

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Cheminės fizikos institutas

Edvinas Zacharovas

PAVIRŠIAUS SUSTIPRINTOS RAMANO SKLAIDOS METODO TAIKYMAS ŠLAPIMO
PŪSLĖS VĖŽIO DIAGNOSTIKAI

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Aplinkos ir cheminės fizikos
studijų programa

Studentas

Edvinas Zacharovas

Leista ginti

2020-06-01

Darbo vadovas

dokt. Martynas Velička

Instituto direktorius

prof. dr. (HP) Valdas Šablinskas

Vilnius 2020

Turinys

Įvadas.....	3
1. Teorinė dalis	5
1.1. Vėžinės ligos	5
1.2. Šlapimo pūslės vėžys.....	7
1.3. Cistitas	10
1.4. Ramano sklaidos spektroskopija	11
1.5. Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida	13
1.5.1. Cheminio stiprinimo modelis	14
1.5.2. Elektromagnetinio stiprinimo modelis	16
1.6. Optinės metalų savybės	17
1.6.1. Metalų dielektrinė funkcija.....	17
1.6.2. Nanodalelių dydis, forma ir agregacija.....	19
1.7. Principinių komponentų analizė	21
2. Eksperimentinė dalis	24
2.1. Koloidinių tirpalų paruošimas	24
2.1.1. Sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų sintezė	24
2.1.2. Koloidinių tirpalų centrifugavimas.....	24
2.2. Bandinių paruošimas	25
2.3. SERS spektriniai tyrimai	25
2.4. Spektrų registravimo įranga	26
3. Rezultatai	28
3.1. Sidabro nanodalelių koloidiniai tirpalai	28
3.1.1. Nanodalelių charakterizavimas.....	28
3.1.2. Koloidinių tirpalų efektyvumo įvertinimas	30
3.2. Šlapimo pūslės mėginių SERS tyrimai.....	32
3.2.1. Šlapimo pūslės audinių spektrinė analizė.....	33
3.2.2. Šlapimo pūslės tarpląstelinio skysčio sluoksnių spektrinė analizė.....	35
3.2.3. Šlapimo pūslės nuoplovų spektrinė analizė.....	40
3.3. SERS spektrinių duomenų statistinė analizė	42
Pagrindiniai rezultatai ir išvados	45
Literatūra	46
Santrauka	51
Summary.....	52
Priedas	

Įvadas

Šlapimo pūslės vėžys yra 10-oji dažniausiai diagnozuojama vėžio forma Lietuvoje ir visame pasaulyje. Šia vėžio rūšimi serga apie 4 kartus daugiau vyrų nei moterų [1]. Prognozuojama, kad iki 2030 metų Lietuvoje naujų šlapimo pūslės vėžinių susirgimų skaičius padidės 16 % vyrų atveju, o moterų – 62 % [2].

Klinikiniuose tyrimuose šlapimo pūslės vėžio diagnostikai dažniausiai naudojami cistoskopijos (šlapimo pūslės endoskopijos) ir šlapimo pūslės ląstelių citologijos (šlapimo ar šlapimo pūslės nuoplovų histologinio tyrimo) metodai [3]. Šie metodai yra efektyvūs diagnozuojant didelio diferenciacijos laipsnio navikinius darinius, tačiau pasižymi mažu jautrumu mažo piktybiškumo ir ankstyvos stadijos navikams. Be to, citologinio tyrimo metu nustatytas navikas gali būti bet kurioje šlapimo pūslės vietoje. Todėl chirurginių šlapimo pūslės operacijų metu gali būti sunku greitai ir tiksliai nustatyti auglio lokaciją bei jo išplitimo ribas. Dėl šios priežasties gali būti pašalinta didesnė sveiko audinio dalis ar ne visas auglys. Šie veiksniai lemia suprastėjusią gyvenimo kokybę pooperaciniu laikotarpiu, didesnę vėžio atsinaujinimo tikimybę ir kitas komplikacijas. Cistoskopijos metu tam tikrais atvejais sudėtinga atskirti vėžinius šlapimo pūslės gleivinės epitelio (urotelio) ląstelių pokyčius (karcinomą *in situ*) nuo įvairių pažeidimų bei uždegiminių ligų, tokių kaip cistitas [4]. Navikas, kurį sudaro tokio tipo ląstelės, yra neinvazinis, bet agresyvus ir gali išplisti už šlapimo pūslės gleivinės ribų. Todėl ankstyvas naviko nustatymas yra būtinas, siekiant nuslopinti vėžio progresavimą. Taigi, efektyviam šlapimo pūslės ir kitų šlapimo sistemos organų vėžinių susirgimų identifikavimui bei aiškių ribų tarp sveiko ir navikinio audinio nustatymui reikalingi nauji patikimi diagnostikos metodai, kurie įgalintų spartų ir tikslų mėginių charakterizavimą.

Naviko augimas ir metastazavimas lemia tam tikrų organizmo molekulių koncentracijų pokyčius. Šie kitimai gali būti stebimi atliekant kiekybinę ir kokybinę biologinių skysčių analizę. Vienas iš tokių skysčių, kurio sudėties pokyčiai gali būti siejami su vėžiniais susirgimais, yra audinio tarpląstelinis skystis [5]. Jis yra susijęs su ląstelės metabolizmo procesams būtinų maistinių medžiagų tiekimu į ląsteles ir metabolitų pašalinimu iš jų. Tarpląstelinio skysčio sluoksniai formuojami audinio mėginį prispaudžiant ir atitraukiant nuo tyrimams skirto bandinio padėklo. Tokiu būdu suformuoto tarpląstelinio skysčio sluoksnyje gali būti aptinkamos ir pavienės audinio ląstelės. Dėl šios priežasties tarpląstelinio skysčio tyrimai suteikia informaciją ne tik apie audinį sudarančių ląstelių medžiagų apykaitos pokyčius, bet ir apie pačių ląstelių morfologinius skirtumus.

Patologiniai šlapimo pūslės pakitimai taip pat nustatomi tiriant į šlapimo pūslę suleisto ir iš jos išleisto fiziologinio skysčio mėginį – šlapimo pūslės nuoplovas. Šiame skystyje aptinkamos įvairios organinės ir neorganinės medžiagos, pavienės šlapimo pūslės ląstelės ar net urotelio fragmentai [6].

Todėl analizuojant šlapimo pūslės nuoplovas ir jas sudarančius komponentus galima identifikuoti vėžinius susirgimus bei kitus šlapimo pūslės sutrikimus.

Molekulių kiekio kitimo, kurį nulemia vėžiniai susirgimai, nustatymui yra tinkamos molekulių virpesinės spektroskopijos metodikos. Tarp jų ir paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (SERS) metodas, kuris suteikia galimybę nagrinėti tiriamo bandinio cheminę sandarą ir jį sudarančių molekulių struktūrą [7]. Naudojant šį metodą, analitės molekulėms priartėjus prie metalo-dielektriko fazių ribos ar joms adsorbuojantis ant metalo paviršiaus stiprinamas jų Ramano sklaidos signalas. SERS aktyviems paviršiams formuoti dažnai naudojami tauriųjų metalų nanodalelių koloidiniai tirpalai. Šių koloidinių tirpalų sluoksnių efektyvumas priklauso nuo koloidinių tirpalą sudarančių metalo nanodalelių dydžio, formos, koncentracijos, metalo prigimties ir kitų veiksnių. Koloidinių tirpalų sintezės metodikų optimizavimas yra svarbus procesas, galintis pagerinti SERS tyrimų kokybę. Taigi, pritaikius SERS spektroskopijos metodą biologinių audinių ir skysčių tyrimams, ši metodika galėtų turėti tiesioginį taikymą onkologinių susirgimų diagnostikoje.

Šio darbo tikslas – pritaikyti SERS metodą šlapimo pūslės navikų identifikavimui.

Tikslui pasiekti iškeltos tokios užduotys:

1. Nustatyti optimalų koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų paruošimo būdą.
2. Užregistruoti skirtingų pacientų šlapimo pūslės audinių, jų tarpląstelinio skysčio ir šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrus bei nustatyti spektrinius šlapimo pūslės vėžio žymenis.
3. Įvertinti SERS metodikos tinkamumą šlapimo pūslės naviko identifikavimui.

1. Teorinė dalis

1.1. Vėžinės ligos

Vėžys – tai onkologinė liga, kurią sukelia nekontroliuojamas organizme esančių ląstelių dauginimasis. Įprastą ląstelių dalijimosi ciklą bei jo reguliavimo procesą sutrikdyti gali ląstelės genetiniai pokyčiai – ją sudarančių DNR (deoksiribonukleorūgšties) molekulių pažeidimai, genetinės medžiagos praradimai (delecijos), chromosomų segmentų apsikeitimai vietomis (translokacijos) ir kitos chromosomų struktūrinės mutacijos [8]. Šie genetinės medžiagos pakitimai gali būti paveldimi arba sukelti išorinių veiksnių: kancerogeninį poveikį turinčių cheminių junginių, jonizuojančiosios spinduliuotės, infekcinių ligų. Dėl atipinės ląstelių proliferacijos (dalijimosi), ligos vystymosi eigoje susiformuoja pakitusių ląstelių dariniai, vadinami augliais ar navikais (angl. *tumor*). Navikai skirstomi pagal juos sudarančių pakitusių ląstelių kilmę. Išskiriami keturi pagrindiniai jų tipai – karcinoma, sarkoma, leukemija ir limfoma. Karcinomomis vadinami navikai, kurie yra kilę iš epitelio ląstelių ir sudaro apie 90 % visų žmonių vėžinių susirgimų. Sarkomos išsivysto iš jungiamąjį audinį (kaulus, raumenis, kremzles ir kitus audinius) sudarančių ląstelių. Leukemiją sukelia kaulų čiulpuose gaminamos navikinės kraują sudarančios ląstelės (leukocitai), o limfomą – nekontroliuojamai besidauginančios limfinės sistemos ląstelės (limfocitai) [9]. Navikai taip pat gali būti klasifikuojami pagal jų lokaciją organizme, organą, kuriame susidaro auglys, bei atitinkamą audinį sudarančias skirtingos rūšies ląsteles (pavyzdžiui, epitelinio audinio plokščiašias, pamatines ar kitas ląsteles).

Navikinės ląstelės pasižymi neribotu dalijimusi, galimybe daugintis be išorinių signalų, atsparumu augimą slopinantiems veiksniams ir apoptozei (genetiškai užprogramuotai ląstelės mirčiai), gebėjimu skatinti organizmą formuoti naujas kraujagysles, aprūpinančias naviką maistinėmis medžiagomis (angiogenezė), bei genomo pokyčiais [10]. Šių ląstelių sankaupos yra skirstomos į gerybinius (angl. *benign*) ir piktybinius (angl. *malignant*) auglius. Nepiktybiniai navikai pasižymi sąlyginai lėtu augimu, juos sudarančios ląstelės nesiskverbia į gretimus organus ir neplinta į kitas organizmo vietas. Tačiau didėdami gerybiniai augliai gali spausti aplinkinius nervus, kraujagysles, audinius bei organus, sutrikdyti jų funkcionavimą ir tokiu būdu sukelti žalą organizmui. Piktybiniais navikams yra būdingas invazinis augimas, kurio metu vėžinės ląstelės skverbiasi į aplinkinį audinį. Be to, piktybinį auglį sudarančios ląstelės gali atsiskirti nuo pirminio ligos židinio ir patekti į kraujotakos bei limfinę sistemas. Tokiu būdu vėžinės ląstelės gali paplisti po visą kūną ir sveikuose audiniuose bei organuose formuoti naujus antrinius navikinius darinius, vadinamus metastaziniais augliais. Metastazės yra pagrindinė mirštamumo nuo vėžio priežastis ir sudaro apie 90 % mirčių nuo vėžio [11].

Piktybiniai navikai bei jų išplitimas organizme apibūdinami penkiomis pagrindinėmis vėžio stadijomis. Nulinė (0) arba ikivėžinė stadija nustatoma pacientams, kurių atitinkamose organizmo vietose stebimos pakitusios ir galimai vėžinės ląstelės ar jų grupės, esančios pirminėje jų susiformavimo vietoje. Pirmajai (I) arba ankstyvajai vėžio stadijai būdingi maži augliai, kurie nėra peraugę į aplinkinį audinį ir išplitę į kitas organizmo vietas. Antrajai (II) ir trečiajai (III) stadijoms priskiriami didesni navikai, kurie yra išplitę į gretimus limfmazgius ar audinius, o ketvirtajai (IV) – toli nuo pirminio auglio metastazavę navikai. Kiekviena vėžio stadija gali būti detalizuojama naudojant trijų pagrindinių parametrų TNM (angl. *tumor-node-metastasis*) sistemą. Remiantis šia klasifikacija yra nustatomas naviko dydis ir jo vietinis išplitimas (T), vėžinių ląstelių išplitimas artimuosiuose limfmazgiuose (N) ir naviko metastazės (M) (žr. 1 lentelę) [12].

1 lentelė. Vėžio klasifikacija pagal TNM sistemą [12].

Parametras	Kategorija	Aprašymas
T	TX	Naviko negalima įvertinti
	T0	Naviko nėra
	Tis	Navikas <i>in situ</i>
	T1, T2, T3, T4	Naviko dydis (kuo parametro T skaičius didesnis, tuo navikas yra didesnis ir labiau išplitęs)
N	NX	Limfmazgių negalima įvertinti
	N0	Artimuosiuose limfmazgiuose metastazių nėra
	N1, N2, N3	Metastazės artimuosiuose limfmazgiuose (kuo parametro N skaičius didesnis, tuo antrinis navikas yra didesnis ir labiau išplitęs)
M	M0	Nėra tolimų metastazių
	M1	Metastazės kituose audiniuose ar organuose už artimųjų limfmazgių ribų

Priklausomai nuo vėžio tipo, auglio išplitimas gali būti tikslinamas naudojant papildomus parametrus (Tis, Ta, T2b ir kitus). Tam tikro naviko TNM derinys, nustatytas prieš taikant gydymą, vadinamas klinicine TNM klasifikacija arba cTNM. Po chirurginių procedūrų atliekami naviko mėginio histologiniai (mikroskopinės sandaros) tyrimai ir nustatomas vėžinių ląstelių diferenciacijos (piktybiškumo) laipsnis (G), kuris parodo, kiek jos yra pakitusios, lyginant su sveikomis pradinėmis ląstelėmis. Kuo ląstelių piktybiškumas yra didesnis, tuo navikas auga greičiau ir ligos eiga agresyvesnė. Šis papildytas TNM parametrų rinkinys yra vadinamas patologine TNM klasifikacija (pTNM) [13]. Išsamus naviko stadijos įvertinimas yra būtinas norint kuo tiksliau prognozuoti naviko vystymosi eigą ir parinkti tinkamą ligos gydymo metodą.

Onkologinių susirgimų diagnostikoje naujų bei recidyvavusių (atsinaujinusių) navikinių darinių nustatymui naudojami radiologiniai vaizdinimo metodai (magnetinio rezonanso tomografija, kompiuterinė tomografija, rentgenografija, echoskopija, endoskopija ir kitos metodikos), atliekama

biopsinės medžiagos analizė bei laboratoriniai žmogaus organizme susiformavusių skysčių (kraujo, šlapimo, seilių, tarpląstelinio skysčio ir kitų) tyrimai. Vėžiui progresuojant, žmogaus biologinius skysčius sudarančių cheminių medžiagų koncentracija kinta. Šiuos pokyčius lemia neįprastas navikinių ląstelių metabolizmas: pakitę molekulių sintezės procesai, padidėjęs ląstelių maistinių medžiagų poreikis, jų kaupimas ir kiti veiksniai. Molekuliniai dariniai, pagal kurių koncentracijos pokyčius galima diagnozuoti vėžį, vadinami vėžio žymenimis. Tai gali būti įvairios molekulės, tokios kaip DNR, RNR, baltymai, fermentai, metabolitai bei daugelis kitų.

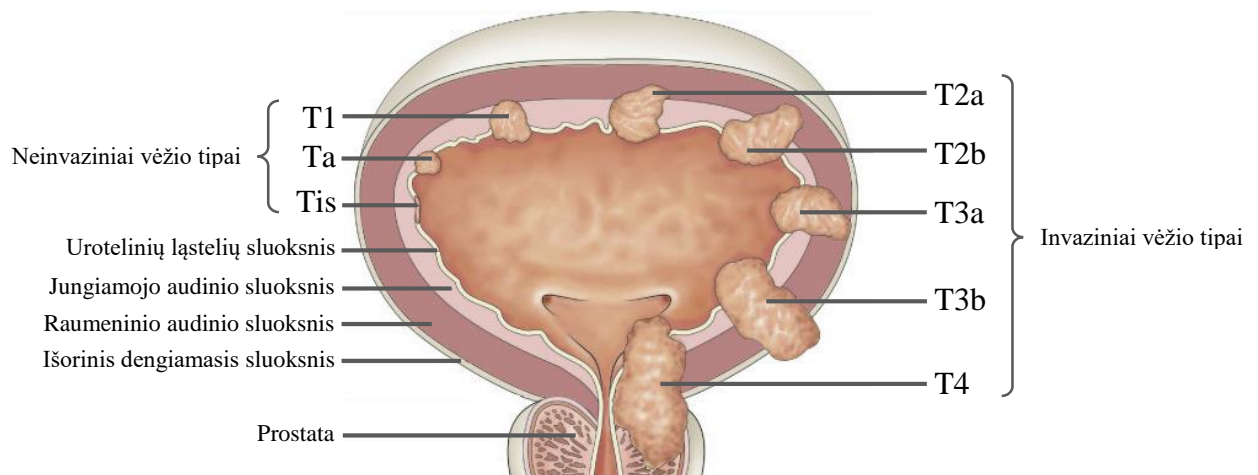
Vėžio žymenų identifikavimui yra tinkamos molekulių virpesinės spektroskopijos metodikos, kadangi jos suteikia informaciją apie tiriamo bandinio cheminę sudėtį. Šie metodai sėkmingai taikomi eksperimentiniuose biologinių skysčių kokybiniuose ir kiekybiniuose tyrimuose, siekiant nustatyti navikus skirtingose organizmo vietose [14]. Tačiau taikant standartinės virpesinės spektroskopijos metodus (pavyzdžiui, įprastą Ramano sklaidos spektroskopiją) dažnai susiduriama su problema – pernelyg mažu registruojamo signalo intensyvumu. Tokiu atveju, eksperimentiniuose spektruose dėl mažo signalo/triukšmo santykio, sunku išskirti juose esančias virpesines juostas. Ligos ar kito sveikatos sutrikimo atveju tam tikrų žmogaus organizme esančių molekulių koncentracija pakinta nežymiai, todėl biologinių bandinių virpesinių spektrų analizavimas ir tikslių rezultatų nustatymas yra sudėtingas procesas. Taip pat spektro kokybę blogina bei virpesinių juostų interpretaciją apsunkina mažas bandinio (naviko mėginio, tam tikro biologinio skysčio ar kitų) kiekis bei pernelyg plonas suformuotas tiriamosios medžiagos sluoksnis. Dėl to vėžinių žymenų nustatymui galima taikyti registruojamą signalą stiprinančius ir mažos koncentracijos bandinių tyrimams tinkamus virpesinės spektroskopijos metodus. Vienas iš tokiu metodų – paviršiaus sustiprinta Ramano sklaidos spektroskopija. Buvo nustatyta, kad šis tiriamo bandinio cheminės struktūros ir sandaros pokyčiams jautrus metodas gali būti naudojamas plaučių vėžio diagnostikai analizuojant seiles [15], krūties vėžio nustatymui tiriant šlapimo mėginius [16], inkstų vėžio identifikavimui analizuojant inkstų audinio tarpląstelinį skystį [17], nuo pirminio naviko atsiskyrusių vėžinių ląstelių aptikimui kraujyje [18] ir kitais vėžinių susirgimų atvejais.

1.2. Šlapimo pūslės vėžys

Žmogaus šlapimo organų sistemą sudaro inkstai, šlapimtakiai, šlapimo pūslė ir šlaplė. Inkstai išskiria iš vandens, druskų, metabolitų ir kitų perteklinių bei kenksmingų medžiagų sudarytą šlapimą, kuris per šlapimtakius patenka į šlapimo pūslę. Šis dubens apačioje esantis tuščiaviduris ir elastingas raumeninis organas atlieka šlapimo kaupimo ir šlapinimosi kontrolės funkcijas. Šlapimo pūslės sienelę sudaro keturi sluoksniai: vidinis gleivinės pereinamųjų epitelio (urotelio) ląstelių sluoksnis, pogleivinis jungiamojo audinio sluoksnis (lot. *lamina propria*), raumeninio audinio sluoksnis

(lot. *muscularis propria*) ir išorinis šlapimo pūslę dengiantis serozinis sluoksnis. Šlapimą nuo kraujotakos sistemos ir sienelę sudarančių audinių skiria daugiasluoksnio urotelio paviršinės ląstelės, kurios atlieka barjerinę funkciją ir neleidžia šlapimą sudarančioms toksiškoms medžiagoms būti reabsorbuotoms į kraują [19].

Šlapimo pūslės vėžys yra vienas iš labiausiai paplitusių šlapimo sistemos organų piktybinių navikų. Urotelinių ląstelių karcinoma yra dažniausiai diagnozuojamas šlapimo pūslės vėžio histologinis tipas, kuris nustatomas apie 90 % visų šlapimo pūslės vėžiu sergančių pacientų. Likusią susirgimų dalį sudaro retesni vėžiniai šlapimo pūslės susirgimai: plokščialąstelinė karcinoma, adenokarcinoma (liaukinių šlapimo pūslės ląstelių vėžys), smulkiųjų ląstelių karcinoma bei mišraus tipo navikai [20]. Išskiriamos dvi pagrindinės šlapimo pūslės vėžio kategorijos – neinvazinis (angl. *non-muscle invasive bladder cancer* arba NMIBC) ir invazinis (angl. *muscle invasive bladder cancer* arba MIBC) vėžys (žr. 1 pav.).



1 pav. Šlapimo pūslės sandara ir šlapimo pūslės vėžio stadijos pagal TNM sistemos klasifikaciją.
Adaptuota pagal [21].

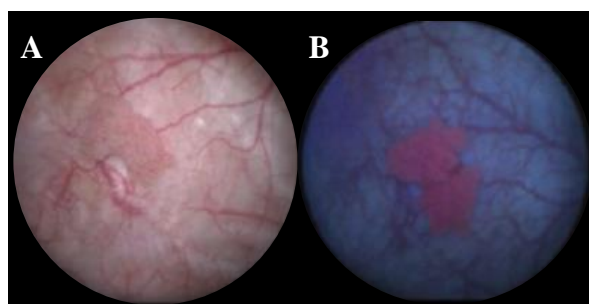
Navikai, priskiriami NMIBC kategorijai, yra klasifikuojami į karcinomą *in situ* (Tis arba CIS), papilinę karcinomą (Ta) bei į pogleivinio jungiamojo audinio sluoksnį išplitusį auglį (T1). Neinvazinio tipo navikai sudaro apie 75 % visų diagnozuojamų šlapimo pūslės vėžio atvejų. Kai piktybinis navikas išplinta į raumeninio audinio sluoksnį (T2), už jo ribų (T3) ar į gretimus organus (T4), jis yra laikomas invaziniu ir priskiriamas MIBC kategorijai [22].

Didžiąją dalį šlapimo pūslės vėžinių susirgimų sukelia kancerogeninės medžiagos, patekusios į kvėpavimo takus, virškinimo sistemą ar ant odos paviršiaus. Tabako dūmai ir juos sudarančios kenksmingos medžiagos (nitrozaminai, 2-naftilaminas ir kitos) yra vienas iš pagrindinių šlapimo pūslės vėžio rizikos veiksnių, lemiantis apie 50 % visų susirgimų. Kitas svarbus rizikos faktorius yra cheminių medžiagų, išsiskiriančių dažų, gumos, metalo, kuro bei panašiose gamybos ar perdirbimo

pramonės srityse, poveikis organizmui. Taip pat nustatyta, jog padidėjęs chloro bei arseno kiekis geriamajame vandenyje, uždegiminės (lėtinis cistitas) ir parazitinių kirmėlių sukeltos ligos (šistosomozė) padidina šlapimo pūslės vėžio išsivystymo tikimybę [23].

Kraujas šlapime (hematurija) – dažniausias šlapimo pūslės vėžio simptomas. Padažnėjęs ar pertraukiamas šlapinimasis, šlapimo nelaikymas bei skausmas jo šalinimo metu (dizurija) taip pat gali indikuoti šlapimo pūslės vėžį. Ligai progresuojant bei navikui metastazuojant pacientams gali pasireikšti pilvo, dubens, kaulų skausmai, organizmo išsekimas (kacheksija), anoreksija, inkstų nepakankamumas, kvėpavimo takų negalavimai, skysčių kaupimasis galūnėse (edema) ir kiti sveikatos sutrikimai [24].

Pagrindiniai šlapimo pūslės vėžio nustatymui naudojami diagnostiniai metodai yra cistoskopija ir šlapimo pūslės ląstelių citologinis tyrimas. Cistoskopija – tai šlapimo pūslės endoskopinė apžiūra. Šio invazinio metodo taikymo metu per šlaplę į šlapimo pūslę įvedamas optinę sistemą turintis prietaisas, vadinamas cistoskopu, ir vizualiai įvertinami vidinės šlapimo pūslės dalies pokyčiai. Procedūros metu gali būti naudojami fotosensibilizatoriai, skatinantys selektyvią naviko fluorescenciją (žr. 2 pav.). Cistoskopai yra pritaikyti biopsijos procedūrai, kurios metu tolimesniems tyrimams gali būti paimti pakitusios šlapimo pūslės gleivinės audinio mėginiai [25]. Priklausomai nuo naviko tipo ir stadijos, cistoskopijos jautrumas (gebėjimas nustatyti susirgimą) gali siekti iki 85 %. Tačiau ši metodika pasižymi mažu jautrumu ankstyvos stadijos navikams bei karcinomai *in situ* (neaptinkama apie 20 % atvejų) ir ją taikant sudėtinga atskirti gerybinius pakitimus ir piktybinius navikus.



2 pav. Baltos šviesos cistoskopijos (A) ir mėlynos šviesos cistoskopijos (fluorescencinės arba fotodinaminės diagnostikos) (B) metu gauti šlapimo pūslės naviko vaizdai. Adaptuota pagal [26].

Citologiniai šlapimo pūslės ląstelių tyrimai atliekami naudojant paciento šlapimą (savaiminį ar kateterizuotą) arba šlapimo pūslės nuoplovas. Pastarieji mėginiai gaunami cistoskopijos metu arba prieš šią procedūrą per kateterį į šlapimo pūslę suleidžiant ir iš jos išleidžiant atitinkamą kiekį fiziologinio (NaCl) tirpalo. Tolimesnės šių skysčių mikroskopinės analizės metu įvertinami juose esančių ląstelių morfologiniai pokyčiai. Tokiu būdu gali būti nustatyti ikivėžiniai šlapimo pūslės

gleivinės pakitimai bei aptiktos nuo šlapimo pūslės naviko atsiskyrusios vėžinės ląstelės. Vidutinis bendras citologinių šlapimo pūslės ląstelių tyrimų jautrumas yra apie 44 %. Šlapimo pūslės ląstelių citologija yra efektyvi diagnozuojant didelio diferenciacijos laipsnio navikinius darinius, tačiau mažo piktybiškumo laipsnio šlapimo pūslės navikų nustatymo jautrumas siekia tik apie 17 % [3, 27]. Be to, citologinės analizės rezultatams įtaką daro ląstelių koncentracija tiriamajame skystyje, šlapimo takų infekcijos, šlapimo pūslės akmenys ir kiti šlapimo sistemos organų sutrikimai. Tikslesniam šlapimo pūslės vėžinių susirgimų identifikavimui reikalingi nauji vėžio diagnostikos metodai, kurie suteiktų galimybę greitai ir išsamiai charakterizuoti biologinį bandinį bei užtikrintų gautų rezultatų patikimumą.

Viena iš dažniausių chirurginių neinvazinio šlapimo pūslės naviko šalinimo procedūrų, kurios metu išpjauamas visas auglys ir dalis sveiko audinio, vadinama transuretrine šlapimo pūslės naviko rezekcija (TUR) [28]. Invazinio tipo šlapimo pūslės navikai, priskiriami MIBC kategorijai, dažniausiai pašalinami kartu su dalimi ar visa šlapimo pūsle (segmentinė arba radikali cistektomija) [29]. Siekiant sulėtinti šlapimo pūslės vėžio progresavimą, plitimą į gretimus organus ar išvengti ligos atsinaujinimo pacientams taikomas radioterapinis gydymas jonizuojančia spinduliuote ar skiriami chemoterapiniai vaistai, naikinantys vėžines ląsteles.

1.3. Cistitas

Cistitas yra uždegiminė šlapimo pūslės liga. Jis skirstomas į infekcinį ir neinfekcinį cistitą. Infekcinį cistitą sukelia į šlapimo pūslę patekę patogeniniai mikroorganizmai. Dažniausia infekcinio cistito priežastis yra *E. coli* bakterijos. Šios kategorijos liga gali būti klasifikuojama į nekomplikuotą ir komplikuotą. Kai šlapimo pūslė yra struktūriškai normali, jos funkcijos prieš ligą nėra pakitusios, infekcinis cistitas laikomas nekomplikuotu. Tokie rizikos faktoriai, kaip šlapimo pūslės ar šlapimo takų obstrukcija (šlapimo nepraeinamumas), inkstų nepakankamumas, šlapimo pūslėje esantys kateteriai ir kiti, gali lemti padidėjusią pakartotinio susirgimo riziką bei nesėkmingą cistito gydymą. Esant gretutiniams šlapimo sistemos veiklos sutrikimams, cistitas gali būti komplikuotas. Tuo tarpu neinfekcinį cistitą gali sukelti vaistai, jonizuojanti spinduliuotė, į organizmą patekusios įvairios cheminės medžiagos, šlapimo pūslėje esantys svetimkūniai bei ligos (Krono, dubens uždegiminė ligos) [30, 31].

Bakterijos ir kiti ligos sukėlėjai pažeidžia šlapimo pūslės epitelinį audinį dengiantį glikozaminoglikanų sluoksnį ir patį urotelį. Dėl to suprastėja jo apsauginė funkcija ir padidėja tikimybė kenksmingoms šlapimą sudarančioms medžiagoms patekti į gilesnius šlapimo pūslės sienelės sluoksnius. Pirmasis organizmo atsakas į patogeninių mikroorganizmų ar kitų veiksmų sukeltą šlapimo pūslės dirginimą bei sienelės pažeidimus pasireiškia uždegimo forma. Uždegimui

būdingas kraujagyslių išsiplėtimas, padidėjęs jų sienelių pralaidumas, didesnis leukocitų kiekis uždegimo srityje bei įvairių signalų perdavimo procesuose dalyvaujančių mediatorių išskyrimas [30]. Šlapimo pūslės sienelės pažeidimai ir uždegiminė audinių reakcija gali lemti padidėjusį šlapimo pūslės jautrumą, dažną šlapinimąsi, skausmą jo metu, hematuriją, skausmą dubens srityje ir kitus šlapimo pūslės sutrikimus.

Cistito diagnostikoje dažniausiai naudojami šlapimo tyrimai (urinalizė, bakteriologiniai, citologiniai tyrimai), cistoskopija bei radiologiniai vaizdinimo metodai. Tačiau cistoskopijos metu nustatyti šlapimo pūslės gleivinės paraudimai, pažeidimai ar kiti pakitimai gali būti ne tik uždegiminės, bet ir neurologinės, vėžinės kilmės ar įgimtos anomalijos. Tikslios diagnozės nustatymą apsunkina pasireiškiantys simptomai (dizurija, hematurija ir kiti), kurie būdingi ir kitoms šlapimo takų ligoms: šlapimo takų infekcijoms, prostatitui, inkstų akmenims, karcinomai *in situ*. Todėl, siekiant nustatyti gleivinės pokyčių priežastį bei atmesti karcinomos *in situ* galimybę, atliekama biopsijos procedūra ir audinių mėginiai tiriami papildomomis metodikomis. Citologiniai šlapimo ir šlapimo pūslės nuoplovų tyrimai yra jautrūs didelio diferenciacijos laipsnio augliams, tarp kurių yra ir karcinoma *in situ*. Taip yra dėl to, kad didesnio piktybiškumo laipsnio navikai pasižymi didesne ląstelių atsiskyrimo nuo naviko tikimybe. Tačiau šlapimo takų infekcijos taip pat gali daryti įtaką spartesniam urotelinių ląstelių atsiskyrimui nuo šlapimo pūslės sienelės ir šių ląstelių skirtumų nuo displazinių (sutrikusio vystymosi) ar piktybinių ląstelių išskyrimas gali būti sudėtingas. Be to, neigiamas citologinių tyrimų rezultatas neatmeta vėžio tikimybės [32]. Todėl būtini nauji metodai, kurie suteiktų galimybę efektyviai atskirti vėžinį susirgimą nuo kitų šlapimo sistemos organų ligų ar sutrikimų ir sumažinti klaidingos diagnozės tikimybę.

1.4. Ramano sklaidos spektroskopija

Ramano sklaidos spektroskopija yra vienas iš molekulių virpesinės spektroskopijos metodų. Ši metodika yra paremta Ramano sklaida, kurią 1928 m. eksperimentiškai patvirtino indų fizikas C. V. Ramanas (angl. *C. V. Raman*) [33]. Ramano sklaida apibūdinama kaip tam tikro bangos ilgio šviesos sklaida medžiagoje, kurios metu pakinta išsklaidytos spinduliuotės dažnis. Apšvietus bandinį viendažne spinduliuote, įvyksta sąveika tarp tiriamojo bandinio molekulių ir spinduliuotės fotonų. Susidūrimo su fotonu metu, molekulė gali įgauti perteklinės energijos. Dėl to yra įmanomas jos šuolis į virtualųjį energijos lygmenį. Iš jo relaksacija į pagrindinį lygmenį įvyksta po $\sim 10^{-14}$ s ir tuo metu į aplinką yra išspinduliuojamas šviesos kvantas. Išspinduliuoto fotono energija gali būti didesnė, mažesnė ar tokia pati kaip ir sąveiką inicijavusio šviesos kvanto.

Šį efektą ir išspinduliuoto fotono energijos pokyčius galima apibūdinti klasikine mechanikos teorija. Daugiaatomės molekulės yra sudarytos iš elektronų debesėlių ir teigiamą krūvį turinčių

branduolių. Kai molekulės teigiamų ir neigiamų krūvių centrai nesutampa, tokia sistema vadinama dipoliu ir ją galima charakterizuoti fizikiniu dydžiu, vadinamu dipoliniu momentu. Jei krūvių centrai sutampa, molekulės dipolinis momentas yra lygus nuliui ir dipolis gali formuotis tik dėl elektromagnetinio lauko poveikio. Elektromagnetinės bangos elektrinis laukas, kuris veikia molekulę, gali sukelti elektronų debesėlio deformacijas. Tokiu būdu elektromagnetinis laukas gali lemti tiek indukuoto dipolinio momento atsiradimą, tiek jo kitimą ir yra jam proporcingas:

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha E_0 \cos(\omega_0 t), \quad (1)$$

kur proporcingumo koeficientas α nusako molekulės poliarizuojamumą, o nuo laiko priklausanti periodinė funkcija $E = E_0 \cos(\omega_0 t)$ – elektrinio lauko svyravimus. Dydis α parodo erdvinio krūvio gebėjimą deformuotis, veikiant išoriniam elektromagnetiniam laukui. Poliarizuojamumo kitimą gali lemti vyraujantys molekulės virpesiai, kadangi dėl jų kinta jungties tarp molekulės atomų ilgis ar dvisienis kampas tarp jų. Atstumo tarp branduolių kitimas gali būti apibūdinamas kaip nuokrypis nuo pusiausvyros padėties virpesio metu

$$x = x_0 \cos(\omega_v t + \varphi_0), \quad (2)$$

čia φ_0 yra pradinė virpesio fazė. Poliarizuojamumo α Teiloro eilutės skleidinys pusiausvirojo atstumo aplinkoje yra:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{d\alpha}{dx} x + \dots \quad (3)$$

Taigi, indukuotas dipolinis momentas gali būti išreikštas lygtimis:

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha_0 E_0 \cos(\omega_0 t) + \frac{d\alpha}{dx} E_0 x_0 \cos(\omega_0 t) \cos(\omega_v t + \varphi_0) + \dots, \quad (4)$$

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{d\alpha}{dx} \frac{E_0 x_0}{2} \cos(2\pi(\nu_0 - \nu_v)t + \varphi_0) + \frac{d\alpha}{dx} \frac{E_0 x_0}{2} \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_v)t + \varphi_0) + \dots \quad (5)$$

Indukuotąjį dipolinį momentą aprašančioje lygtyje (5) galima išskirti tris skirtingus išsklaidytos spinduliuotės dažnius – ν_0 , $\nu_0 - \nu_v$ ir $\nu_0 + \nu_v$.

Pirmasis indukuotojo dipolinio momento lygties narys aprašo Reilio (angl. *Rayleigh*) sklaidą. Tai yra tamprioji šviesos sklaida. Molekulė po spindulinio šuolio iš virtualaus lygmens grįžta į tą patį pagrindinės elektroninės būsenos virpesinį lygmenį, kuriame ji buvo prieš sąveiką su fotonu. Antrasis narys priskiriamas netampriajai Ramano Stokso (angl. *Stokes*) sklaidai. Ši sklaida įvyksta tuomet, kai fotonas sąveikauja su molekule, esančia žemiausiame nesužadintos elektroninės būsenos virpesiniame lygmenyje, o iš virtualaus lygmens įvyksta relaksacija į sužadintą virpesinį lygmenį. Stokso sklaidos metu išsklaidytos šviesos spektre stebima vadinama ilgabangė Ramano sklaidos spektrinė juosta (Stokso juosta). Trečiasis indukuotojo dipolinio momento lygties narys yra susijęs su anti-Stokso sklaida. Šviesos kvantui sąveikaujant su aukštesnėje virpesinėje būsenoje esančia molekule, yra galimas energinis šuolis iš virtualaus lygmens į žemesnį pagrindinės būsenos virpesinį

lygmenį. Todėl išspinduliuoto fotono dažnis yra didesnis, nei kritusio. Šios sklaidos metu spektre registruojama anti-Stokso juosta (trumpabangė Ramano sklaidos juosta).

Ramano sklaidos spektro virpesinės juostos intensyvumas yra proporcingas atitinkamų medžiagą sudarančių molekulių skaičiui sistemoje. Kai sistemos neveikia išoriniai veiksniai, molekulių, užimančių nesužadintą virpesinį lygmenį, yra kur kas daugiau, negu molekulių, esančių aukštesniame virpesiniame lygmenyje. Todėl Ramano sklaidos Stokso spektrinės juostos yra didesnio intensyvumo nei Ramano sklaidos anti-Stokso spektrinės juostos ir spektrinių tyrimų metu nagrinėjamos dažniau. Bendru atveju, Ramano sklaidos intensyvumas yra atvirkščiai proporcingas žadinančios spinduliuotės bangos ilgiui ketvirtuoju laipsniu:

$$I_{\text{Raman}} \propto \frac{I_0 |\alpha|^2}{\lambda^4}, \quad (6)$$

čia I_0 – žadinančios spinduliuotės intensyvumas, λ – jos bangos ilgis. Ramano sklaidos spektrai įprastai atvaizduojami kaip funkcija, kuri nusako Ramano sklaidos intensyvumo priklausomybę nuo Ramano poslinkio. Pastarasis dydis apibūdina fotonų energijos netekimą sklaidos metu ir yra charakterizuojamas bangos skaičiaus pokyčiu:

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda}, \quad (7)$$

kur λ_0 yra žadinančios spinduliuotės ilgis, o λ – išsklaidytos spinduliuotės ilgis.

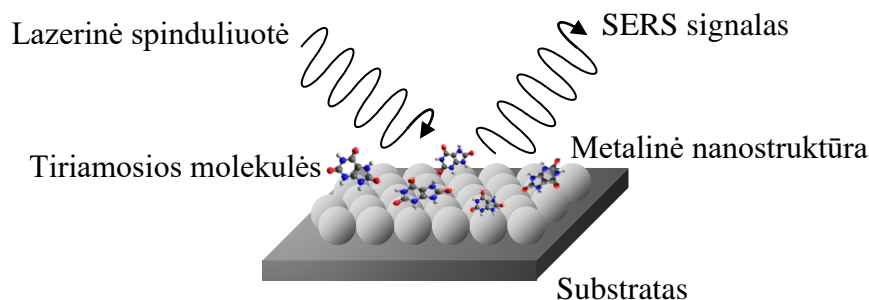
Nedestruktyvus ir sąlyginai greitas Ramano sklaidos spektroskopijos metodas tinka daugumos organinių ir neorganinių medžiagų tyrimams. Taikant šią metodiką gaunama naudingos informacijos apie tiriamų bandinių cheminę sudėtį, struktūrą, molekulinę sąveiką. Tačiau Ramano sklaidos signalas pasižymi mažu intensyvumu, kadangi tik vienas iš $\sim 10^8$ išsklaidytų fotonų yra išsklaidomas Ramano sklaida. Tai apsunkina mažos koncentracijos cheminių ir biologinių struktūrų aptikimą bei jų savybių pokyčių nustatymą.

1.5. Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida

Tiriamos molekulės Ramano sklaidos signalas gali būti stiprinamas molekulių sąveikos su metalo paviršiumi metu ar joms esant arti metalo-dielektriško fazių ribos. Šis reiškinys yra vadinamas paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida (angl. *Surface-enhanced Raman scattering* arba SERS) (žr. 3 pav.). Signalų intensyvumo padidėjimą nusako dydis, vadinamas stiprinimo faktoriumi (angl. *enhancement factor* arba EF):

$$EF = \frac{I_{\text{SERS}}/N_{\text{SERS}}}{I_{\text{Raman}}/N_{\text{Raman}}}. \quad (8)$$

Šioje stiprinimo faktoriaus išraiškoje I_{SERS} ir I_{Raman} atitinkamai yra tų pačių, tiriamos molekulės paviršiaus sustiprintos ir įprastos Ramano sklaidos spektruose stebimų spektrinių juostų intensyvumai, o N_{SERS} ir N_{Raman} – molekulių, dalyvaujančių abiejuose sklaidos procesuose, skaičiai.



3 pav. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos proceso iliustracija.

Analitinėje chemijoje gali būti naudojama supaprastinta stiprinimo faktoriaus išraiška – analitinis stiprinimo faktorius (angl. *analytical enhancement factor* arba AEF) [34]. Šis dydis apibūdina Ramano sklaidos signalo padidėjimą, tiriant bandinį tokiomis pačiomis techninėmis eksperimento sąlygomis (žadinimo spinduliuotės ilgis, lazerio galia, spektrometras ir kitos), tačiau esant galimai skirtingoms analitės koncentracijoms:

$$AEF = \frac{I_{SERS}/c_{SERS}}{I_{Raman}/c_{Raman}}, \quad (9)$$

kur c_{SERS} ir c_{Raman} atitinkamai yra SERS ir įprastos Ramano sklaidos tyrimų metu naudotų bandinių koncentracijos. Analitinis stiprinimo faktorius yra naudingas praktiniams taikymams, kadangi signalų intensyvumo pokyčio nustatymas yra greitas ir paprastas. Tačiau AEF vertės negali būti naudojamos pilnam skirtingų SERS aktyvių paviršių charakterizavimui. Šis trūkumas atsiranda dėl to, jog analitinio stiprinimo faktoriaus skaičiavimuose nėra pilnai atsižvelgiama į adsorbuotų molekulių skaičių, paviršiaus struktūrinės bei adsorbcines savybes.

Priklausomai nuo eksperimento sąlygų, stiprinimo faktoriaus (EF) vertė dažniausiai siekia 10^4 - 10^6 . Toks Ramano sklaidos signalo intensyvumo padidėjimas aiškinamas dviem skirtingais modeliais – cheminio stiprinimo ir elektromagnetinio stiprinimo [35]. Abu stiprinimo mechanizmai apibūdina procesus, dėl kurių įvyksta Ramano sklaidos signalo stiprinimas, tačiau paviršiaus ypatybės, molekulės prigimtis ar kitos eksperimento sąlygos gali lemti skirtingą modelių indėlį į bendrą Ramano sklaidos stiprinimą.

1.5.1. Cheminio stiprinimo modelis

Cheminio stiprinimo mechanizmas apima procesus, kurių metu kinta metalo paviršiuje adsorbuotos molekulės poliarizuojamumas. Didelę įtaką cheminio stiprinimo modeliu aprašomo

stiprinimo faktoriaus vertei daro metalo-adsorbato komplekse vykstanti fotoindukuota krūvio pernaša [36]. Šiuo atveju tiriamoji molekulė gali būti sužadinama netiesioginio elektrono perkėlimo tarp jos orbitalių metu, molekulių orbitalėms sąveikaujant su metalo Fermi (angl. *Fermi*) lygmeniu.

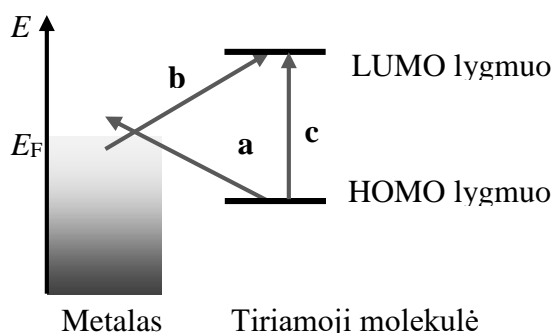
Susiformavus kovalentiniam ryšiui tarp adsorbato molekulės ir metalo, yra galimas jų molekulinė orbitalių persiklojimas. Pakitus adsorbuotos molekulės elektroninėms būsenoms, atsiranda tikimybė, jog energijos skirtumas tarp metalo Fermi lygmens ir adsorbato aukščiausios užimtos molekulinės orbitalės (angl. *highest occupied molecular orbital* arba HOMO) ar žemiausios laisvos adsorbato molekulinės orbitalės (angl. *lowest unoccupied molecular orbital* arba LUMO) sutaps su žadinančios spinduliuotės fotono energija ar bus jai artimas:

$$E_F - E_{\text{HOMO}} \approx \hbar\omega \quad (10)$$

arba

$$E_{\text{LUMO}} - E_F \approx \hbar\omega, \quad (11)$$

čia E_F yra metalo Fermi lygmens energija, ω – žadinančios spinduliuotės kampinis dažnis. Tokiu atveju fotono sugerties metu adsorbato-metalo kompleksuose gali įvykti elektrono šuolis iš adsorbato HOMO lygmens į neužimtą metalo energijos lygmenį, esanti aukščiau Fermi lygmens, (žr. 4 pav. a) ar iš žemiau Fermi lygmens esančio užimto lygmens į tiriamos molekulės LUMO lygmenį (žr. 4 pav. b). Jeigu lazerinės spinduliuotės fotono energija atitinka molekulės elektroninių lygmenų šuolio energija, galimas rezonansinis Ramano efektas (žr. 4 pav. c) [37]. Elektrono spindulinės rekombinacijos su skykle ar spindulinės relaksacijos metu į aplinką išspinduliuojamas SERS fotonas.

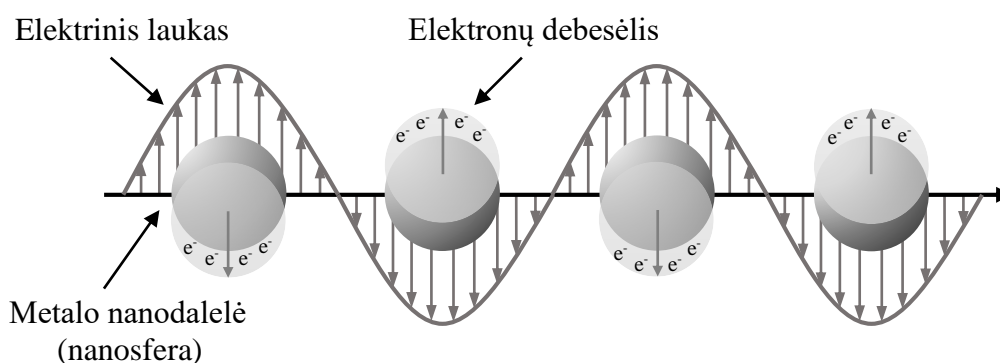


4 pav. Krūvio pernašos molekulės-metalo komplekse schema. Adaptuota pagal [37].

Adsorbato-metalo sistemoje susidarius rezonansinio ar artimo jam proceso sąlygomis, galimas efektyvus krūvio pernešimas tarp metalo ir tiriamos molekulės. Dėl elektrono pernašos tarp metalo paviršiaus ir adsorbato, adsorbcijos metu kinta molekulės poliarizuojamumas ir Ramano sklaidos signalas gali būti sustiprinamas. Stiprinimo faktoriaus vertė, dėl cheminių stiprinimą sukeliančių reiškinių, gali siekti $10 - 10^2$.

1.5.2. Elektromagnetinio stiprinimo modelis

Pagrindinė bendro Ramano sklaidos signalo stiprinimo mechanizmo dalis yra elektromagnetinis stiprinimas. Jis yra susijęs su išorinės elektromagnetinės spinduliuotės ir metalo laisvųjų elektronų sąveika. Į metalo paviršių nukreipta elektromagnetinė banga sukelia metalo laidumo elektronų tankio osciliacijas. Tokios krūvio tankio fliktuacijos yra vadinamos plazmos virpesiais, o juos apibūdinantis kvantas – plazmonu. Viena iš plazmonų rūšių yra laidumo elektronų osciliacijos vientiso metalo sluoksnio ir dielektriko riboje. Šie metalo-dielektriko fazių sandūroje sklindantys virpesiai vadinami paviršiaus plazmonais poliaritonais (angl. *surface plasmon polariton*). Nanometrinių matmenų metalo struktūrose elektrinis laukas sąlygoja metalo nanodalelių elektronų debesėlių fliktuacijas (žr. 5 pav.). Metalo dalelių, kurių visi matmenys žymiai mažesni už žadinančios spinduliuotės ilgį, laisvieji elektronai dalyvauja kolektyviniuose virpesiuose. Šios osciliacijos yra priskiriamos atskiram plazmonų tipui – lokalizuotiems paviršiaus plazmonams (angl. *localised surface plasmon*) [38].



5 pav. Elektromagnetinės spinduliuotės sukeltų metalo nanodalelių elektronų debesėlių fliktuacijų atvaizdavimas. Adaptuota pagal [39].

Sferinės metalo nanodalelės ir išorinio elektromagnetinio lauko sąveikos metu, chaotiškai apie savo pusiausvyros padėtis osciliuojantys elektronai priverčiami koherentiškai virpėti tam tikru dažniu. Reiškiny, kai priverstinių elektronų osciliacijų dažnis sutampa su žadinančios spinduliuotės dažniu, vadinamas lokalizuotų paviršiaus plazmonų rezonansu (angl. *localised surface plasmon resonance* arba LSPR). Krūvio tankio virpesių metu, dėl laisvųjų elektronų judėjimo priešinga elektrinio lauko vektoriui kryptimi, indukuojamas dipolis, kuris taip pat kuria elektrinį lauką. Tenkinant lokalizuotų paviršiaus plazmonų rezonanso sąlygą yra pasiekiamas maksimalus šio elektrinio lauko stipris. Indukuoto dipolio kuriamas elektrinis laukas ir žadinančios spinduliuotės elektrinis laukas formuoja suminį elektrinį lauką. Šio suminio elektrinio lauko stipris priklauso nuo atstumo iki nanodalelės. Artimoje nanodalelei aplinkoje elektrinis laukas yra stipriausias, o tolstant

nuo jos – ženkliai silpnėja. Kadangi Ramano sklaidos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas molekulę veikiančio elektrinio lauko stiprio kvadratui, didžiausias Ramano sklaidos signalo stiprinimas pasiekiamas molekulės adsorbcijos ant metalo nanodalelės paviršiaus atveju. Pagal elektromagnetinį modelį, adsorbuotos molekulės, kurią veikia LSPR reiškinio sustiprintas metalo nanodalelės elektrinis laukas, Ramano sklaidos signalo stiprinimo faktoriaus vertė gali vidutiniškai siekti apie 10^4 .

1.6. Optinės metalų savybės

1.6.1. Metalų dielektrinė funkcija

Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos tyrimuose svarbu atsižvelgti į tai, iš kokio metalo yra pagaminta nanostruktūra, kokia metalo aplinka metalo-dielektriko fazių riboje ir kaip šios skirtingos medžiagos sąveikauja su elektromagnetine spinduliuote. Metalo atsakas į išorinę spinduliuotę gali būti aiškinamas remiantis plazmos modeliu. Pagal šį modelį metalo laidumo elektronai laikomi laisvųjų elektronų dujomis, o likę surištieji elektronai ir branduoliai formuoja teigiamą krūvį turinčią aplinką. Tokios laisvųjų elektronų plazmos judėjimas gali būti aprašomas pagal Drudės (angl. *Drude*) teoriją. Supaprastintame klasikiniame Drudės modelyje laidumo elektronai juda laisvai visoje metalo kristalinėje gardelėje ir fiksuoti teigiami gardelės jonai nedaro įtakos laisvųjų elektronų plazmos dažniui. Tačiau realiomis sąlygomis reikia atsižvelgti į teigiamų jonų fono sąlygotą poliarizaciją ir įskaityti katijonų optinį atsaką [40]. Tada plazmos dažnis apibrėžiamas pagal formulę:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m_{ef}\epsilon_0\epsilon_\infty}}, \quad (12)$$

kur n – laisvųjų elektronų tankis, e – elektrono krūvis, m_{ef} – elektrono efektinė masė, ϵ_0 – vakuomo dielektrinė skvarba, ϵ_∞ – dielektrinė skvarba, apibūdinanti katijonų optinį atsaką. Remiantis šia plazmos dažnio išraiška, optinį atsaką galima užrašyti kaip nuo dažnio priklausančią dielektrinės skvarbos funkciją:

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_0\omega} \right), \quad (13)$$

čia γ_0 – slopinimo koeficientas, susijęs su laisvųjų elektronų susidūrimais su katijonais ir gardelės defektais. Pasinaudojus dielektrinės skvarbos funkcijos išraiška, sferinės nanodalelės, kurios matmenys yra žymiai mažesni už žadinančios bangos ilgį ($r \ll \lambda_0$, čia r – nanodalelės spindulys), vidinio elektrinio lauko stipris užrašomas tokia lygtimi:

$$E_{vid} = \frac{3\epsilon_a}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_a} E_0, \quad (14)$$

kur ϵ_a – aplinkos dielektrinė skvarba, E_0 – žadinančios spinduliuotės elektrinio lauko stipris. Metalo nanodalelės vidinio elektrinio lauko stipriui pasiekus didžiausią vertę, sužadunami paviršiaus plazmonai. Iš (14) lygties matoma, jog maksimali E_{vid} vertė pasiekiami, kai $\epsilon(\omega) + 2\epsilon_a \rightarrow 0$ [36]. Šiuo atveju, metalų dielektrinę skvarbą $\epsilon(\omega)$ užrašius kompleksine išraiška

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) - i\epsilon_2(\omega), \quad (15)$$

kur reali dielektrinės funkcijos dalis $\epsilon_1(\omega)$ (susijusi su dispersija) lygi

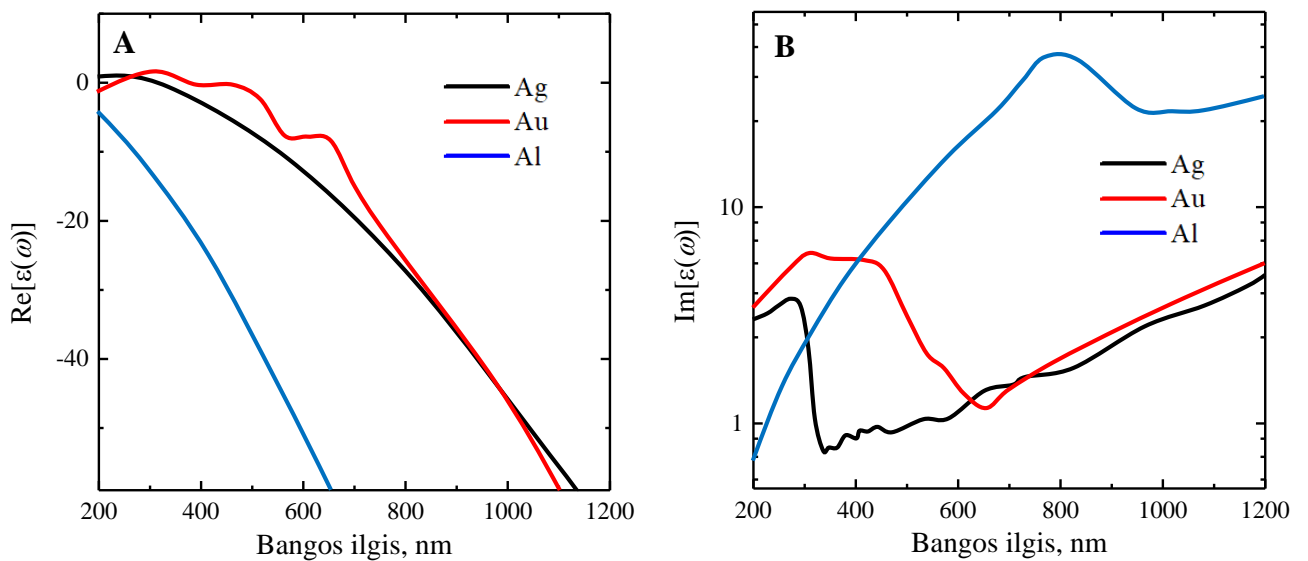
$$\epsilon_1(\omega) = \text{Re}[\epsilon(\omega)] = \epsilon_\infty \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma_0^2} \right), \quad (16)$$

o menama dalis $\epsilon_2(\omega)$ (susijusi su sugertimi) yra

$$\epsilon_2(\omega) = \text{Im}[\epsilon(\omega)] = \frac{\epsilon_\infty \omega_p^2 \gamma_0}{\omega(\omega^2 + \gamma_0^2)}, \quad (17)$$

galima apibrėžti dvi sąlygas, reikalingas pasiekti rezonansui. Lokalizuoti paviršiaus plazmonai efektyviai sužadunami tada, kai: 1) reali dielektrinės funkcijos dalis yra neigiama ir dvigubai didesnė nei aplinkos dielektrinė skvarba ($\text{Re}[\epsilon(\omega)] = -2\epsilon_a$), 2) menama dalis yra kuo mažesnė [41]. Šios sąlygos lemia metalo, iš kurio sudarytas paviršius, SERS aktyvumą.

Taurieji metalai yra geriausiai paviršiaus plazmonų rezonanso sąlygas atitinkančios medžiagos. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos tyrimuose ir kituose paviršiaus plazmonų rezonanso reiškiniu paremtuose spektroskopiniuose metoduose dažniausiai naudojamas sidabras ir auksas. Jų pranašumas paaiškėja lyginant aukso, sidabro ir kitų metalų, pavyzdžiui, aliuminio, realios $\text{Re}[\epsilon(\omega)]$ ir menamos $\text{Im}[\epsilon(\omega)]$ dielektrinės funkcijos dalių priklausomybę nuo žadinančios bangos ilgio (žr. 6 pav.).



6 pav. Sidabro, aukso ir aliuminio realių (A) ir menamų (B) dielektrinės funkcijos dalių priklausomybė nuo žadinančios bangos ilgio. Adaptuota pagal [41].

Regimojoje ir artimojoje IR spektro srityse visų trijų metalų realiosios dielektrinės funkcijos dalys yra neigiamos ir gali tenkinti pirmąją rezonanso sąlygą. Tačiau aliuminio menamoji dielektrinės funkcijos dalis regimojoje bangos ilgių srityje yra kur kas didesnė nei aukso bei sidabro. Todėl, pagal antrąją sąlygą, pastarieji metalai pasižymi stipresniu rezonansu didesnių bangos ilgių intervale. Specifiniais atvejais, tokiais kaip SERS tyrimai UV srityje, aliuminis gali būti efektyviai naudojamas plazmonikoje. Lyginant aukso ir sidabro dielektrinės funkcijos komponentų priklausomybių nuo spinduliuotės bangos ilgio grafikus, akivaizdu, jog bangos ilgių srityje iki 600 nm sidabro menamosios $\text{Im}[\epsilon(\omega)]$ dielektrinės skvarbos dalies vertės yra žymiai mažesnės nei aukso. Taip yra todėl, kad mažesnėje nei 600 nm srityje Au atveju vyksta tarpjuostiniai elektroniniai šuoliai, kurie daro įtaką laisvųjų elektronų plazmos virpesiams ir lemia didesnę spinduliuotės sugertį. Nepaisant to, skirtingos cheminės ir fizikinės savybės lemia platų tiek Ag, tiek Au taikymą įvairiose paviršiaus optinės spektroskopijos metodikose, naudojant skirtingo bangos ilgio lazerinę spinduliuotę.

1.6.2. Nanodalelių dydis, forma ir agregacija

Ramano sklaidos signalo stiprinimas priklauso ne tik nuo metalo, iš kurio pagaminta nanodalelė, rūšies, bet ir nuo nanodalelės geometrinių savybių. Dalelių dydis lemia, kuris iš šviesos sąveikos su medžiaga procesų (šviesos sugertis ar sklaida) sistemoje vyrauja labiau. Dėl šios priežasties nanodalelių dydis yra susijęs ir su plazmonų rezonansą tenkinančiu žadinančios spinduliuotės bangos ilgiu. Ši priklausomybė atvaizduojama metalo nanodalelių UV-VIS elektroniniuose sugerties spektruose. Didėjant dalelės matmenims, plazmonų rezonanso sugerties juostos plotis didėja ir ji slenkasi į ilgesnių bangos ilgių pusę.

Sferinių nanodalelių dydį ir sklaidomos spinduliuotės bangos ilgį galima susieti pasinaudojus *Mie* sklaidos teorijos lygtimis [42]. Klasikinė *Mie* teorija apsiriboja plokščių bangų sklaida homogeniškomis, izotropinėmis sferinės formos dalelėmis, kurios yra išorinės spinduliuotės nesugeriančioje terpėje. Jeigu nanodalelės spindulys yra žymiai mažesnis už žadinančios spinduliuotės ilgį ($2r < \lambda_0/10$), tai nanodalelių sugerties skerspjūvis yra lygus:

$$\sigma(\omega) = 9 \frac{\omega}{c} \epsilon_a^{3/2} V \frac{\epsilon_2(\omega)}{(\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_a)^2 + \epsilon_2(\omega)^2}, \quad (18)$$

kur V yra sferinės nanodalelės tūris. Vandeniniame tirpale esančių sferinės formos sidabro nanodalelių vidutinį skersmenį galima nustatyti pasinaudojus paprastesne išraiška, kuri yra paremta *Mie* teorija [43]:

$$d = \sqrt{24,01 + 100(\lambda_p - 385) + 4,9}, \quad (19)$$

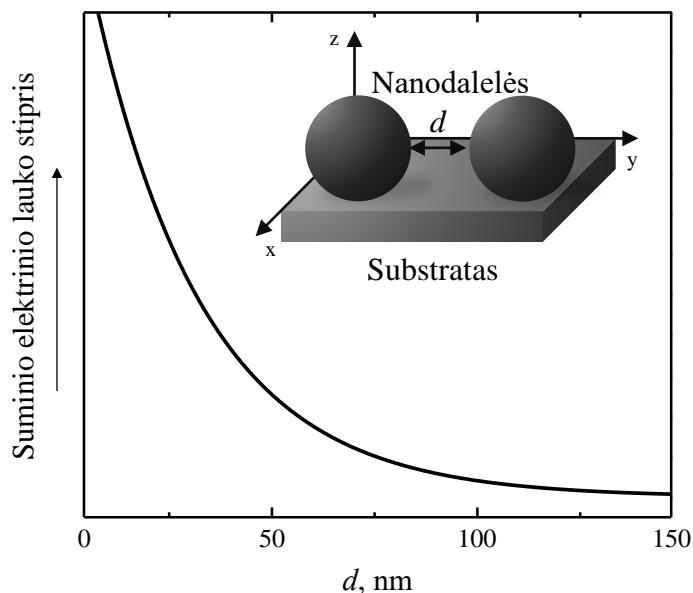
čia λ_p – plazmonų sugerties juostos maksimumo padėtis. Anizotropinių nanodalelių optiniai ir geometriniai parametrai gali būti įvertinti modeliuojant nehomogeninių nanodalelių sąveiką su išorine spinduliuote ir tiriant jų sklaidos bei sugerties savybes.

Optinėms nanodalelės savybėms didesnę įtaką daro nanodalelės forma nei jos dydis. Taikant skirtingas nanodalelių sintezės metodikas galima pagaminti sferos, kubo, strypo, laido, prizmės, žvaigždės ir kitų pavidalų nanodaleles [44]. Jos pasižymi nevienodomis optinėmis savybėmis, kadangi nanodalelės išorinio elektrinio lauko stiprio vertė priklauso nuo dalelės formos. Elektrinis laukas sustiprėja ties nanodalelės kampais ir kuo kampas smalesnis, tuo elektrinio lauko linijų tankis toje vietoje yra didesnis. Šis reiškinys vadinamas žaibolaidžio efektu (angl. *the lightning rod effect*). Plazmoninės nanodalelių savybės priklauso ir nanodalelių simetriškumo. Sferinės formos nanodalelės pasižymi dideliu simetriškumu ir jų sąveikos su išorine spinduliuote metu yra sužadinami tik su dipoliu susiję lokalizuoti paviršiaus plazmonai. Anizotropinių nanodalelių atveju galimi keli plazmonų rezonansai priklausomai nuo jas veikiančio elektrinio lauko krypties. Pavyzdžiui, strypo formos nanodalelėse plazmonai gali būti sužadinami išilginės ir skersinės strypo ašių atžvilgiu. Tuo tarpu prizmės formos nanodalelėse yra galimi trys skirtingi LSPR, susiję su plokštuminio dipolio, neplokštuminio dipolio ir plokštuminio kvadrupolio rezonansais [45]. Tokiu atveju keli skirtingi žadinančios spinduliuotės bangos ilgiai gali tenkinti plazmonų rezonanso sąlygas.

Nanodalelių agregacija yra kitas svarbus aspektas, nuo kurio priklauso nanostruktūros bei tiriamos sistemos optinės savybės. Koloidiniuose tirpaluose susidarant nanodalelių sankaupoms, šalia nanodalelių paviršiaus esantys laidumo elektronai delokalizuoja ir tampa bendri tarp gretimų dalelių. Netvarkingos nanodalelių struktūros lemia mažesnę sistemos stabilumą ir sugerties bei sklaidos procesų pokyčius. UV-VIS sugerties spektroskopija gali būti naudojama nanodalelių tirpalų stabilumo įvertinimui. Vykstant dalelių agregacijai, sumažėja sugerties juostos intensyvumas, ji tampa platesnė bei stebimas jos raudonasis poslinkis. Taip pat yra ir kitų sugerties juostų atsiradimo galimybė, kadangi sumažėjus dalelių stabilumui mažėja sistemos homogeniškumas [46].

Tam tikrais atvejais molekulei sąveikaujant su metalo nanodalelių agregatais, Ramano sklaidos signalo elektromagnetinio stiprinimo faktoriaus vertė gali padidėti net iki 10^{12} . Pagrindinė tokio stiprinimo priežastis – gretimų metalo nanodalelių elektrinių laukų dalinis persiklojimas. Tai lemia suminio elektrinio lauko tarp dalelių stiprio padidėjimą. Dėl skirtingų metalo nanodalelių padėčių jų sankaupoje, persiklojimo sąlygotas sustiprintas elektrinis laukas yra nehomogeniškas. Suminio elektrinio lauko vertė yra didžiausia, kai atstumas tarp dviejų nanodalelių yra apie 1 nm (žr. 7 pav.). Tokia sritis, esanti tarp plazmoninių objektų, vadinama karštuoju tašku (angl. *hot spot*) [47]. Šios sritys gali susiformuoti ne tik esant nanodalelių dimerui, bet ir didesnėse sankaupuose. Jei tiriamoji molekulė yra arti karštojo taško, tai kampo tarp tiesės, jungiančios nanodalelių centrus, ir tiesės, jungiančios vienos dalelės centrą su molekule, pokytis lemia suminio agreguotų dalelių elektrinio

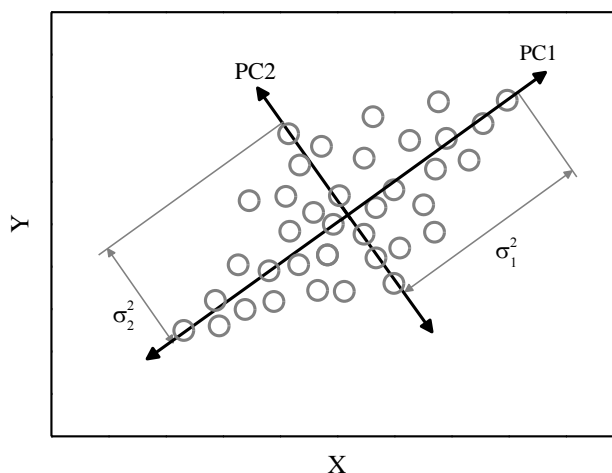
lauko sąlygoto molekulės Ramano sklaidos signalo stiprinimo sumažėjimą arba padidėjimą. Nepaisant to, šiuo reiškiniu paremtuose tyrimuose dažnai susiduriama su karštųjų taškų padėties nustatymo ir rezultatų atsikartojamumo problemomis. Šių sričių formavimas ir kontrolė yra sudėtingas procesas, reikalaujantis tikslių nanodalelių agregacijos skatinimo metodikų ir optimalių formų nanodalelių gamybos.



7 pav. Suminio elektrinio lauko (lygiagretaus y ašiai) stiprio tarp sferinių nanodalelių priklausomybė nuo atstumo d ($r = 50$ nm, $\lambda_0 = 633$ nm). Adaptuota pagal [48].

1.7. Principinių komponentų analizė

Cheminės ir biologinės analizės metu gautų duomenų sisteminimui, klasifikavimui, išvadų tikėtinumui ir patikimumui įvertinimui naudojami įvairūs matematinės statistikos metodai. Vienas iš jų – principinių komponentų analizė (angl. *principal component analysis* arba PCA). Šis chemometrijos metodas taikomas įvairiose spektroskopijos metodikose, nes suteikia galimybę įvertinti sąryšį tarp skirtingų kintamųjų, nustatyti atitinkamų spektrinių sričių panašumus, aptikti netinkamus ar labiausiai išsiskiriančius spektrinių duomenų rinkinio elementus. Principinių komponentų analizė yra multivariacinė matematinė procedūra, kurios tikslas yra sumažinti duomenų matmenų (dimensijų) skaičių, išlaikant kuo didesnę tiriamųjų duomenų verčių variaciją [49]. Siekiant išsaugoti statistinę informaciją, įvedamas mažesnis kiekis naujų, tarpusavyje nekoreliuojančių kintamųjų – principinių komponentų. Kadangi jie yra statistiškai nepriklausomi, principinių komponentų skaičius analizės metu gali atitikti tiriamų bandinių, savybių ar atitinkamų požymių skaičių. Norint supaprastinti PCA, daugelio matmenų duomenų rinkinys gali būti atvaizduojamas pirmojo ir antrojo principinių komponentų plokštumoje (žr. 8 pav.).



8 pav. Dviejų dimensijų duomenų rinkinys (X, Y), kuriame pavaizduota abiejų kintamųjų dispersija (σ_1^2 ir σ_2^2) ir didžiausios dispersijos kryptys (PC1 ir PC2 – principiniai komponentai). Adaptuota pagal [50].

Pirmasis principinis komponentas pasirenkamas taip, kad jo kryptis atitiktų didžiausią duomenų rinkinio elementų dispersiją. Antrasis komponentas taip pat turi atitikti didžiausią dispersiją, tačiau kita kryptimi. Šis komponentas turi būti statmenas pirmajam komponentui, jo ašis turi eiti per centrinį pirmojo komponento duomenų tašką ir jie neturi koreliuoti. Tokiu būdu abi kryptys nusako didžiausią įmanomą duomenų kintamumą ir naujoje koordinatinių sistemoje išryškėja šių duomenų panašumai bei skirtumai.

Vienas iš pagrindinių principinių komponentų nustatymo būdų yra kovariacijos matricos metodas, susidedantis iš dviejų etapų: duomenų rinkinio (matricos) kovariacijos matricos apskaičiavimo ir jos tikrinių verčių ir tikrinių vektorių nustatymo. Kovariacija apibūdina dviejų priklausomų duomenų rinkinio kintamųjų nuokrypius nuo jų vidurkių vienas kito atžvilgiu:

$$\text{cov}(X, Y) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y}), \quad (20)$$

kur n – kintamuosius apibūdinančių verčių kiekis, X ir Y – kintamieji, \bar{X} ir \bar{Y} – jų vidurkiai. Šiuo atveju kovariacijos matricą galima užrašyti taip:

$$C = \begin{pmatrix} \text{cov}(X, X) & \text{cov}(X, Y) \\ \text{cov}(Y, X) & \text{cov}(Y, Y) \end{pmatrix}. \quad (21)$$

Ši matrica yra simetrinė, kadangi $\text{cov}(X, Y) = \text{cov}(Y, X)$. Pagrindinėje matricos įstrižainėje esantys elementai apibūdina kintamųjų dispersiją, o kitoje įstrižainėje – dviejų skirtingų kintamųjų kovariaciją. Teigiama elemento, esančio kovariacijos matricoje, vertė reiškia tiesioginę kintamųjų tarpusavio priklausomybę, neigiama reikšmė nurodo atvirkštinę priklausomybę, o nulis – kintamieji statistiškai nepriklausomi.

Kovariacijos matricos tikrinės vertės ir tikriniai vektoriai apskaičiuojami pasinaudojant šiuo sąryšiu:

$$Cv = \lambda v, \quad (22)$$

čia v – tikrinis vektorius, λ – tikrinė vertė, gaunama išsprendus lygtį

$$|C - \lambda I| = 0, \quad (23)$$

kur I – vienetinė matrica. Tikrinių vektorių skaičius lygus duomenų rinkinį sudarančių komponentų skaičiui. Šie vektoriai apibūdina principinių komponentų erdvės kryptis, o tikrinės vertės nusako taškų išplitimą išilgai šių krypčių. Didžiausią vertę turintis tikrinis vektorius yra pirmasis principinis duomenų rinkinio komponentas. Nustačius kovariacijos matricos tikrinius vektorius, sudaroma jų matrica, kurios stulpeliuose esantys tikriniai vektoriai išdėstyti mažėjimo tvarka:

$$V = (v_1 \quad v_2 \quad \dots \quad v_n) \quad (n = 1, 2, \dots). \quad (24)$$

Tokiu būdu gaunama principinių komponentų matrica, kurioje komponentai pateikiami pagal tai, kaip tiksliai jie apibūdina duomenų dispersiją. Mažų verčių tikrinius vektorius galima atmesti, kadangi jų įtaka bendram duomenų kintamumo apibūdinimui yra nedidelė.

Tegul tikrinių vektorių matrica V sudaryta iš m pasirinktų pirmųjų tikrinių vektorių. Pavyzdžiui, jeigu m yra lygus 2, tai reiškia, kad analizei pasirinkti pirmas ir antras principiniai komponentai. Atlikus duomenų matricos D transformaciją

$$G = DV_m \quad (m = 1, 2, \dots), \quad (25)$$

gaunama galutinių verčių matrica G , kurios stulpeliuose pateikiami duomenų elementai, o eilutėse – matmenys. Tokiu būdu gaunama pradinių duomenų verčių projekcija į naują m matmenų principinių komponentų erdvę [51].

2. Eksperimentinė dalis

2.1. Koloidinių tirpalų paruošimas

2.1.1. Sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų sintezė

Darbo metu buvo ruošiami koloidiniai sferinės formos sidabro nanodalelių tirpalai. Sidabro nanodalelės buvo gaminamos pagal *P. C. Lee* ir *D. Meisel* aprašytą metodiką [52]. Visų pirma, 18 mg sidabro nitrato (AgNO_3 , 99 %, *Merck*, Vokietija) ištirpinta 100 ml distiliuoto vandens. Toliau, AgNO_3 ir H_2O tirpalas buvo kaitinamas iki virimo temperatūros ant kaitinamą pagrindą turinčios magnetinės maišyklės (*Thermo scientific, Cimarec*). Šio proceso metu tirpalas buvo greitai maišomas. Tirpalui pasiekus virimo temperatūrą, į jį kintamo tūrio mechanine pipete (*Eppendorf Research*) įpilta 2 ml 1 % (w/v) vandeninio trinatrio citrato ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 99 %, *Merck*, Vokietija) tirpalo ir greitai maišant mišinys paliktas virti vienai valandai. Koloidinių tirpalų sintezės metu trinatrio citratas naudotas kaip redukuojanti medžiaga, elektrostatškai stabilizuojanti metalo nanodaleles. Dėl neigiamų citrato jonų adsorbcijos ant sidabro nanodalelių, jos stumia viena kitą. Tokiu būdu sumažėja nanodalelių agregatų susiformavimo tikimybė. Praėjus vienai valandai, tirpalas buvo atšaldytas iki kambario temperatūros šalto vandens vonelėje. Tokiu būdu buvo gautas pilkšvai žalios spalvos sidabro nanodalelių koloidinis tirpalas.

2.1.2. Koloidinių tirpalų centrifugavimas

Siekiant padidinti nanodalelių koncentraciją koloidiniuose tirpaluose, sidabro nanodalelių koloidiniai tirpalai buvo centrifuguoti (žr. 9 pav.). Centrifugavimas atliktas naudojant centrifugą *Heraeus Megafuge 16* (*Thermo Fisher Scientific*). Eksperimentų metu sidabro nanodalelių tirpalai 10 minučių centrifuguoti 3000, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000 apsisukimų per minutę greičiais.



9 pav. Koloidinis nanodalelių tirpalas prieš ir po centrifugavimo.

Centrifugavimo metu nanodaleles veikia išcentrinė jėga, dėl kurios nanodalelės nusėda centrifuguojamo mėgintuvėlio dugne. Po centrifugavimo nupilama pusė virš nuosėdų susidariusio skysčio (supernatanto), kuriame yra ir dalis nenusėdusių nanodalelių. Supernatante esančių nanodalelių kiekis priklauso nuo centrifugavimo greičio ir laiko – kuo jis didesnis ir kuo ilgiau atliekamas centrifugavimas, tuo daugiau skirtingos masės nanodalelių nusėda mėgintuvėlio dugne. Taigi, tokiu būdu gaunami skirtingų sidabro nanodalelių koncentracijų tirpalai.

2.2. Bandinių paruošimas

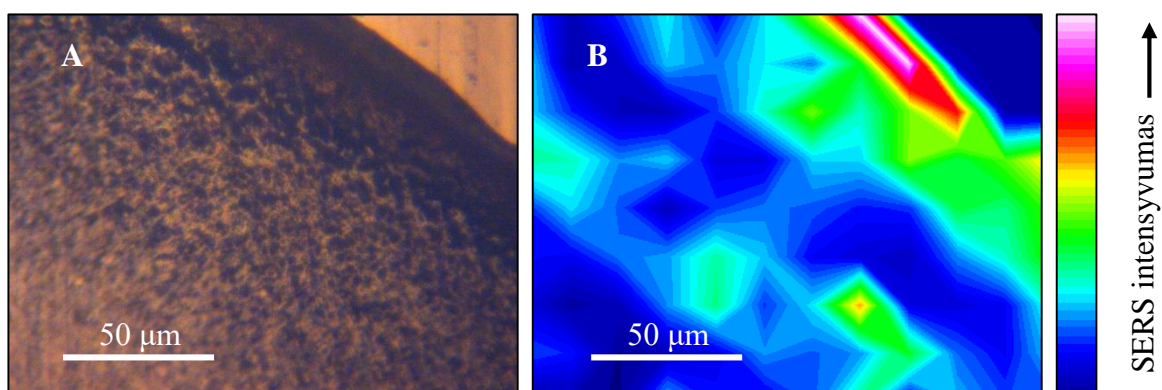
Ekspirimentų metu, siekiant įvertinti skirtingos sidabro nanodalelių koncentracijos koloidinių tirpalų efektyvumą, buvo registruojami 1 mM vandeninio šlapimo rūgšties tirpalo paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektrai. Analitinio stiprinimo faktoriaus skaičiavimams naudotas 50 mM vandeninio šlapimo rūgšties tirpalo Ramano sklaidos spektras. Šlapimo rūgštis pasižymi mažu tirpumu vandenyje (6 mg/100 ml), todėl reikiamos molinės koncentracijos vandeninis šlapimo rūgšties tirpalas gautas papildomai įpylus natrio hidroksido tirpalo (galutinio šlapimo rūgšties ir NaOH tirpalo santykis 10:1).

Visi šlapimo pūslės audinių ir nuoplovų bandiniai gauti iš Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Urologijos centro. Spektriniai šlapimo pūslės tyrimai yra patvirtinti Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto (dokumento nr. 2019/12-1178-665). Tyrimų metu, naudojant šlapimo pūslės audinių mėginius, buvo formuojami audinių tarpląstelinio skysčio sluoksniai. Šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio sluoksniai paruošti steriliu skalpeliu atpjaujant audinio mėginio dalį ir, naudojant pincetą, ją pjūvio puse prispaudžiant ir atitraukiant nuo SERS tyrimams naudojamo substrato. Paruoštas audinio tarpląstelinio skysčio sluoksnis išdžiovinamas atviroje aplinkoje kambario temperatūroje ir naudojamas tolimesniuose tyrimuose.

2.3. SERS spektriniai tyrimai

Pasiruošimas SERS spektriniais tyrimams pradedamas stiklinę plokštelę uždengiant IR spinduliuotę atspindinčia aliuminio folija. Siekiant pašalinti galimus paviršiaus nešvarumus, aliuminio paviršius yra nuvalomas izopropanoliu ((CH₃)₂CHOH, 99 %, *Labochema*, Lietuva). Šlapimo rūgšties tirpalų ir šlapimo pūslės nuoplovų SERS tyrimai buvo atliekami visų pirma ant aliuminio folijos užlašinant koloidinių tirpalų lašus (vienas lašas ~20 μl). Išdžiūvus koloido lašams, ant jų buvo užlašinamas tiriamasis bandinys. Tiriant šlapimo pūslės audinius ir tarpląstelinio skysčio sluoksnius, koloidiniai sidabro nanodalelių tirpalai buvo užlašinami ant mėginių, kurie buvo iš anksto suformuoti ant aliuminio folija padengtos stiklinės plokštelės.

Ruošiant nanodalelių sluoksnius, koloidinių tirpalų lašai buvo džiovinami atviroje aplinkoje kambario temperatūroje. Dėl greito vandens garavimo atviroje aplinkoje, didesnės nanodalelių sankaupos susiformuoja koloidinių tirpalų lašų kraštuose. Šio proceso metu susidaro nanodalelių žiedas (angl. *coffee-ring*) [53]. Tokiu atveju, bandinio SERS spektro intensyvumas priklauso nuo spektrų registravimo srities bandinio paviršiuje. Norint iširti šią priklausomybę, keičiant bandinio poziciją buvo užregistruoti 108 sveiko šlapimo pūslės audinio tarpląstelinio skysčio sluoksnio SERS spektrai. Šiam tyrimui bandinys buvo ruošiamas ant audinio tarpląstelinio skysčio sluoksnio užlašinus ir atviroje aplinkoje išdžiovinus sferinių sidabro nanodalelių koloidinį tirpalą. Iš tarpląstelinio skysčio SERS spektrų (integruotų intensyvumų profilių 100-3600 cm^{-1} bangos skaičių srityje) *OPUS* programoje automatiškai sudarytas pasirinkto bandinio paviršiaus ploto SERS spektrų intensyvumų pasiskirstymo vaizdas (žr. 10 pav.). Bandinio vaizdinimas atliktas naudojant Furjė vaizdavimo (FT-Ramano) spektrometro *MultiRAM* (*Bruker*, Vokietija) priedėlį – FT-Ramano mikroskopą *RamanScope* (*Bruker*, Vokietija), turintį 40 kartų didinantį objektyvą.



10 pav. Bandinio nuotrauka (A) ir jo paviršiaus srities SERS spektrų intensyvumų pasiskirstymo vaizdas (B).

Atliktas tyrimas patvirtino, jog tokiu būdu džiovinant koloidinio tirpalo lašą dalelės pasiskirsto nehomogeniškai. Didžiausias SERS spektrų intensyvumas stebimas išdžiūvusio lašo pakraščiuose. Remiantis gautais rezultatais, tolimesni tyrimai atlikti SERS spektrus registruojant kraštinėse bandinių pozicijose.

2.4. Spektrų registravimo įranga

Sidabro nanodalelių UV-VIS elektroninės sugerties spektrai užregistruoti naudojant dvikanalį UV-VIS-NIR spektrofotometrą *Lambda 1050* (*Perkin Elmer*, JAV), turintį du šviesos šaltinius – deuterio ir halogeninę lempas. Spektrų registravimui pasirinkta 300-800 nm bangos ilgių sritis ir 5 nm skyra. Šiuo atveju, per bandinį sklindančią spinduliuotę registruoja fotodaugintuvas

(angl. *photomultiplier tube* arba PMT), kuris yra skirtas spinduliuotės registravimui UV-VIS srityje (175-860 nm). Registruojant spektrus, bandiniai buvo laikomi 2 ml tūrio silicio dioksido kiuvetėse. Eksperimentų metu, kartu su tiriamuoju bandiniu registruojama ir distiliuoto vandens, kaip kontrolinio bandinio, sugertis. Tokiu būdu koloidinio tirpalo sugerties spektre automatiškai pašalinamos distiliuoto vandens sugerties juostos.

Šlapimo rūgšties ir šlapimo pūslės bandinių Ramano sklaidos bei SERS spektrai užregistruoti FT-Ramano *MultiRAM* spektrometru. Tyrimų metu bandiniai žadinti 1064 nm bangos ilgio lazerine spinduliuote (Nd:YAG aktyvios terpės lazeris). Spektų registravimui naudojama 180° bandinio žadinimo geometrija, kuri yra realizuojama naudojant CCD kamerą turintį veidrodinį objektyvą. Šis spektrometro priedas įgalina realiu laiku stebėti bandinio paviršių ir sufokusuoti lazerinę spinduliuotę pasirinktoje bandinio srityje. Spinduliuotės fokusavimas vykdomas motorizuotu staleliu, ant kurio yra tiriamasis bandinys. Šis stalelis valdomas x ir y kryptimis. Bandinio padėtis z kryptimi reguliuojama mechaniškai keičiant stalelio aukštį. Po lazerinės spinduliuotės sąveikos su bandiniu, išsklaidyta šviesa nukreipiama link filtro, skirto Reilio sklaida išsklaidomų fotonų filtravimui. Tuomet šviesos pluoštelis veidrodžiais nukreipiamas link temperatūros ir virpesių poveikiui atsparaus *RockSolid* interferometro. Po šviesos pluoštelių interferencijos, spinduliuotė registruojama didelio jautrio skystu azotu šaldomu Ge jutikliu. Bandinių spektrai, pasirinkus 4 cm⁻¹ skyrą, užregistruoti 100-3600 cm⁻¹ bangos skaičių srityje. Visi spektrai registruoti nuo 200 iki 1000 kartų ir automatiškai apskaičiuotas kiekvieno iš jų vidurkis. Tokiu būdu sumažinama triukšmų įtaka spektrų kokybei.

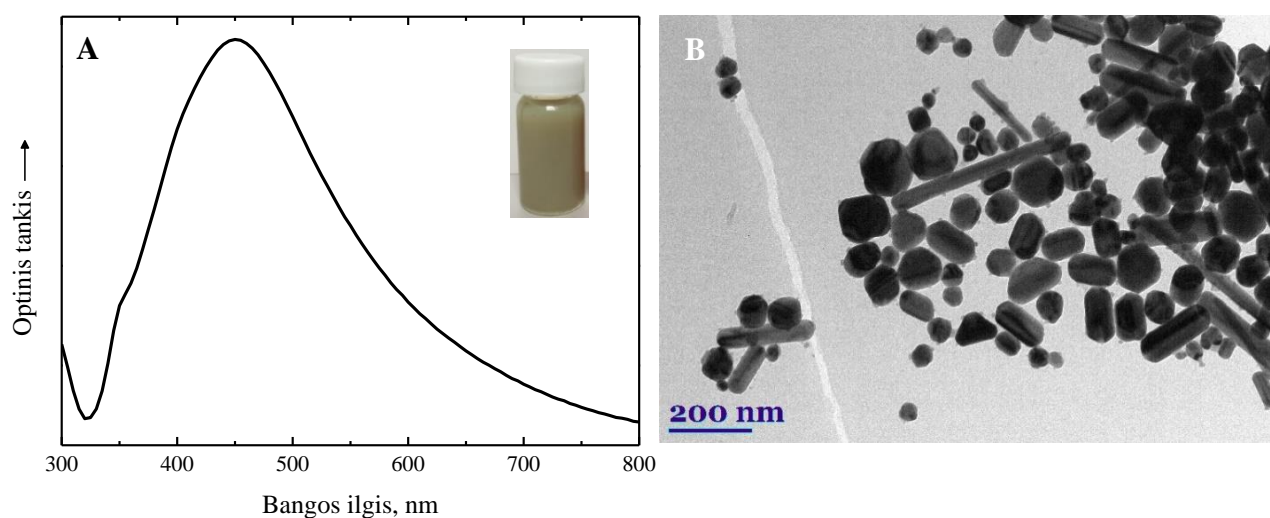
3. Rezultatai

3.1. Sidabro nanodalelių koloidiniai tirpalai

3.1.1. Nanodalelių charakterizavimas

Siekiant apskaičiuoti koloidinį sidabro nanodalelių tirpalą sudarančių nanosferų vidutinį skersmenį, užregistruotas šio koloidinio tirpalo sugerties spektras UV-VIS srityje (žr. 11 pav. A). Registruojant sugerties spektrus, visi sidabro nanodalelių koloidiniai tirpalai buvo skiedžiami distiliuotu vandeniu tuo pačiu santykiu (1:10 – koloidinis tirpalas:vanduo). Spektrinių juostų padėtys bei pusplėčiai (angl. *full width at half maximum* arba FWHM) nustatyti *Origin 9* programoje atlikus spektrinės juostos aproksimaciją Foigto (angl. *Voigt*) kontūru. Koloidinio sferinės formos nanodalelių tirpalo elektroninės sugerties spektre stebima viena asimetrinė sugerties juosta. Šios sugerties juostos maksimumo padėtis yra ties $\lambda_p = 450$ nm, o pusplotis – FWHM = 177 nm. Pagal (19) formulę nustatyta, jog sidabro koloidą sudarančių nanodalelių vidutinis skersmuo yra apie $d = 85$ nm.

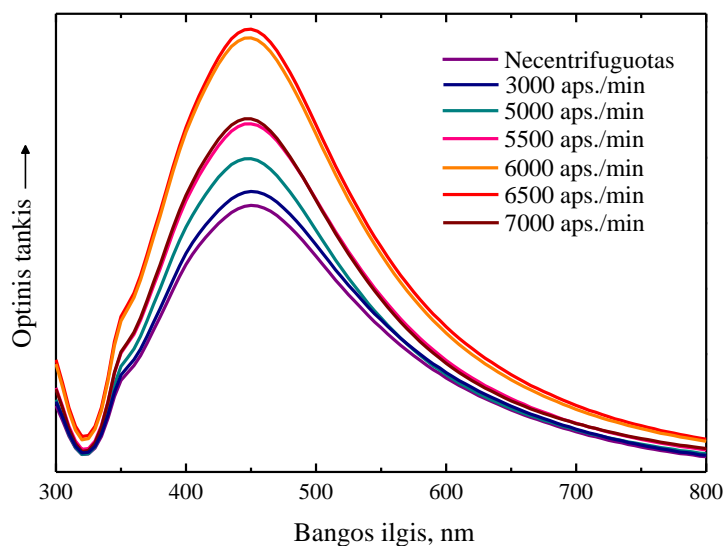
Koloidinius tirpalus sudarančių nanodalelių formų ir dydžių įvertinimui gali būti naudojami elektroninės mikroskopijos metodai. Vienas iš jų yra pralaidumo elektroninė mikroskopija (angl. *transmission electron microscopy* arba TEM), paremta vaizdu, suformuojamu per bandinį praėjusių elektronų. Norint įvertinti darbo metu paruoštų sferinių nanodalelių geometrinius parametrus, pralaidumo elektroniniu mikroskopu *Tecna G2 F20 X-TWIN (FEI, Olandija)* užregistruoti šių nanodalelių atvaizdai. Koloidinio tirpalo TEM nuotrauka pateikta 11 pav. B.



11 pav. Sidabro sferinės formos nanodalelių koloidinio tirpalo UV-VIS elektroninės sugerties spektras (A) ir šį tirpalą sudarančių nanodalelių TEM atvaizdas (B).

Sidabro koloidiniame tirpale, paruoštame pagal *P. C. Lee* ir *D. Meisel* metodiką, yra stebimos strypo, prizmės, laido (ilgis siekia 400 nm) formos nanodalelės, tačiau didžioji jų dalis yra sferinės ar artimos sferai formos. Remiantis TEM nuotraukomis galima teigti, jog sferinių nanodalelių skersmuo kinta nuo 20 nm iki 140 nm. Kadangi šis tirpalas yra polidispersinis (jį sudaro skirtingų formų ir dydžių nanodalelės), nanodalelių dydis negali būti tiksliai įvertintas pagal (19) formulę. Skirtingo dydžio ir formos nanodalelės galėjo susiformuoti dėl nevienodai mišinyje pasiskirsčiusių trinatrio citrato ir sidabro nitrato. Sistemos heterogeniškumą gali lemti ir koloido sintezės proceso netikslumai – netinkamas tirpalo maišymo greitis, trinatrio citrato tirpalo įpylimo laikas į sidabro nitrato tirpalą ir kiti veiksniai.

Nanodalelių koncentracija sistemoje daro įtaką metalo nanostruktūros optinėms savybėms. Norint tai įvertinti, koloidinis tirpalas buvo centrifuguotas skirtingais greičiais. Koloidinių tirpalų koncentravimas buvo atliktas iš karto po tirpalo paruošimo. Centrifugavimo metu pasirinkti 6 bandinių sukimo greičiai: 3000, 5000, 5500, 6000, 6500 ir 7000 aps./min. Necentrifuguoto ir centrifuguotų koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų UV-VIS sugerties spektrai pateikti 12 pav.



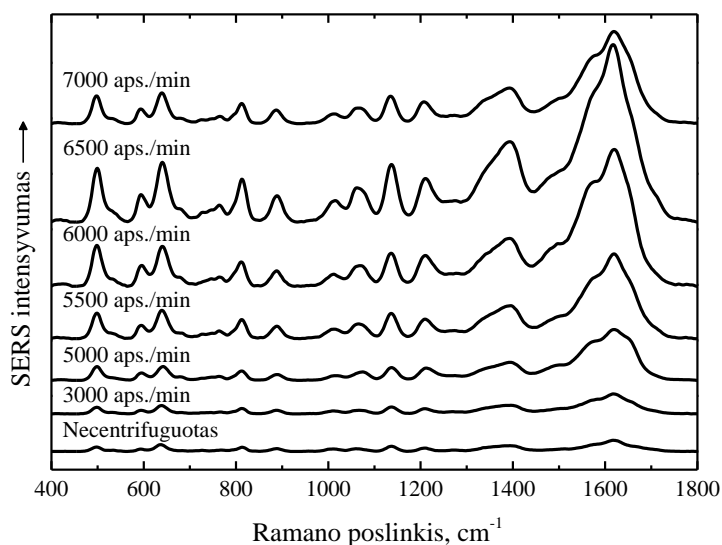
12 pav. Necentrifuguoto ir skirtingais greičiais centrifuguotų sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų UV-VIS elektroninės sugerties spektrai.

Atlikus centrifuguotų koloidinių tirpalų UV-VIS elektroninės sugerties spektrų analizę nustatyta, kad 6500 aps./min greičiu centrifuguoto koloidinio sidabro nanodalelių tirpalo sugerties juostos optinis tankis yra didžiausias. Remiantis šio koloidinio tirpalo ir necentrifuguoto koloido spektrinių juostų integrinių intensyvumų santykiu, galima teigti, jog centrifuguotame koloidiniame tirpale yra apie 1,6 karto daugiau nanodalelių. Po sidabro koloidinio tirpalo centrifugavimo 7000 aps./min greičiu pastebėta, jog dalis nanodalelių nusėdo ir ant mėgintuvėlio sienelės. Nanodalelių atskyrimo procesas yra netikslus, kadangi susiformuoja nanodalelių agregatai, kuriuos

visiškai pašalinti nuo mėgintuvėlio paviršiaus sudėtinga. Tai galėjo lemti mažesnę nanodalelių koncentraciją koloidiniame tirpale, nei 6500 aps./min greičiu centrifuguoto koloido atveju. Centrifuguotų koloidinių tirpalų sugerties spektruose esančių plazmonų rezonanso sugerties juostų maksimumo padėtys ir puspločiai beveik nekinta, todėl galima daryti prielaidą, kad po nanodalelių centrifugavimo pakinta nanodalelių koncentracija, bet jos išlieka polidispersiškos.

3.1.2. Koloidinių tirpalų efektyvumo įvertinimas

Darbo metu buvo siekiama nustatyti, kuris sidabro nanodalelių koloidinis tirpalas pasižymi efektyvesniu bandinio Ramano sklaidos signalo stiprinimu. Tam įvertinti, buvo užregistruoti 1 mM molinės koncentracijos šlapimo rūgšties vandeninio tirpalo SERS spektrai, naudojant skirtingus koloidinius tirpalus (žr. 13 pav.). Šiame eksperimente šlapimo rūgštis pasirinkta dėl itin geros jos adsorbcijos ant metalų paviršiaus ir intensyvaus SERS signalo. Užregistruotiems šlapimo rūgšties vandeninio tirpalo SERS spektrams buvo atlikta bazinės linijos korekcija.



13 pav. Vandeninio šlapimo rūgšties tirpalo (1 mM) SERS spektrai, užregistruoti naudojant skirtingos sidabro nanodalelių koncentracijos koloidinius tirpalus.

Vandeninio šlapimo rūgšties tirpalo SERS spektrų, kurie užregistruoti naudojant 6500 aps./min greičiu centrifuguotą koloidinį tirpalą, molekulių „pirštų antspaudų“ spektrinėje srityje (400-1800 cm⁻¹) esančių virpesinių juostų intensyvumai yra didžiausi. Galima daryti prielaidą, jog sidabro nanodalelių koloidinį tirpalą centrifuguojant 6500 aps./min greičiu, gaunamas optimalios nanodalelių koncentracijos koloidinis tirpalas. Tikslesnis skirtingos koncentracijos koloidinių tirpalų sąlygotas Ramano sklaidos signalo stiprinimas gali būti įvertintas pasinaudojus analitinio Ramano sklaidos signalo stiprinimo faktoriaus vertėmis. Norint apskaičiuoti analitinį stiprinimo faktorių,

užregistruotas vandeninio šlapimo rūgšties tirpalo (50 mM) Ramano sklaidos spektras, kuris yra pateiktas priede (žr. priedo 1 pav.). Toliau, pasirenkamos Ramano sklaidos ir SERS spektruose esančios spektrinės juostos, kurios atitinka tą patį šlapimo rūgštį sudarančios atomų grupės virpesį. Atlikus literatūros analizę [54, 55], šlapimo rūgšties Ramano sklaidos ir SERS spektruose stebimos spektrinės juostos priskirtos atitinkamiems molekulės virpesiams (žr. 2 lentelę).

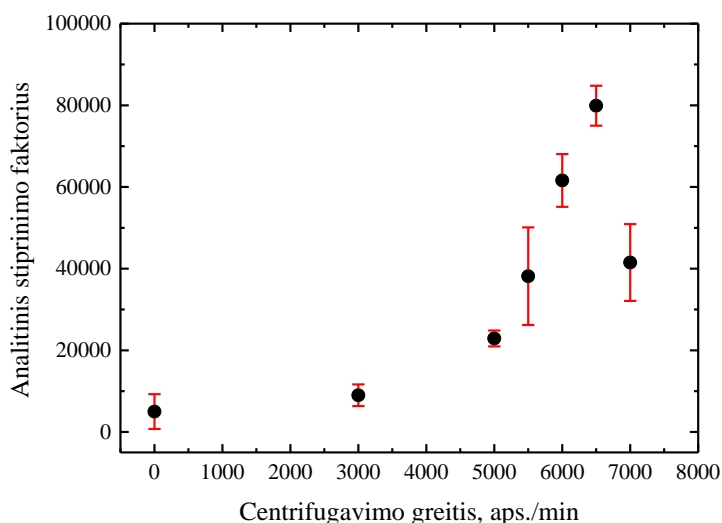
2 lentelė. Šlapimo rūgšties Ramano sklaidos ir SERS spektrines juostas atitinkantys virpesiai [54, 55].

Spektrinės juostos padėtis, cm^{-1}		Virpesių priskyrimas
Ramano sklaidos spektre	SERS spektre	
492	496	$\delta(\text{C-N})$, plokštuminiai žiedo virpesiai
591	594	$\delta(\text{N-H})$, neplokštuminiai žiedo virpesiai
632	637	$\delta(\text{C=O})$, žiedo virpesiai
770	767	$\delta(\text{N-H})$, žiedo virpesiai
804	812	$\delta(\text{C-N})$, plokštuminiai žiedo virpesiai
878	885	$\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{N-H})$
1012	1009	$\nu(\text{C-N})$, žiedo virpesiai
1072	1073	$\nu(\text{C-N})$
1154	1135	$\nu(\text{C-N})$
1212	1206	$\delta(\text{N-H})$
1339	1387	$\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{N-H})$
1497	1500	$\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C=C})$, $\delta(\text{N-H})$
-	1567	$\nu(\text{C=C})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{N-H})$
1597	1619	$\nu(\text{C-N})$
1642	1648	$\nu(\text{C=O})$
ν – valentinis virpesys, δ – deformacinis virpesys.		

Darbo metu analitinio stiprinimo faktoriaus skaičiavimams pasirinkta šlapimo rūgšties paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektre esanti intensyviausia spektrinė juosta, kuri yra susijusi su C-N valentiniais virpesiais. Ši virpesinė juosta šlapimo rūgšties Ramano sklaidos spektre stebima ties 1597 cm^{-1} , o SERS spektre - 1619 cm^{-1} . Pagal šias spektrines juostas apskaičiuoto analitinio stiprinimo faktoriaus priklausomybė nuo koloidinių tirpalų centrifugavimo greičio pateikta 14 pav.

Analitinių stiprinimo faktorių paklaidos nustatytos užregistravus 5 kiekvieno bandinio SERS spektrus, keičiant registravimo sritį lašo krašte, kadangi atviroje aplinkoje džiovinto koloido lašo kraštuose nanodalelės taip pat pasiskirsčiusios nevienodai. Remiantis nustatytais AEF nuokrypiais, apskaičiuoti šių faktorių vidurkiai. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos tyrimams taikant necentrifuguotą koloidinį tirpalą, šlapimo rūgšties molekulės Ramano sklaidos signalas sustiprėja apie $5 \cdot 10^3$ kartų. Tuo tarpu 6500 aps./min greičiu centrifuguotas koloidinis sidabro nanodalelių tirpalas pasižymi didžiausiu analitiniu stiprinimo faktoriumi ($\text{AEF} \approx 8 \cdot 10^4$). Remiantis gautais

rezultatais, tolimesniems tyrimams pasirinktas didžiausiu Ramano sklaidos signalo stiprinimu pasižymintis koloidinis tirpalas, centrifuguotas 6500 aps./min greičiu.



14 pav. Analitiniai stiprinimo faktoriai, naudojant necentrifuguotą ir skirtingais greičiais centrifuguotus koloidinius tirpalus.

3.2. Šlapimo pūslės mėginių SERS tyrimai

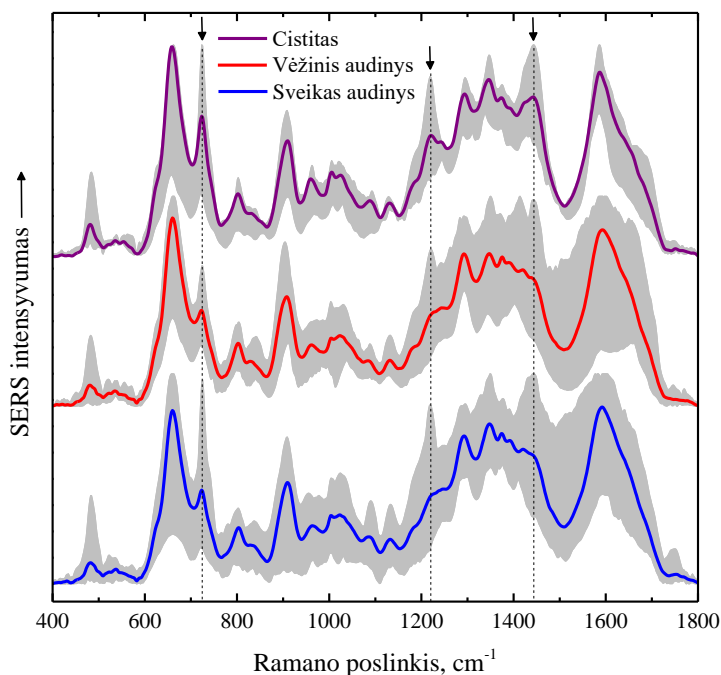
Darbo metu buvo tiriami 30 skirtingų pacientų 58 šlapimo pūslės audinių (28 sveikų, 25 vėžinių audinių ir 5 audinių, paveiktų cistito, mėginiai) bei 26 šlapimo pūslės nuoplovų (21 vėžinio susirgimo ir 5 cistito atveju) mėginiai. Šie mėginiai gauti 2019 m. gruodžio mėn. - 2020 m. kovo mėn. laikotarpiu. Kiekvieno paciento tiriamos sveiko, paveikto cistito ir vėžinio šlapimo pūslės audinio dalys iš šlapimo pūslės pašalintos chirurginės operacijos (TUR ar cistektomijos) metu, o nuoplovos gautos atlikus šlapimo pūslės cistoskopiją ar šlapimo pūslės kateterizavimą. Iš karto po operacijos šlapimo pūslės bandiniai perduoti histologiniams ir spektroskopiniams tyrimams. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose atliktų vėžinių šlapimo pūslės audinių histologinių tyrimų duomenys pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Tyrime naudotų šlapimo pūslės audinių histologinio tyrimo rezultatai.

Histologinis tipas	TNM	Piktybiškumo laipsnis	Pacientų skaičius
Urotelinių ląstelių karcinoma	pTa	G1	5
		G2	9
		G3	3
	pT1	G3	3
	pT2a	G3	2
	pT2b	G3	1
	pT3a	G2	1
G3		1	
Nespecifinis cistitas		-	5

3.2.1. Šlapimo pūslės audinių spektrinė analizė

Siekiant nustatyti spektrinius sveikų ir vėžinių šlapimo pūslės audinių skirtumus, užregistruoti jų paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektrai. Tyrimų metu užregistruoti 5 kiekvieno šlapimo pūslės mėginio (audinių, jų tarpląstelinio skysčio sluoksnių ir nuoplovų) SERS spektrai skirtingose bandinio srityse. Suvidurkinti šlapimo pūslės audinių SERS spektrai pavaizduoti 15 pav. Šie spektrai sunormuoti *Origin 9* programoje pasirinkus spektrų minimumo-maksimumo normavimo funkciją. Pilkos sritys nurodo skirtingų pacientų šlapimo pūslės audinių SERS spektrinių juostų intensyvumo nuokrypius. Šie pokyčiai gali būti nulemti skirtingo audinius sudarančių molekulių kiekio ir jų pasiskirstymo. Atitinkamų medžiagų koncentracija žmogaus organizme priklauso nuo jo fiziologijos, gyvenimo būdo, fizinio aktyvumo, vartojamo maisto, vaistų, ligų ir kitų veiksnių. Be to, vėžinio susirgimo atveju, tam tikrų molekulių koncentracija vėžiniame audinyje gali skirtis esant skirtingiems naviko histologiniams tipams, auglio stadijoms bei vėžinių ląstelių morfologiniams pokyčiams. Taip pat svarbu paminėti, jog chirurginės operacijos metu ne visada yra nustatoma tiksli naviko išplitimo sritis. Todėl sveiko audinio mėginyje gali būti aptiktos vėžinės ląstelės ir atvirkščiai.



15 pav. Suvidurkinti sveiko, vėžinio ir cistito paveikto šlapimo pūslės audinių SERS spektrai.

Lyginant sveiko ir vėžinio šlapimo pūslės audinių SERS spektrų vidurkius galima išvelgti šiuose spektruose esančių virpesinių juostų skirtumus. Vis dėlto šie spektriniai skirtumai yra pernelyg maži norint greitai ir tiksliai nustatyti vėžinį susirgimą. Tačiau, palyginus šiuos spektrus su cistito paveiktų audinių SERS spektrais, nustatytos trys virpesinės juostos, kurių intensyvumas cistito paveiktų audinių spektruose yra žymiai didesnis. Šios spektrinės juostos cistito atveju stebimos ties

724 cm⁻¹, 1222 cm⁻¹ ir 1438 cm⁻¹. Norint nustatyti, kas sąlygoja šiuos spektrinius skirtumus, buvo atliktas intensyviausių spektrinių juostų priskyrimas molekulių atomų grupių virpesiams [56-59]. Spektuose stebimų spektrinių juostų padėtys ir šioms juostoms priskiriami molekulių virpesiai pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Šlapimo pūslės audinių SERS spektrines juostas atitinkantys virpesiai [56-59].

Spektrinės juostos padėtis, cm ⁻¹			Virpesys	Molekulė
Sveikas audinys	Vėžys	Cistitas		
482	481	482	-	DNR, RNR
537	535	537	v(S-S)	Baltymai, angliavandeniai
560	559	553	-	Guaninas, timinas, uracilas
660	660	659	v(C-S)	Cisteinas
724	723	724	Žiedo kvėpuojamasis virpesys, δ(C-H)	Adeninas (DNR), baltymai
804	803	801	-	Citozinas, baltymai
910	908	909	-	Baltymai, angliavandeniai
963	961	961	-	Cholesterolis
1004	1004	1004	Žiedo kvėpuojamasis virpesys	Fenilalaninas
1023	1023	1026	v(C-H)	Fenilalaninas
1086	1084	1091	v(C-C), v(O-P-O)	Nukleorūgštys
1132	1132	1130	v(C-N), v(C-C), v(C-O)	Baltymai, lipidai, angliavandeniai
1224	1227	1222	v(C-H)	Fenilalaninas, tirozinas
1293	1292	1294	-	Serinas, glutamatas, lipidai
1348	1347	1346	δ(CH ₂), δ(CH ₃)	Adeninas, timinas, guaninas (DNR), lipidai
1374	1375	1374	Žiedo kvėpuojamasis virpesys	Adeninas, timinas, guaninas (DNR), lipidai
1439	1437	1438	δ(CH ₂)	Kolagenas, baltymai
1592	1593	1587	δ(C=C)	Fenilalaninas
1650	1651	1652	-	Fosfolipidai

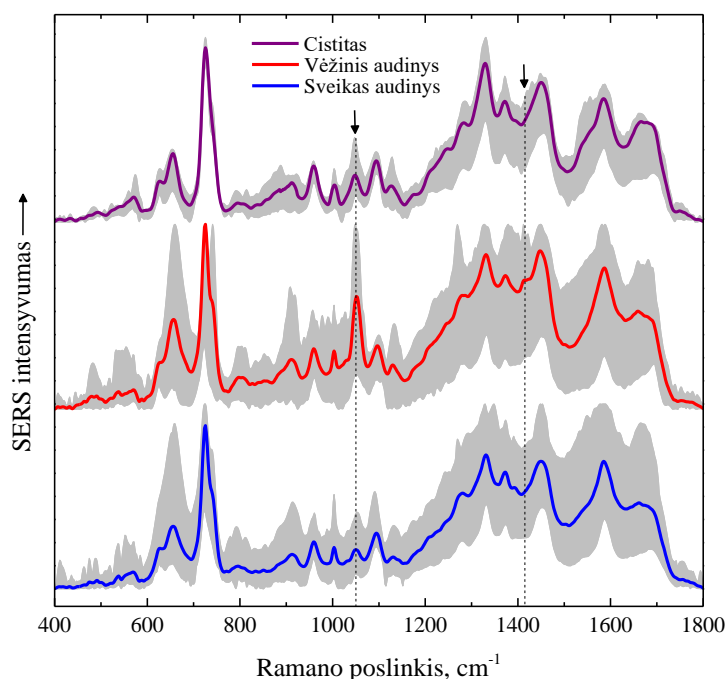
v – valentinis virpesys, δ – deformacinis virpesys.

Remiantis atlikta literatūros analize nustatyta, kad cistito paveiktų audinių SERS spektuose ties 1222 cm⁻¹ ir 1438 cm⁻¹ esančios spektrinės juostos yra susijusios su baltymų ir juos sudarančių aminorūgščių (fenilalanino ir tirozino) atomų grupių virpesiais. Yra žinoma, kad uždegimo srityje padidėja signalų perdavimo procesuose dalyvaujančių mediatorių išskyrimas. Tarp jų yra ir citokinai – didelė grupė baltymų, kurie koordinuoja ir reguliuoja organizmo imunines reakcijas. Spektrinė juosta, esanti ties 1438 cm⁻¹, susijusi ir su struktūrinio baltymo kolageno virpesiais. Cistito atveju yra galimi įvairūs patologiniai šlapimo pūslės sienelės audinių sluoksnių pakitimai. Suplonėjęs urotelio sluoksnis ir kiti epitelio pažeidimai gali lemti urotelio pamatinės membranos ir pogleivinio jungiamojo audinio, kurių vienas iš pagrindinių komponentų yra kolagenas, struktūrinius

pokyčius [30, 60]. Nustatyta, jog siekiant atstatyti šlapimo pūslės audinius ir sienelės storį, audinio uždegimo srityje gali padidėti kolageno ir kitų baltymų gamyba [61]. Dėl šių veiksnių skirtingų šlapimo pūslės audinių SERS spektruose esančių virpesinių juostų, kurios yra susijusios su baltymų virpesiais, intensyvumai gali skirtis. Virpesinė juosta, esanti ties 724 cm^{-1} , yra susijusi su DNR sudarančios nukleobazės adenino ir baltymų virpesiais. Šlapimo pūslės uždegimo vietoje yra galimi DNR pažeidimai, ląstelių irimas, spartesnis urotelio ląstelių apoptozės procesas. Tai gali daryti įtaką spektrinių juostų, susijusių su DNR molekulės virpesiais, intensyvumui.

3.2.2. Šlapimo pūslės tarpląstelinio skysčio sluoksnių spektrinė analizė

Darbo metu buvo užregistruoti sveikų, navikinių ir cistito paveiktų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis SERS spektrai (žr. 16 pav.). Svarbu paminėti, jog šiuose spektruose pateiktas virpesinių juostų intensyvumo kitimas (pažymėtas pilka spalva) gali būti lemiamas ne tik kiekvieno paciento individualios organizmo struktūros, bet ir dėl galimai nevienodo storio tarpląstelinio skysčio sluoksnių, suformuotų tyrimo metu. Taip yra todėl, kad įprastos ir paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos signalo intensyvumas priklauso nuo tiriamo bandinio storio. Pernelyg plonas tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis sluoksnio storis gali lemti silpną SERS signalą, o per storo sluoksnio SERS spektras gali būti panašus į audinio spektrą, kadangi šiuo atveju suformuotame sluoksnyje yra didelė ląstelių koncentracija.



16 pav. Sveiko, vėžinio ir cistito paveikto šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio sluoksnių SERS spektrų vidurkiai.

Šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrų vidurkiuose galima išskirti du pagrindinius spektrinius požymius, kurie suteikia galimybę atskirti sveiką ir cistito paveiktą audinį nuo navikinio. Tai yra virpesinės juostos, vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektruose esančios ties 1052 cm^{-1} ir 1414 cm^{-1} . Šios spektrinės juostos yra intensyvios vėžinių šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektruose, tačiau skirtingų pacientų sveiko ir cistito paveikto audinio SERS spektruose šios juostos nestebimos arba jos yra mažo intensyvumo. Lyginant šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrų vidurkius galima pastebėti, kad ties 1052 cm^{-1} esančios virpesinės juostos integrinis intensyvumas vėžinio audinio atveju yra apie 5 kartus didesnis nei sveiko ir beveik 3 kartus didesnis nei cistito paveiktų audinių. Tuo tarpu ties 1414 cm^{-1} esanti virpesinė juosta aiškiai matoma tik vėžinio audinio tarpląstelinio skysčio SERS spektruose. Kitų audinių spektruose šios juostos nėra arba ji yra mažo intensyvumo ir persikloja su kitomis spektrinėmis juostomis.

Remiantis atlikta literatūros [56-59] analize nustatyta, kad vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektruose esanti intensyvi virpesinė juosta, esanti ties 1052 cm^{-1} , susijusi su baltymų ir lipidų virpesiais (žr. 5 lentelę). Vėžinėse ląstelėse pakinta baltyminių medžiagų, vadinamų augimo faktoriais, sintezė. Jie reguliuoja ląstelės augimą, proliferaciją bei kitus ląstelės gyvavimo ciklo procesus. Šlapimo pūslės vėžio atveju, audinių bei šlapimo mėginiuose galima aptikti didesnes koncentracijas baltymų, kurie yra susiję su apoptozės slopinimu, angiogenezės skatinimu, lipidų transportavimu ir metabolizmu, metastazavimu [62]. Todėl vėžinio susirgimo atveju didesnę ties 1052 cm^{-1} esančios virpesinės juostos intensyvumą galima iš dalies paaiškinti didesne atitinkamų baltymų koncentracija vėžiniame audinyje. Lipidai atlieka ląstelių energijos kaupimo funkciją, dalyvauja signalų perdavime, ląstelių proliferacijos ir augimo procesuose. Kadangi vėžinių ląstelių nekontroliuojamo dalijimosi ir augimo metu sunaudojama daugiau energijos, navikinėse ląstelėse lipidų apykaita sutrinka [63]. Pakitęs šių molekulių metabolizmas gali lemti skirtingą lipidų koncentraciją bei jų pasiskirstymą sveikose ir vėžinėse ląstelėse. Šie pokyčiai priklauso nuo vėžio tipo, stadijos bei jo agresyvumo.

Nustatyta, kad šlapimo pūslės vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektruose esanti virpesinė juosta, stebima ties 1414 cm^{-1} , yra susijusi su baltymu, DNR ir pieno rūgšties molekulės virpesiais. Šios juostos intensyvumo pokyčiams įtaką gali daryti vėžiniams susirgimams būdingi organizmo genetinės medžiagos pakitimai. Yra žinoma, kad DNR struktūrinės mutacijos gali būti viena iš vėžinių ląstelių susiformavimo priežasčių. Pieno rūgšties koncentracijos padidėjimą vėžiniame audinyje galima paaiškinti remiantis Warburgo efektu (angl. *Warburg effect*). Adenozintrifosfato (ATP) molekulės yra vienos iš pagrindinių ląstelės energijos šaltinių. Sveikose nepakitusiose ląstelėse didžioji ATP dalis sintetinama oksidacinio fosforilavimo būdu, oksidacijos-redukcijos reakcijų metu dalyvaujant ADP (adenozindifosfatui) ir

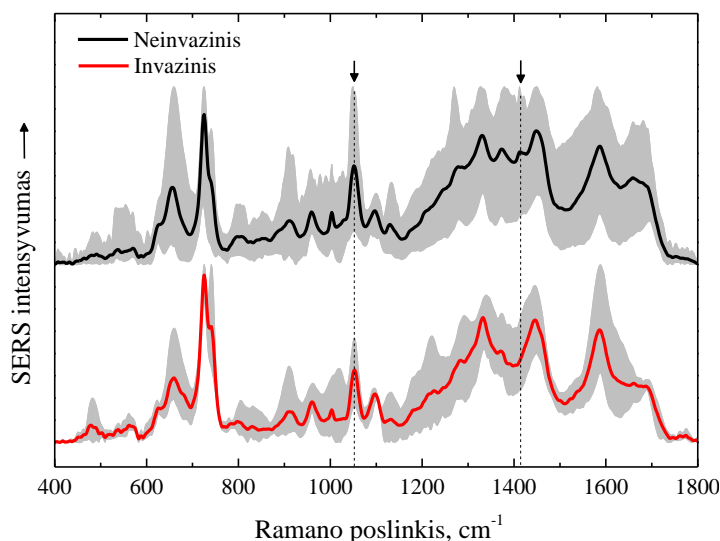
fosforo rūgščiai. Tačiau vėžinėms ląstelėms būdingas spartus glikolizės procesas – gliukozės molekulių skaidymas į piruvato molekules ir ATP molekulių suformavimas. Glikolizė, ATP sintezė atžvilgiu, nėra tokia efektyvi kaip oksidacinis fosforilinimas. Tačiau jos metu susidaro ląstelių dalijimuisi ir auglio augimui naudingų metabolitų, tarp kurių yra ir piruvato fermentacijos metu išskiriama pieno rūgštis [64].

5 lentelė. Šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrines juostas atitinkantys virpesiai [56-59].

Spektrinės juostos padėtis, cm^{-1}			Virpesys	Molekulė
Sveikas audinys	Vėžys	Cistitas		
475	479	474	-	DNR, RNR
538	538	538	$\nu(\text{S-S})$	Baltymai, angliavandeniai
568	570	573	-	Guaninas, timinas, uracilas
656	657	655	$\nu(\text{C-S})$	Cisteinas
725	725	725	Žiedo kvėpuojamasis virpesys, $\delta(\text{C-H})$	Adeninas (DNR), baltymai
796	798	796	-	Citozinas, baltymai
912	911	910	-	Baltymai, angliavandeniai
960	960	959	-	Cholesterolis
1003	1003	1004	Žiedo kvėpuojamasis virpesys	Fenilalaninas
1031	1030	1031	$\nu(\text{C-H})$	Fenilalaninas
1050	1052	1048	$\nu(\text{C-O}), \nu(\text{C-N})$	Baltymai, lipidai
1095	1097	1094	-	Baltymai
1131	1130	1127	$\nu(\text{C-N}), \nu(\text{C-C}), \nu(\text{C-O})$	Baltymai, lipidai, angliavandeniai
1281	1280	1282	-	Adeninas (DNR), baltymai
1331	1331	1330	-	Adeninas, guaninas (DNR), kolagenas
1372	1373	1372	Žiedo kvėpuojamasis virpesys	Adeninas, timinas, guaninas (DNR), lipidai
-	1414	-	-	Baltymai, DNR, pieno rūgštis
1450	1448	1450	$\delta(\text{CH}_2)$	Kolagenas, baltymai
1585	1587	1585	$\delta(\text{C=C})$	Fenilalaninas
1661	1659	1662	-	Fosfolipidai
v - valentinis virpesys, δ - deformacinis virpesys.				

Siekiant nustatyti, ar audinių tarpląstelinio skysčio tyrimų metu nustatyti spektriniai vėžio žymenys suteikia galimybę įvertinti šlapimo pūslės naviko kategoriją (neinvazinis ar invazinis), darbo metu buvo analizuojami skirtingos TNM sistemos klasifikacijos vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrai. Neinvazinio (T_a, T₁) ir invazinio (T_{2a}, T_{2b}, T_{3a}) navikų audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrų vidurkiai pateikti 17 pav. Neinvazinio šlapimo pūslės naviko atveju su baltymų ir lipidų virpesiais susijusios spektrinės juostos (1052 cm^{-1}) intensyvumas yra apie 1,5 karto didesnis, lyginant su invazinio naviko SERS spektrų vidurkiu. Be to, virpesinės juostos, esančios ties

1414 cm^{-1} , invazinio naviko SERS spektruose nėra, ji yra mažo intensyvumo ar persikloja su kitomis spektrinėmis juostomis. Tuo tarpu neinvazinio šlapimo pūslės naviko SERS spektruose ši juosta yra intensyvi. Spektrinius skirtumus tarp invazinio ir neinvazinio naviko SERS spektrų iš dalies galima paaiškinti tuo, kad šių kategorijų navikams gali būti būdingos skirtingos vėžinių susirgimą sukeliančios genetinės mutacijos, chromosomų pokyčiai, patogenetiniai keliai ir urotelio sričių, kuriose pradeda vystytis auglys, morfologijos [65]. Dėl to gali pakisti ir atitinkamų molekulių, reikalingų naviko vystymuisi, poreikis bei jų kiekis navike.

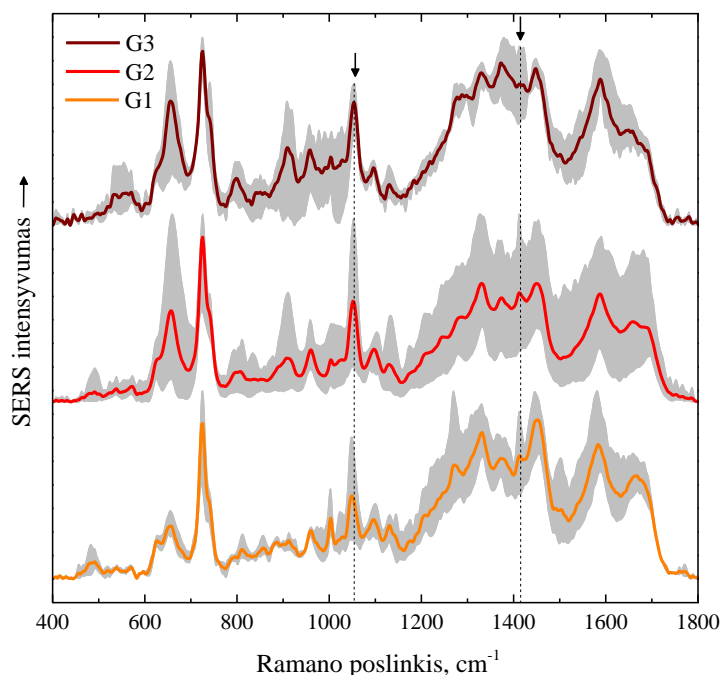


17 pav. Šlapimo pūslės navikų, priskiriamų invazinio ir neinvazinio auglių kategorijoms, SERS spektrų vidurkiai.

Eksperimentų metu taip pat buvo siekiama išskirti spektrinius šlapimo pūslės vėžio žyminis, kurie leistų identifikuoti naviką sudarančių ląstelių piktybiškumo laipsnį. Šiam tikslui pasiekti pasirinkti ir išanalizuoti neinvazinių navikų kategorijai priskiriamos skirtingo piktybiškumo papildinės karcinomos audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrai. Šių SERS spektrų vidurkiai pateikti 18 pav. Papildinė karcinoma pasirinkta dėl to, kad šios klasifikacijos naviko bandinių darbo metu buvo gauta daugiausiai. Be to, nors šios klasifikacijos auglys priskiriamas neinvazinių navikų kategorijai, didėjant papildinę karcinomą sudarančių ląstelių piktybiškumo laipsniui, didėja šio naviko išplitimo ir atsinaujinimo tikimybė. Todėl ankstyvas papildinės karcinomos diferenciacijos laipsnio nustatymas yra svarbus, siekiant tinkamai prognozuoti ligos eigą ir jos gydymo būdą.

Galima pastebėti, kad didėjant vėžinių ląstelių piktybiškumo laipsniui, virpesinės juostos, esančios ties 1052 cm^{-1} , intensyvumas didėja. Piktybiškumo laipsnio G2 papildinės karcinomos spektre šios juostos intensyvumas yra beveik 1,5 karto didesnis nei suvidurkintame piktybiškumo laipsnio G1 papildinės karcinomos SERS spektre. Tuo tarpu piktybiškumo laipsnio G3 SERS spektrų vidurkyje ties 1052 cm^{-1} esanti virpesinė juosta yra apie 1,4 karto intensyvesnė už piktybiškumo

laipsnio G2 papilinės karcinomos spektre esančią juostą. Todėl galima daryti prielaidą, jog didėjant ląstelių piktybiškumo laipsniui, navike didėja atitinkamų baltymų ir lipidų, būtinų vėžio progresavimui, koncentracija.

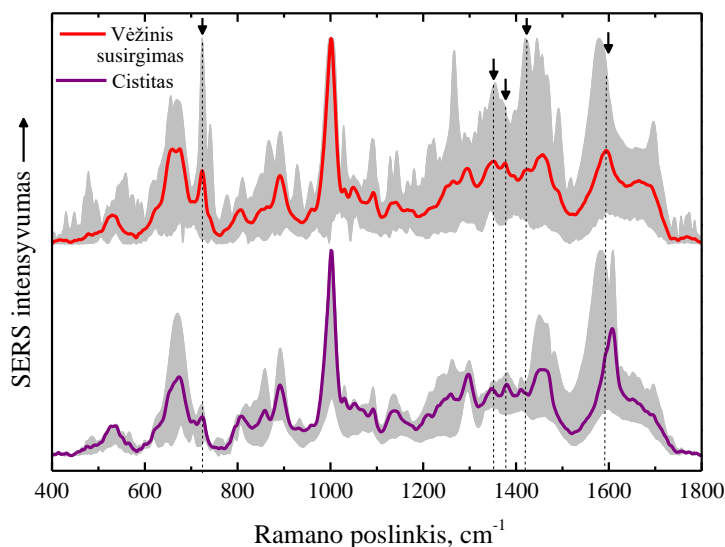


18 pav. Skirtingo piktybiškumo laipsnio (G1, G2, G3) papilinės karcinomos audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrų vidurkiai.

Spektrinės juostos, esančios vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektruose ties 1414 cm^{-1} , intensyvumo kitimas nėra nuoseklus didėjant ląstelės diferenciacijos laipsniui. Šios virpesinės juostos intensyvumas piktybiškumo laipsnio G1 atveju yra didesnis už virpesinės juostos, esančios G2 spektre, o G3 spektre juosta intensyvesnė nei piktybiškumo laipsnio G2 suvidurkintame spektre. Pacientų, kuriems buvo diagnozuota papilinė karcinoma, vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektruose ties 1414 cm^{-1} esančios juostos intensyvumo kitimas galimai priklauso nuo skirtingų organizmo fiziologinių savybių. Skirtingo piktybiškumo laipsnio papilinės karcinomos audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrų vidurkiuose stebimi ir kitų virpesinių juostų intensyvumo pokyčiai. Spektrinės juostos, esančios ties 657 cm^{-1} (cisteinas), 798 cm^{-1} (citozinas, baltymai), 911 cm^{-1} (baltymai, angliavandeniai) ir 1373 cm^{-1} (adeninas, timinas, guaninas, lipidai), yra žymiai intensyvesnės piktybiškumo laipsnio G3 suvidurkintame spektre lyginant su virpesinėmis juostomis, esančiomis G1 ir G2 spektruose. Didėjant vėžinių ląstelių diferenciacijos laipsniui, navikas plinta greičiau. Dėl to navikinėms ląstelėms reikalingi didesni kiekiai medžiagų, kurios yra būtinos naviko augimui (angliavandeniai, DNR nukleobazės, baltymai, aminorūgštys ir kitos).

3.2.3. Šlapimo pūslės nuoplovų spektrinė analizė

Tyrimo metu buvo siekiama identifikuoti šlapimo pūslės nuoplovose esančias molekules, pagal kurių koncentracijos pokyčius galima identifikuoti vėžinį susirgimą. Dėl to užregistruoti nuoplovų, gautų plaunant cistitu sergančių pacientų šlapimo pūslę ir šlapimo pūslę, kurioje buvo aptiktas navikas, SERS spektrai (žr. 19 pav.). Prieš atliekant šlapimo pūslės plovimą, joje esantis šlapimas yra pašalinamas. Tačiau pilnai ištuštinti šlapimo pūslę yra sudėtinga. Dėl šios priežasties nuoplovose yra aptinkamos šlapimą sudarančios medžiagos. Šlapimo sudėtyje esantys tokie purino metabolitai, kaip, pavyzdžiui, šlapimo rūgštis, ksantinas ir hipoksantinas pasižymi stipria adsorbcija ant metalų paviršių. Todėl šių molekulių virpesiams priskiriamos juostos šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose yra intensyvios ir gali persikloti su kitomis, galimai su ląstelių sudarančių molekulių virpesiais susijusiomis spektrinėmis juostomis. Šlapimo pūslės plovimo metu joje esančio šlapimo ir urotelio ląstelių kiekis skiriasi skirtingų pacientų atveju. Tai gali lemti spektrinių juostų intensyvumo pokyčius, kurie SERS spektruose pažymėti pilka spalva.



19 pav. Cistitu ir šlapimo pūslės vėžiu sergančių pacientų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų vidurkiai.

Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų vidurkiuose yra stebima ties 1606 cm⁻¹ virpesinė juosta, kuri cistito atveju yra žymiai intensyvesnė. Ši spektrinė juosta yra susijusi su baltymuose randamos aminorūgšties fenilalanino virpesiais (žr. 6 lentelę). Tačiau šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose galima išskirti 4 virpesines juostas, kurių intensyvumas yra didesnis vėžinio susirgimo atveju. Tai spektrinės juostos, šlapimo pūslės, kurioje buvo aptiktas navikas, nuoplovų SERS spektruose esančios ties 724 cm⁻¹, 1352 cm⁻¹, 1376 cm⁻¹ ir 1418 cm⁻¹. Jos susijusios su hipoksantino (724 cm⁻¹), adenino, guanino (1352 cm⁻¹), DNR nukleobazių (1376 cm⁻¹) ir kreatinino (1418 cm⁻¹)

atomų grupių virpesiais. Nustatyta, jog šlapimo pūslės vėžinio susirgimo atveju šlapime esančio hipoksantino koncentracija padidėja. Viena iš galimų hipoksantino koncentracijos pokyčio priežasčių – sutrikęs purinų metabolizmas vėžinėse ląstelėse. Purinai naudojami DNR, RNR sintezėje, energijos kaupime ir yra svarbūs ląstelių augimo bei dalijimosi procesuose. Dėl sutrikusios ląstelių proliferacijos, didesnių energijos sąnaudų ir kitų navikinėms ląstelėms būdingų veiksmų organizme esančių purino metabolitų, tarp kurių yra ir hipoksantinas, kiekis pakinta.

6 lentelė. Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrines juostas atitinkantys virpesiai [16, 66-68].

Spektrinės juostos padėtis, cm^{-1}		Virpesys	Molekulė
Cistitas	Vėžinis susirgimas		
536	530	$\nu(\text{PO}_3)$	Cholesterolio esteris, nukleorūgštys
664	659	$\delta(\text{O}=\text{C}-\text{N})$	Šlapimo rūgštis
724	724	$\nu(\text{C}-\text{H})$	Hipoksantinas
809	807	-	Šlapimo rūgštis
1002	1002	Žiedo kvėpuojamasis virpesys, $\nu(\text{C}-\text{N})$	Fenilalaninas, karbamidas
1052	1049	$\nu(\text{C}-\text{O}), \nu(\text{C}-\text{N})$	Baltymai, lipidai
1092	1093	-	Hipoksantinas
1138	1141	$\delta(\text{H}-\text{C}-\text{H})$	Šlapimo rūgštis, ksantinas, fenilalaninas
1260	1265	-	Kolagenas
1297	1295	$\delta(\text{CH}_2)$	Kolagenas
1347	1352	$\delta(\text{C}-\text{H})$	Adeninas, guaninas
1380	1376	Žiedo kvėpuojamasis virpesys, $\delta(\text{C}-\text{H})$	DNR nukleobazės
1411	1418	-	Kreatininas
1456	1457	-	Hipoksantinas
1606	1595	Žiedo kvėpuojamasis virpesys	Fenilalaninas

ν – valentinis virpesys, δ – deformacinis virpesys.

Padidėjusias adenino bei guanino koncentracijas organizme taip pat gali lemti purinų metabolizmo pokyčiai, kadangi šios nukleobazės susidaro purinų apykaitos metu. Kitos DNR molekulės sudarančios heterociklinės bazės – timinas ir citozinas – yra pirimidininiai organiniai junginiai. Urotelinių ląstelių karcinomos atveju, navikinėse ląstelėse esančių pirimidinų metabolizmas suaktyvėja, nes šio proceso metu susidarantys produktai, kaip ir purino metabolitai, yra būtini ląstelių proliferacijai [64]. Todėl šlapimo pūslės, kurioje buvo identifikuotas navikas, nuoplovų SERS spektruose su purinų ir pirimidinų metabolitų virpesiais susijusių spektrinių juostų intensyvumas gali būti didesnis nei cistitu sergančių pacientų atveju.

Kreatininas yra medžiagų apykaitos produktas, kuris susidaro vykstant raumenyse esančio kreatino fosfato metabolizmui. Į šlapimą kreatininas patenka kraujo filtravimo inkstuose metu. Inkstų ligos (uremija, lėtinė inkstų liga), dėl kurių sutrinka inkstų filtravimo funkcija, šlapimo takų

pažeidimai ar kiti jų pataloginiai pakitimai daro įtaką kreatinino koncentracijai šlapime. Be to, kreatinino kiekis šlapime priklauso ir nuo kūno svorio, raumenų masės, amžiaus, lyties bei mitybos [69]. Darbo metu nebuvo atsižvelgta į šiuos pacientų požymius. Dėl to šlapimo pūslės vėžio identifikavimas pagal spektrinės juostos, susijusios su kreatinino virpesiais, intensyvumo pokytį gali būti netikslus.

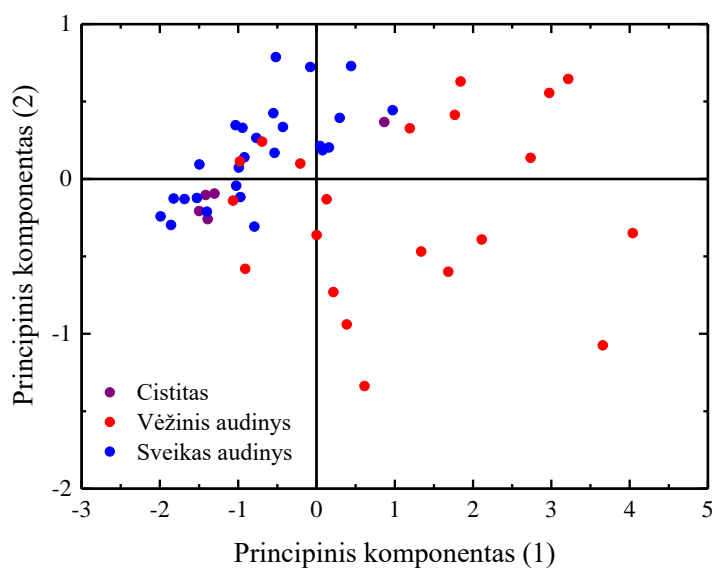
3.3. SERS spektrinių duomenų statistinė analizė

Siekiant įvertinti SERS metodikos tinkamumą šlapimo pūslės navikų identifikavimui, atlikta principinių komponentų analizė. Tyrimo metu panaudotas *Origin 9* programoje aprašytas PCA algoritmas. Duomenų projekcijos į pirmus du principinius komponentus gautos taikant analizę pagal duomenų rinkinio kovariacijos matricą. Dėl didelių skirtingų mėginių SERS spektruose esančių tuos pačius molekulių virpesius atitinkančių spektrinių juostų intensyvumo skirtumų, principinių komponentų analizei atlikti panaudotos tik šlapimo pūslės mėginių SERS spektruose esančių cistito ir vėžio žymenų spektrinės sritys. Prieš atliekant analizę, šie spektrai buvo sunormuoti pasirinkus spektrų minimumo-maksimumo normavimo funkciją.

Šlapimo pūslės audinių analizei pasirinktos skirtingų pacientų sveikų, vėžinių ir cistito paveiktų audinių SERS spektrų $700-750\text{ cm}^{-1}$, $1190-1260\text{ cm}^{-1}$ ir $1400-1460\text{ cm}^{-1}$ bangos skaičiaus sritys. Šios sritys pasirinktos todėl, kad jose stebimų virpesinių juostų (724 cm^{-1} , 1222 cm^{-1} ir 1438 cm^{-1}) intensyvumo pokyčiai gali būti susiję su cistitu. Atlikus šių spektrinių sričių principinių komponentų analizę paaiškėjo, jog visais atvejais sveikų, vėžinių ir cistito paveiktų audinių duomenų projekcijos į principinių komponentų plokštumą persikloja. Diagramose negalima nustatyti aiškių ribų tarp skirtingus audinius atitinkančių taškų grupių. Galima daryti prielaidą, jog virpesinių juostų, kurios šlapimo pūslės audinių tyrimų metu nustatytos kaip spektriniai cistito žymenys, intensyvumų kitimas galimai yra atsitiktinis ir priklauso nuo skirtingų pacientų fiziologijos bei kitų veiksnių. Dėl šios priežasties atitinkamų juostų pokyčiai negali būti priskirti tik cistito paveiktų audinių grupei.

Analizuojant audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis spektrus, pasirinktos $1020-1080\text{ cm}^{-1}$ ir $1390-1440\text{ cm}^{-1}$ spektrinės sritys. Jose stebimos spektrinės juostos, esančios ties 1052 cm^{-1} (baltymai, lipidai) ir 1414 cm^{-1} (baltymai, DNR, pieno rūgštis), audinių tarpląstelinio skysčio sluoksnių tyrimo metu nustatytos kaip galimi spektriniai vėžio žymenys. Spektrinės srities, kurioje stebima 1414 cm^{-1} virpesinė juosta, PCA diagramoje sveikų ir vėžinių šlapimo pūslės audinių duomenis atitinkantys taškai pasiskirstę plačiai. Didžioji šių taškų dalis persikloja. Cistito paveiktus audinius atitinkančių taškų dispersija PCA diagramoje taip pat yra didelė, todėl sudėtinga nustatyti galimą jų sankaupos sritį.

Baltymų ir lipidų virpesius atitinkančios juostos spektrinės srities (1020-1080 cm^{-1}) PCA diagramoje stebima aiškiai išsiskirianti visų pacientų sveikų audinių duomenis atitinkančių taškų grupė (žr. 20 pav.). Remiantis nedidele šių taškų dispersija galima daryti prielaidą, jog sveikuose šlapimo pūslės audiniuose atitinkamų baltymų ir lipidų, kurių atomų grupių virpesiai susiję su SERS spektruose ties 1052 cm^{-1} esančia juosta, koncentracija yra panaši. Vėžinių audinių duomenų atveju 4 iš 21 taško patenka į sveikų audinių duomenis atitinkančių taškų grupę. Tam įtaką gali daryti operacijos metu kartu su naviku pašalinta sveiko audinio dalis, audinių tarpląstelinio skysčio sluoksnių paruošimo netikslumai ir kiti veiksniai. Likę 17 taškų yra pakankamai nutolę nuo sveikus audinius atitinkančių taškų grupės. Šie taškai yra pasiskirstę plačiai, lyginant su kitais taškais. Didesnė taškų dispersija gali reikšti didesnę skirtumą tarp duomenų rinkinį sudarančių elementų. Tokį duomenų išsidėstymą galima paaiškinti tuo, kad skirtingo piktybiškumo vėžinėms ląstelėms gali būti reikalingas skirtingas baltymų ir lipidų, kurie būtini ląstelių dalijimuisi, naviko augimui bei metastazavimui, kiekis. Be to, didesniuose navikuose gali būti didesnės šių molekulių sancaupos. Taigi, galima teigti, jog sveikame ir vėžiniame audiniuose yra skirtingos baltymų ir lipidų koncentracijos, kurių pokyčius galima priskirti vėžiniam susirgimui.



20 pav. Sveikų, vėžinių ir cistito paveiktų audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrų 1020-1080 cm^{-1} srities principinių komponentų analizės diagrama.

Cistito paveiktus audinius atitinkantys taškai PCA diagramoje persikloja su sveikų audinių taškų grupe. Galima teigti, jog cistito paveiktų audinių tarpląstelinio skysčio sluoksnių SERS spektrų 1020-1080 cm^{-1} srities intensyvumo pokyčiai yra panašūs į sveikų audinių tarpląstelinio skysčio spektruose stebimus nuokrypius. Taigi, atlikus 1020-1080 cm^{-1} spektrinės srities duomenų principinių komponentų analizę nustatyta, kad 81 % vėžinio audinio bandinių gali būti priskirti atskirai grupei, kuriai būdinga didesnė duomenų dispersija nei sveikų ir cistito paveiktų audinių atveju.

Lyginant cistitu ir šlapimo pūslės vėžiu sergančių pacientų nuoplovų SERS spektrų sričių, kuriose stebimos galimai su vėžiniais susirgimais ($700-740\text{ cm}^{-1}$, $1335-1365\text{ cm}^{-1}$ ir $1365-1395\text{ cm}^{-1}$) ir cistitu ($1580-1620\text{ cm}^{-1}$) susijusios virpesinės juostos, duomenų PCA diagramoje esančius taškus, sudėtinga nustatyti ribas tarp atskirų grupių. Visais atvejais cistitu sergančių pacientų duomenis atitinkantys taškai pasiskirsto plačiai ir dalinai persikloja su šlapimo pūslės, kuriose buvo aptiktas navikas, nuoplovų duomenų sankaupa. Būtina paminėti, jog dėl mažo kiekio cistitu sergančių pacientų šlapimo pūslės nuoplovų mėginių, naudojant principinių komponentų analizę, SERS kaip vėžio diagnostikos metodo tinkamumas gali būti įvertintas netiksliai.

Remiantis gautais rezultatais, galima teigti, jog paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos metodas gali būti tinkamas šlapimo pūslės vėžio diagnostikai. Darbo metu nustatyti spektriniai sveiko, vėžinio ir cistito paveiktų audinių tarpląstelinio skysčio skirtumai gali būti naudojami šlapimo pūslės naviko identifikavimui, auglio kategorijos įvertinimui bei naviką sudarančių ląstelių piktybiškumo laipsnio nustatymui (papilinės karcinomos atveju). Tačiau dėl nepakankamos bandinių imties, skirtingų šlapimo pūslės vėžio kategorijų ir ląstelių diferenciacijos laipsnių tyrimai statistinės analizės metodais nebuvo atliekami. Todėl SERS metodikos tikslumas nustatant šiuos navikų požymius kol kas negali būti įvertintas. Be to, eksperimentų metu buvo tiriami tik urotelinių ląstelių karcinomos atvejai, todėl analizuojant šlapimo pūslės tarpląstelinio skysčio SERS spektrus kol kas negalima nustatyti skirtingų histologinių šlapimo pūslės vėžio tipų. Būtina paminėti, kad darbo metu nustatyti spektriniai vėžio žymenys ir įvertintas SERS metodikos tinkamumas gali būti patikslinti esant didesnei bandinių ir spektrinių duomenų imčiai.

Pagrindiniai rezultatai ir išvados

1. Nustatyta, kad efektyviausiai šlapimo rūgšties Ramano sklaidos signalą stiprina 6500 aps./min greičiu centrifuguotas koloidinis sidabro nanodalelių tirpalas. Šio koloidinio tirpalo sluoksniai pasižymi apie 16 kartų didesniu molekulės Ramano sklaidos signalo stiprinimu, lyginant su necentrifuguotu koloidiniu tirpalu.
2. Atlikus užregistruotų skirtingų pacientų šlapimo pūslės audinių, jų tarpląstelinio skysčio ir šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų analizę išskirtos virpesinės juostos, galimai susijusios su cistitu ir vėžiniais susirgimais. Nustatyta, jog tarpląstelinio skysčio sluoksnių SERS spektruose ties 1052 cm^{-1} esanti spektrinė juosta, susijusi su baltymų bei lipidų virpesiais, yra tinkamiausia šlapimo pūslės vėžio diagnostikai.
3. Šlapimo pūslės vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio SERS spektrų tyrimo metu nustatyta, kad virpesinės juostos, esančios ties 1052 cm^{-1} , intensyvumo kitimas gali būti susijęs su naviko kategorija ir, papildinės karcinomos atveju, ji sudarančių ląstelių piktybiškumo laipsniu.
4. Darbo metu atlikus 30 pacientų skirtingų šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio sluoksnių SERS spektrų principinių komponentų analizę nustatyta, kad pagal virpesinės juostos, esančios ties 1052 cm^{-1} , intensyvumo pokytį naviką galima identifikuoti 81 % tikslumu.

Literatūra

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424 (2018).
- [2] M. C. S. Wong, F. D. H. Fung, C. Leung, W. W. L. Cheung, W. B. Goggins, C. F. Ng, The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projections, *Scientific Reports*, 8(1), 1-12 (2018).
- [3] C.-Z. Zhu, H.-N. Ting, K.-H. Ng, T.-A. Ong, A review on the accuracy of bladder cancer detection methods, *Journal of Cancer*, 10(17), 4038-4044 (2019).
- [4] D. Drejer, J. B. Jensen, R. T. Bryan, Red patches during bladder cancer surveillance: to biopsy or not to biopsy?, *Trans. Androl. Urol.*, 7(2), 280-282 (2018).
- [5] H. Wiig, O. Tenstad, P. O. Iversen, R. Kalluri, R. Bjerkvig, Interstitial fluid: the overlooked component of the tumor microenvironment?, *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 3(12), 1-11 (2010).
- [6] M. Flezar, Urine and bladder washing cytology for detection of urothelial carcinoma: standard test with new possibilities, *Radiology and Oncology*, 44(4), 207-214 (2010).
- [7] G. Demirel, H. Usta, M. Yilmaz, M. Celik, H. A. Alidagi, F. Buyukserin, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): an adventure from plasmonic metals to organic semiconductors as SERS platforms, *Journal of Materials Chemistry C*, 6(20), 5314-5335 (2018).
- [8] B. N. Ames, L. S. Gold, W. C. Willett, The causes and prevention of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(12), 5258-5265 (1995).
- [9] G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition, The Development and Causes of Cancer, Sunderland (MA): Sinauer Associates (2000).
- [10] D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144(5), 646-674 (2011).
- [11] T. N. Seyfried, L. C. Huysentruyt, On the Origin of Cancer Metastasis, *Crit. Rev. Oncog.*, 18(1-2), 43-73 (2013).
- [12] M. Boeker, F. Franca, P. Bronsert, S. Schulz, TNM-O: ontology support for staging of malignant tumours, *Journal of Biomedical Semantics*, 7(1), 1-11 (2016).
- [13] J. Brierley, M. Gospodarowicz, B. O'Sullivan, The principles of cancer staging, *E-cancermedicalscience*, 10, 1-4 (2016).
- [14] L. A. Shamina, I. A. Bratchenko, D. N. Artemyev, O. O. Myakinin, A. A. Moryatov, O. I. Kaganov, A. E. Orlov, S. V. Kozlov, V. P. Zakharov, Raman and autofluorescence analysis of human body fluids from patients with malignant tumors, *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 3(2), 1-9 (2017).

- [15] K. Qian, Y. Wang, L. Hua, A. Chen, Y. Zhang, New method of lung cancer detection by saliva test using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Thoracic Cancer*, 9(11), 1556-1561 (2018).
- [16] V. Moisoiu, A. Socaciu, A. Stefanu, S. D. Iancu, I. Boros, C. D. Alecsa, C. Rachieriu, A. R. Chiorean, D. Eniu, N. Leopold, C. Socaciu, D. T. Eniu, Breat Cancer Diagnosis by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of Urine, *Appl. Sci.*, 9(4), 1-10 (2019).
- [17] M. Velicka, M. Pucetaite, V. Urboniene, J. Ceponkus, F. Jankevicius, V. Sablinskas, Detection of cancerous kidney tissue by means of SERS spectroscopy of extracellular fluid, *Journal of Raman Spectroscopy*, 48(12), 1744-1754 (2017).
- [18] K. Nicinski, J. Krajczewski, A. Kudelski, E. Witkowska, J. Trzcniska-Danielewicz, A. Girstun, A. Kaminska, Detection of circulating tumor cells in blood by shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy (SHINERS) in microfluidic device, *Scientific Reports*, 9(1), 1-14 (2019).
- [19] F. Ajallouelian, G. Lemon, J. Hilborn, I. S. Chronakis, M. Fossum, Bladder biomechanics and the use of scaffolds for regenerative medicine in the urinary bladder, *Nature Reviews Urology*, 15(3), 155-174 (2018).
- [20] K. C. DeGeorge, H. R. Holt, S. C. Hodges, Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment, *Am. Fam. Physician.*, 96(8), 507-514 (2017).
- [21] J. Mushtaq, R. Thurairaja, R. Nair, Bladder cancer, *Surgery (Oxford)*, 37(9), 529-537 (2019).
- [22] A. Jung, M. E. Nielsen, J. L. Crandell, M. H. Palmer, A. L. Bryant, S. K. Smith, D. K. Mayer, Quality of Life in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Survivors, *Cancer Nursing*, 42(3), 21-33 (2019).
- [23] M. G. K. Cumberbatch, A. P. Noon, Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer, *Translational Andrology and Urology*, 8(1), 5-11 (2019).
- [24] S. Sharma, P. Ksheersagar, P. Sharma, Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer, *Am. Fam. Physician.*, 80(7), 717-723 (2009).
- [25] J. S. Messer, D. J. Chew, M. A. McLoughlin, Cystoscopy: Techniques and clinical applications, *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 20(1), 52-64 (2005).
- [26] T. Schubert, S. Rausch, O. Fahmy, G. Gakis, A. Stenzl, Optical improvements in the diagnosis of bladder cancer: implications for clinical practice, *Therapeutic Advances in Urology*, 9(11), 251-260 (2017).
- [27] E. Oeyen, L. Hoekx, S. De Wachter, M. Baldewijns, F. Ameye, I. Mertens, Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 1-18 (2019).
- [28] K. A. Richards, N. D. Smith, G. D. Steinberg, The Importance of Transurethral Resection of Bladder Tumor in the Management of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review of Novel Technologies, *The Journal of Urology*, 191(6), 1655-1664 (2014).

- [29] J. Ebbing, R. C. Heckmann, J. W. Collins, K. Miller, B. Erber, F. Friedersdorff, T. F. Fuller, J. Busch, H. H. Seifert, P. Ardel, C. Wetterauer, A. Hosseini, F. Jentzmik, C. Kempkenseffen, Oncological outcomes, quality life outcomes and complications of partial cystectomy for selected cases of muscle-invasive bladder cancer, *Scientific Reports*, 8(1), 1-19 (2018).
- [30] S. Grover, A. Srivastava, R. Lee, A. K. Tewari, A. E. Te, Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis, *Ther. Adv. Urol.*, 3(1), 19-33 (2011).
- [31] G. Lee, R. Romih, D. Zupancic, *Cystitis: From Urothelial Cell Biology to Clinical Applications*, BioMed Research, 2014, 1-10 (2014).
- [32] R. S. Kirby, C. C. Carson, A. White, M. G. Kirby, *Men's Health*, 3rd Edition, CRC Press (2009).
- [33] R. S. Das, Y. K. Agrawal, Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications, *Vibrational Spectroscopy*, 57(2), 163-176 (2011).
- [34] E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P. G. Etchegoin, Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study, *J. Phys. Chem. C*, 111(37), 13794-13803 (2007).
- [35] M. M. Dvoynenko, J.-K. Wang, Finding electromagnetic and chemical enhancement factors of surface-enhanced Raman scattering, *Optics Letters*, 32(24), 3552-3554 (2007).
- [36] V. Vaičikauskas, G.-J. Babonas, Z. Kuprionis, G. Niaura, V. Šablinskas, *Paviršiaus optinė spektroskopija*, TEV (2008).
- [37] H. Chu, S. Song, C. Li, D. Gibson, Surface Enhanced Raman Scattering Substrates Made by Oblique Angle Deposition: Methods and Applications, *Coatings*, 7(2), 1-23 (2017).
- [38] E. Petryayeva, U. J. Krull, Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing - A review, *Analytica Chimica Acta*, 706(1), 8-24 (2011).
- [39] Y. Hong, Y.-M. Huh, D. S. Yoon, J. Yang, Nanobiosensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance for Biomarker Detection, *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1-13 (2012).
- [40] S. A. Maier, *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, Springer (2007).
- [41] E. Le Ru, P. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, Elsevier (2009).
- [42] Y. Sun, S. K. Gray, S. Peng, Surface chemistry: a non-negligible parameter determining optical properties of small colloidal metal nanoparticles, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(25), 11814-11826 (2011).
- [43] S. Z. Malynich, Estimation of Size and Concentration of Silver nanoparticles in Aqueous Suspensions from Extinction Spectra, *Journal of Nano- and Electronic Physics*, 78(4), 5-11 (2010).
- [44] S. Schlucker, *Surface Enhanced Raman spectroscopy. Analytical, Biophysical and Life Science Applications*, Wiley-VCH (2011).

- [45] J. N. Silva, J. Saade, P. M. A. Farias, E. H. L. Falcao, Colloidal Synthesis of Silver Nanoprisms in Aqueous Medium: Influence of Chemical Compounds in UV/Vis Absorption Spectra, *Advances in Nanoparticles*, 2(3), 217-222 (2013).
- [46] M. Doyen, J. Goole, K. Bartik, G. Bruylants, Amino Acid Induced Fractal Aggregation of Gold Nanoparticles: Why and How, *Journal of Colloid and Interface Science*, 464, 160-166 (2015).
- [47] S. L. Kleinman, R. R. Frontiera, A.-I. Henry, J. A. Dieringer, R. P. Van Duyne, Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(1), 21-36 (2013).
- [48] T. Chung, S.-Y. Lee, E. Y. Song, H. Chun, B. Lee, Plasmonic Nanostructures for Nano-Scale Bio-Sensing, *Sensors*, 11(11), 10907-10929 (2011).
- [49] S. P. Mishra, U. Sarkar, S. Taraphder, S. Datta, D. P. Swain, R. Saikhom, S. Panda. M. Laishram, Multivariate Statistical Data Analysis- Principal Component Analysis (PCA), *International Journal of Livestock Research*, 7(5), 60-78 (2017).
- [50] A. Tharwat, Principal component analysis - a tutorial, *International Journal of Applied Pattern Recognition*, 3(3), 197-240 (2016).
- [51] L. I. Smith, A tutorial on principal component analysis, Technical Report OUCS-2002-12, Cornell University (2002).
- [52] P. C. Lee, D. Meisel, Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols, *J. Phys. Chem.*, 86(17), 3391-3395 (1982).
- [53] Y. Ooi, I. Hanasaki, D. Mizumura, Y. Matsuda, Suppressing the coffee-ring effect of colloidal droplets by dispersed cellulose nanofibers, *Science And Technology of Advanced Materials*, 18(1), 316-324 (2017).
- [54] B. L. Goodall, A. M. Robinson, C. L. Brosseau, Electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy (E-SERS) of uric acid: a potential rapid diagnostic method for early preeclampsia detection, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(5), 1382-1388 (2013).
- [55] M. Pucetaite, M. Velicka, J. Pilipavicius, A. Beganskiene, J. Ceponkus, V. Sablinskas, Uric acid detection by means of SERS spectroscopy on dried Ag colloidal drops, *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(6), 681-686 (2016).
- [56] S. Mert, E. Ozbek, A. Otunctemur, M. Culha, Kidney tumor staging using surface-enhanced Raman scattering, *J. of Biomedical Optics*, 20(4), 1-10 (2015).
- [57] D. Jin, H. Chen, M. Cao, G. Yang, W. Xue, Y. Huang, SERS measurement of bladder cancer cells with the nanoparticles, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28(5), 1853-1856 (2015).
- [58] D. Jin, X. Wang, B. Fu, T. Li, N. Chen, Z. Chen, H. Chen, S. Liu, Raman spectroscopy of luminal subtype and basal subtype muscle invasive bladder cancer, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 12(5), 5447-5453 (2019).

- [59] S. Mert, M. Culha, Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Detection of Cancerous Renal Cells, *Applied Spectroscopy*, 68(6), 617-624 (2014).
- [60] J.-F. Jhang, H.-C. Kuo, Pathomechanism of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome and Mapping the Heterogeneity of Disease, *Int. Neurourol. J.*, 20(2), 95-104 (2016).
- [61] C.-W. Chung, Q. L. Zhang, L.-Y. Qiao, Endogenous Nerve Growth Factor Regulates Collagen Expression and Bladder Hypertrophy through Akt and MAPK Pathways during Cystitis, *The Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 4206-4212 (2010).
- [62] G. G. Amuran, I. P. Eyuboglu, I. Tinay, M. Akkiprik, New Insights in Bladder Cancer Diagnosis: Urinary miRNAs and Proteins, *Medical Sciences*, 6(4), 1-16 (2018).
- [63] J. Long, C.-J. Zhang, N. Zhu, K. Du, Y.-F. Yin, X. Tian, D.-F. Liao, L. Qin, Lipid metabolism and carcinogenesis, cancer development, *Am. J. Cancer Res.*, 8(5), 778-791 (2018).
- [64] Y. Cheng, X. Yang, X. Deng, X. Zhang, P. Li, J. Tao, C. Qin, J. Wei, Q. Lu, Metabolomics in bladder cancer: a systematic review, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 8(7), 11052-11063 (2015).
- [65] J. H. Shin, J. S. Lim, B. H. Jeon, *Bladder Cancer, Chapter 3 - Pathophysiology of Bladder Cancer*, Academic Press (2018).
- [66] L. Ma, Z. Zhang, X. Li, Non-invasive disease diagnosis using surface-enhanced Raman spectroscopy of urine and saliva, *Applied Spectroscopy Reviews*, 55(3), 197-219 (2019).
- [67] G. Del Mistro, S. Cervo, E. Mansutti, R. Spizzo, A. Colombatti, P. Belmonte, R. Zucconelli, A. Steffan, V. Sergio, A. Bonifacio, Surface enhanced Raman spectroscopy of urine for prostate cancer detection: A preliminary study, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(12), 1-9 (2015).
- [68] J. Chi, Y. Ma, F. L. Weng, H. Thiessen-Philbrook, C. R. Parikh, H. Du, Surface-enhanced Raman scattering analysis of urine from deceased donors as a prognostic tool for kidney transplant outcome, *J. Biophotonics*, 10(12), 1-13 (2017).
- [69] D. B. Barr, L. C. Wilder, S. P. Caudill, A. J. Gonzalez, L. L. Needham, J. L. Pirkle, Urinary Creatinine Concentrations in the U.S. Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements, *Environ. Health Perspect.*, 113(2), 192-200 (2005).

Santrauka

Edvinas Zacharovas

PAVIRŠIAUS SUSTIPRINTOS RAMANO SKLAIDOS METODO TAIKYMAS ŠLAPIMO PŪSLĖS VĖŽIO DIAGNOSTIKAI

Šlapimo pūslės vėžys yra vienas iš labiausiai paplitusių šlapimo sistemos organų piktybinių navikų. Klinikiniuose tyrimuose šlapimo pūslės vėžio diagnostikai dažniausiai naudojami cistoskopijos ir šlapimo pūslės ląstelių citologijos metodai yra efektyvūs diagnozuojant didelio diferenciacijos laipsnio navikinius darinius, tačiau pasižymi mažu jautrumu mažo piktybiškumo ir ankstyvos stadijos navikams. Todėl efektyviam šlapimo pūslės auglio identifikavimui reikalingi nauji patikimi diagnostikos metodai, kurie įgalintų greitą ir tikslų mėginių charakterizavimą.

Šio darbo tikslas – pritaikyti SERS metodą šlapimo pūslės navikų identifikavimui.

Tikslui pasiekti iškeltos tokios užduotys:

1. Nustatyti optimalų koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų paruošimo būdą.
2. Užregistruoti skirtingų pacientų šlapimo pūslės audinių, jų tarpląstelinio skysčio ir šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrus bei nustatyti spektrinius šlapimo pūslės vėžio žymenis.
3. Įvertinti SERS metodikos tinkamumą šlapimo pūslės naviko identifikavimui.

Darbo metu nustatyta, kad efektyviausiai šlapimo rūgšties Ramano sklaidos signalą stiprina 6500 aps./min greičiu centrifuguotas koloidinis sidabro nanodalelių tirpalas. Šio koloidinio tirpalo sluoksniai pasižymi apie 16 kartų didesniu molekulės Ramano sklaidos signalo stiprinimu, lyginant su necentrifuguotu koloidiniu tirpalu.

Naudojant optimaliomis sąlygomis paruoštą koloidinį tirpalą, užregistruoti sveikų, navikinių ir cistito paveiktų šlapimo pūslės audinių, jų tarpląstelinio skysčio ir šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai. Atlikus užregistruotų skirtingų pacientų šlapimo pūslės mėginių SERS spektrų analizę išskirti spektriniai žymenys, kurie suteikia galimybę identifikuoti vėžinį ir cistito paveiktą audinį. Nustatyta, jog tarpląstelinio skysčio sluoksnių SERS spektruose ties 1052 cm^{-1} esanti spektrinė juosta, susijusi su baltymų bei lipidų virpesiais, yra tinkamiausia šlapimo pūslės vėžio diagnostikai ir jos intensyvumo kitimas gali būti susijęs su naviko kategorija ir, papildinės karcinomos atveju, jį sudarančių ląstelių piktybiškumo laipsniu.

Atlikus 30 pacientų skirtingų šlapimo pūslės audinių tarpląstelinio skysčio sluoksnių SERS spektrų principinių komponentų analizę nustatyta, kad pagal virpesinės juostos, esančios ties 1052 cm^{-1} , intensyvumo pokytį naviką galima identifikuoti 81 % tikslumu.

Summary

Edvinas Zacharovas

THE DIAGNOSIS OF URINARY BLADDER CANCER BY MEANS OF SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY

Bladder cancer is one of the most common malignancies of the urinary system. Cystoscopy and urine or bladder washing cytology methods are commonly used in clinical trials for the diagnosis of bladder cancer. They are effective in diagnosing tumors with a high degree of differentiation, but have low susceptibility to low-grade and early-stage tumors. Therefore, effective identification of bladder tumors requires new reliable diagnostic methods that enable rapid and accurate characterization of samples.

The aim of this work was to apply the SERS method for the identification of bladder cancer.

The goals of this study:

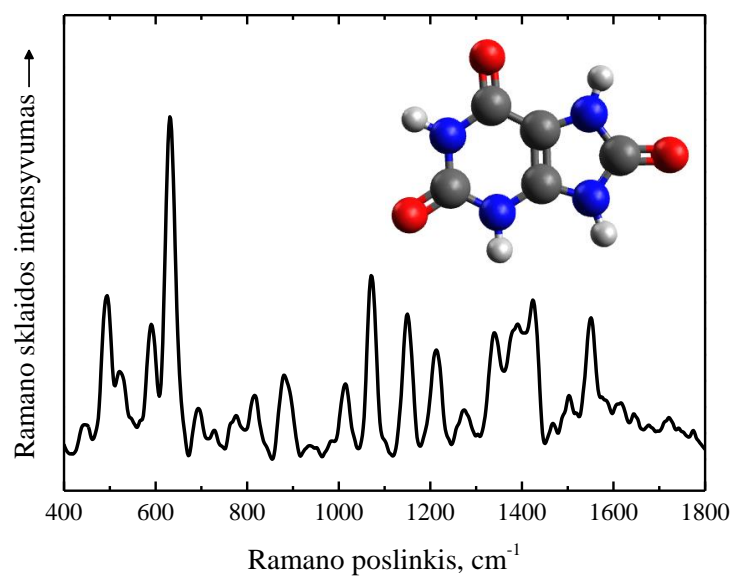
1. To determine the optimal method of preparation of colloidal silver nanoparticle solution.
2. To collect the SERS spectra of different patients' bladder tissues, their intercellular fluid, and bladder washings and to determine spectral markers of bladder cancer.
3. To evaluate the suitability of the SERS method for bladder tumor identification.

It was determined that the Raman scattering signal of uric acid is most effectively enhanced by a colloidal solution of silver nanoparticles centrifuged at 6500 rpm. The nanoparticle layers prepared using this colloidal solution show about a 16 times bigger intensity of the Raman scattering signal of the molecule compared to the non-centrifuged colloidal solution.

Using the optimal colloidal solution, SERS spectra of healthy, cancerous and cystitis-affected bladder tissues, their extracellular fluid and bladder washings were collected. Analysis of the collected SERS spectra of bladder samples from different patients revealed spectral markers that allow the identification of cancerous and cystitis-affected tissue. The vibrational band in the SERS spectra of the extracellular fluid layers, which is attributed to the vibrations of proteins and lipids (1052 cm^{-1}), was found to be the most suitable for bladder cancer diagnosis and the change of its intensity may be related to the tumor category and, in the case of papillary carcinoma, the degree of differentiation of cells.

The PCA of collected SERS spectra of extracellular fluid of 30 patients showed that based on changes in the intensity of the spectral band located at 1052 cm^{-1} tumor could be identified with 81 % accuracy.

Priedas



1 pav. Vandeningio šlapimo rūgšties tirpalo (50 mM) Ramano sklaidos spektras.