов длин волн. При высоких концентрациях ($>10^6$ кл · мл⁻¹) эффект несколько ослабевает и приводит к ухудшению отношения “сигнал/шум”. Полный анализ данных показал, что наилучшими растворителями являются спирт и КРС, очевидно вследствие более высокой поляризуемости молекул в этих средах.

Исследование нескольких компонентов в растворах сложной структуры, выявило отличие этих распределений от спектров в воде. Не смотря на то, что разность частот между основной лазерной модой и стоксовой составляющей оставалась постоянной и не зависела от типа раствора, динамика и интенсивность спектральных распределений отличалась. Сначала появлялись несколько пиков, интенсивность которых зависела только от концентрации. Потом интенсивность одного из пиков начала уменьшаться, а другого увеличиваться. Через несколько минут картина стабилизировалась.

На рис. 3 представлен спектр раствора через десять минут после начала наблюдения. Мы наблюдали как бы “перекачку” энергии из одного объекта в другой (*E. coli*, в колифаг MS-2). Линейная зависимость от концентрации исчезала. Это явление необходимо учитывать при разработке автоматизированного программного диагностического комплекса.

При этом замечено, что статистический анализ экспериментальных данных различных объектов [3] спектров длинных полимеров, и массивных биологических молекул, таких как ДНК, нуклеиновые кислоты имеют провал аналогичный провалу Лэмба. Этот эффект повышает веро-

ятность распознавания наличия этих элементов даже не в однородном растворе.

Моча имеет сложный состав, (аминокислоты, кетоновые тела, креатин гиппуровая кислота). Диагностика такого многокомпонентного раствора может внести шум и, как следствие, понизить точность определения результатов. При исследовании смеси объектов, мы наблюдали остаточные пики (4), которые связаны с неоднородностью раствора. Однако отношение интенсивности в максимуме этих спектральных распределений к отношению интенсивности исследуемого объекта составляла 10^{-40} , что конечно не уменьшает вероятность распознавания. Шум вызван микровключениями растворителя, а исследуемые объекты представляет собой наноструктуры.

Пояснить это можно следующим образом: ВРМБ является процессом неупругого рассеяния света на акустических фонах, генерируемых за счет взаимодействия падающей волны и волны вынужденной люминесценции. При этом при распространении по длинному периодическому объекту рассеянное излучение лавинообразно нарастает, поскольку модуляция показателя преломления оптической среды осуществляется по закону бегущей волны. В то время как для компактного объекта, микрообъекта, усиление нарастает медленнее и интенсивность его на порядки меньше.

Для того чтобы сократить количество экспериментов, разработать оптимальную схему обработки сигнала было проведено теоретическое исследование и построена модель в программе Comsol [4] с целью оценить соотношение интенсивностей в максимуме стоковых составляющих объекта и шума. Для оценки был выбран метаболит Methanethil (также известный как метилмеркаптан), который представляет собой сероорганическое соединение с химической формулой CH_3SH бесцветный газ и имеет быстро рвущуюся связь между серой и углеродом. Гиппуровая кислота $\text{C}_2\text{H}_6\text{S}_2$ так же имеет такую связь, но температура плавления ее гораздо выше, поэтому в моче она находится в микрокристаллическом состоянии.

Для того чтобы учесть спиралевидность и движение метаболита мы применили метод эффективного поля. В нашем рассмотрении определение “эффективного поля” предполагает введение вспомогательного многокомпонентного поля [4].

Геометрия модели построена следующим образом: систему водный раствор, содержащую нанообъекты, мы представили в виде наностержней (расстояние между которыми меньше длины волны) с периодическими оптическими и упругими свойствами. По системе распространяется излучение, создающее поле от сложения вынужденной люминесценции после разрыва связи из-за возбуждения когерентным источником и поле когерентного источника. Волна от лазера накачки и волна от вынужденной люминесценции взаимодействуют

при входе в начало спирали метаболита и начинают распространяться по спирали, Образованный таким образом вращающийся источник излучения распространяется по неподвижному стержню. Однако, в отличие от модели, приведенной в работе [3] мы добавили шарообразные частицы с параметрами материала соответствующего гиппуровой кислоте $\text{C}_2\text{H}_6\text{S}_2$ на пути распространения волны.

Расчеты показали, что лавинообразное нарастание стоковых составляющих характерно в основном для метилмеркаптана. Отношение логарифма интенсивности (дБм) в максимуме пика метилмеркаптана к гиппуровой кислоте составляло 30 и практически не зависело от концентрации. Это объясняется тем, что на механические свойства и как следствие на усиление фоновой волны влияет в основном структурное и фазовое состояние объекта: микро и или наносостояние, фрактальная размерность, анизотропия наноструктуры, а именно отношение длины цепочки нанокompозита к ее толщине, которое для метилмеркаптана много больше, чем для микровключений в моче. При этом изменение механических свойств определяется в основном не собственно анизотропией наполнителя, а способностью матрицы (собственно коллоидного раствора) отразить эту анизотропию, в то время как микроструктуры изменяют эту матрицу, не отражая анизотропию микровключения [5].

Данные оценки величины относительной интенсивности исследуемых составов позволяют допустить простую алгоритмизацию распознавания наличия метаболитов в сложном растворе и, как следствие, возможность создания автоматизированного диагностического комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплекс исследований позволяет допустить не только устойчивое распознавание нескольких метаболитов в растворе, но и возможность автоматизации этого процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <https://www.intechopen.com/books/poisoning-from-specific-toxic-agents-to-novel-rapid-and-simplified-techniques-for-analysis/optical-express-methods-of-monitoring-of-pathogens-in-drinking-water-and-water-based-solutions>.
2. Могильная Т.Ю., Ботиков А.Г., Агibalов А.А. // Изв. РАН. Сер. физ. 2018. Т. 82. № 8. С. 1158; *Moguilnaya T.Y., Botikov A.G., Agibalov A.A.* // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2018. V. 82. № 8. P. 1052.
3. Могильная Т.Ю., Бобков П.В. // Приборы. 2018. № 3. С. 40.
4. Могильная Т.Ю., Шулепко Н.М., Шерышев А.Е. // Приборы. 2015. № 7. С. 36.
5. Долбин И.В. В кн.: VI международная конференция “Химия твердого тела и современные микро- и нанотехнологии”. (Кисловодск–Ставрополь, 2006). 510 с.