

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

MILDA PUČETAITĖ

INKSTŲ AKMENŲ IR BIOLOGINIŲ SKYSČIŲ TYRIMAS VIRPESINĖS
SPEKTROMETRIJOS IR MIKROSKOPIJOS METODAIS

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, Fizika (02P)

Vilnius, 2016 metai

Disertacija rengta 2012 – 2016 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas - prof. dr. Valdas Šablinskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika - 02P)

Mokslinis konsultantas - prof. dr. Per Uvdal (Lundo universitetas, fiziniai mokslai, fizika - 02P)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Fizikos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – prof. habil. dr. Leonas Valkūnas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

Nariai:

prof. habil. dr. Vidmantas Gulbinas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P);

prof. dr. Liutauras Marcinauskas (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P);

habil. dr. Gediminas Niaura (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P);

dr. Pawel Rodziewicz (Belostoko universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija bus ginama viešame Fizikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2016 m. rugsėjo mėn. 23 d. 13 val. Nacionalinio fizinių ir technologijos mokslų centro D401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 3, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2016 m. rugpjūčio mėn. 23 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto, Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

VILNIUS UNIVERSITY
CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

MILDA PUČETAITĖ

VIBRATIONAL SPECTROSCOPY AND MICROSPECTROSCOPIC IMAGING
OF URINARY STONES AND BIOLOGICAL FLUIDS

Summary of doctoral dissertation
Physical Sciences, Physics (02P)

Vilnius, 2016

The dissertation has been developed during the years 2012 – 2016 in Vilnius University

Supervisor - prof. dr. Valdas Šablinskas (Vilnius University, physical sciences, physics - 02P)

Advisor - prof. dr. Per Uvdal (Lund University, physical sciences, physics - 02P)

Dissertation will be defended in the Council of Physics of Vilnius University:

Chairman – prof. habil. dr. Leonas Valkūnas (Vilnius University, physical sciences, physics – 02P).

Members:

prof. habil. dr. Vidmantas Gulbinas (Vilnius University, physical sciences, physics – 02P);

prof. dr. Liutauras Marcinauskas (Kaunas University of Technology, physical sciences, physics – 02P);

habil. dr. Gediminas Niaura (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03P);

dr. Pawel Rodziewicz (University of Bialystok, physical sciences, chemistry – 03P).

The dissertation will be defended in the open session in the Council of Physics of Vilnius University on 23rd of September, 2016 at 13 o'clock in D401 auditorium, National Center of Physical and Technological Sciences, Vilnius University.

Address: Saulėtekio av. 3, Vilnius, Lietuva.

The Summary of the dissertation has been sent out on 23rd of August, 2016.

The dissertation is available in the Vilnius University Library, Library of Center for Physical Sciences and Technology and on Vilnius University website:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

Turinys

IVADAS	7
PAGRINDINIS DISERTACIJOS TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	9
GINAMIEJI TEIGINIAI	10
DARBO NAUJUMAS IR AKTUALUMAS.....	10
PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMATIKA SĄRAŠAS	12
<i>Publikacijos recenzuojamuose žurnaluose</i>	12
<i>Publikacijos nerecenzuojamuose žurnaluose</i>	12
PUBLIKACIJŲ NE DISERTACIJOS TEMATIKA SĄRAŠAS	13
PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE	14
DALYVAVIMAS FINANSUOJAMUOSE MOKSLO PROJEKTUOSE	15
DISERTACIJOS SANTRAUKA	17
DISERTACIJOS SANDARA.....	17
VIRPESINĖ SPEKTROMETRIJA IR JOS TAIKYMAI INKSTŲ AKMENŲ CHEMINĖS SUDĖTIES BEI STRUKTŪROS TYRIMAMS	17
<i>Inkstų akmenų analizė: eksperimentinė dalis</i>	18
<i>Inkstų akmenų tyrimo IR sugerties ir Ramano sklaidos spektrometrijos metodais rezultatai</i>	19
<i>Inkstų akmenų vaizdinimo IR atspindžio mikrospektrometrijos metodu rezultatai</i> ..	22
<i>Inkstų akmenų vaizdinimo netiesinės optinės mikroskopijos metodu rezultatai</i>	27
<i>Šlapimo nuosėdų analizė</i>	28
<i>Inkstų akmenų ir šlapimo nuosėdų analizės išvados</i>	31
VIRPESINĖS SPEKTROMETRIJOS TAIKYMAI BIOLOGINIŲ SKYSČIŲ TYRIMAMS	34
<i>Šlapimo rūgšties aptikimas vandeniniuose tirpaluose: eksperimentinė dalis</i>	34
<i>Šlapimo rūgšties aptikimas vandeniniuose tirpaluose: SERS substratų paruošimo metodikos įvertinimas</i>	35
<i>Šlapimo rūgšties aptikimas vandeniniuose tirpaluose: SERS spektrų analizė</i>	37

<i>Tarpląstelinio skysčio tyrimai: eksperimentinė dalis</i>	39
<i>Tarpląstelinio skysčio tyrimai: spektrinės analizės rezultatai</i>	39
<i>Biologinių skysčių analizės išvados</i>	42
BIBLIOGRAFIJA	43
SUMMARY	48
GOALS AND TASKS OF THE THESIS	50
STATEMENTS OF THE THESIS	50
NOVELTY AND RELEVANCE OF THE RESULTS	51
MAIN RESULTS	52
<i>Results of the analysis of urinary stones and urinary deposits</i>	52
<i>Results of the analysis of biological fluids</i>	54
CONCLUSIONS	55
<i>Conclusions of the analysis of urinary stones and urinary deposits</i>	55
<i>Conclusions of the analysis of biological fluids</i>	57

Įvadas

Sparti pažanga biologijos ir medicinos mokslų srityse sąlygoja vis didėjantį žinių apie biologinių molekulinį darinių cheminę sudėtį, struktūrą bei jos pakitimus, keičiant aplinkos sąlygas (pvz., temperatūrą), poreikį. Biologiniai molekuliniai dariniai pasižymi unikaliomis savybėmis, kurios nulemia mikroorganizmų, audinių ar organų funkcijas. Šių savybių tyrimui vis plačiau yra naudojami įvairūs spektriniai metodai, tarp kurių svarbią vietą užima virpesinė spektrometrija [1–7]. Tai standartinis metodas medžiagų cheminei sudėčiai nustatyti, molekulių struktūrai bei tarpmolekulinėms sąveikos tirti. Tinkamai pasirinkus vieną iš virpesinės spektrometrijos metodų, gali būti analizuojami bet kokios agregatinės būsenos, o panaudojant spektrinę mikroskopiją, ir labai maži bandiniai. Dėl šių priežasčių, virpesinė spektrometrija yra vis dažniau taikoma įvairiems biologiniams molekuliniam dariniams – mažoms molekulėms ir sudėtingoms baltymų struktūroms, biologiniams skysčiams, ląstelėms ir audiniams – tirti [8–13].

Daugelio šiuolaikinių mokslinių tyrimų, atliekamų virpesinės spektrometrijos metodais, tikslas yra naujų ankstyvos ligų diagnostikos būdų paieška [5,14–17]. Jų metu, anksčiau nei bet kuriuo kitu dabar žinomu cheminiu ar spektriniu metodu, aptinkami įvairių patologijų sąlygoti biocheminiai pakitimai ląstelėse, audiniuose ar biologiniuose skysčiuose. Atliekant eksperimentus laikantis griežto protokolo ir tokiais pačiomis sąlygomis, informacija gaunama virpesinės spektrometrijos metodais yra objektyvi ir nepriklauso nuo eksperimentatoriaus žinių ar patirties. Galiausiai, virpesinių spektrų registravimo sparta bei šviesolaidinės optikos taikymas atveria galimybes tyrimams *in vivo* [12,18–20].

Nepaisant šių privalumų bei daugybės atliekamų laboratorinių tyrimų, virpesinės spektrometrijos taikymas kasdienėje klinikinėje praktikoje iki šiol yra tik epizodiškas. Tam yra keletas priežasčių. Pirmiausia, norint taikyti naujus metodus klinikinėje praktikoje, būtina užtikrinti jų patikimumą atliekant klinikinius tyrimus [21,22]. Trūkstant artimo mokslininkų ir medikų bendradarbiavimo, tai yra nelengva

užduotis. Be to, biologinių molekulių ir jų darinių virpesiniai spektrai yra sudėtingi, turintys daug spektrinių juostų, kurios gali būti persiklojusios viena su kita [21]. Šiuose spektruose užkoduota visa informacija apie bandinio molekulinę sudėtį ir struktūrą, tačiau įprasta spektrinė analizė, kuomet nustatomi spektrinių juostų padėtis, pusplotis ir intensyvumas, nėra efektyvi; ypač, jei analizuojamas ne vienas spektras, o jų rinkinys. Tokiais atvejais turi būti taikomi statistiniai spektrų apdorojimo ir klasifikavimo metodai [23–25]. Be to, skirtingų bandinių tyrimui, atsižvelgiant į jų agragatinę būseną, aplinką ir kt., turi būti parenkamas tinkamiausias virpesinės spektrometrijos metodas. Infraraudonoji (IR) veidrodinio atspindžio spektrinė mikroskopija taikoma kietiems biologiniams bandiniams, tokie kaip inkstų akmenys, tirti [26]. Šis metodas yra tinkamiausias tiek cheminės sudėties, tiek struktūros nustatymui, kadangi, kitaip nei atliekant tyrimą daugeliu kitų dabar taikomų metodų, bandinys neturi būti sutrinamas iki miltelių pavidalo. Tačiau, veidrodinio atspindžio spektruose dominuoja *Reststrahlen* spektrinės juostos, kurių analizei, siekiant išgauti tiek kokybinę, tiek kiekybinę informaciją apie bandinį, reikalinga taikyti sudėtingas matematinės spektrų apdorojimo procedūras. Standartinis *Kramers-Kronig* vaizdavimas, dėl įvairių apribojimų, susijusių su spektrų registravimo metodika ir paties bandinio homogeniškumu, paviršiaus lygumu, ne visuomet yra tam tinkamas būdas. Kaip alternatyva IR veidrodinio atspindžio spektrinei mikroskopijai, inkstų akmenų tyrimams gali būti taikoma Ramano sklaidos spektrometrija. Šis metodas taip pat nereikalauja jokio išankstinio bandinių paruošimo, tačiau sklaidos signalą dažnai užgožia fluorescencijos fonas. Be to, dėl mažo Ramano sklaidos efektyvumo, spektrų registravimo trukmė yra ilga.

Mažas Ramano sklaidos efektyvumas taip pat sąlygoja mažą metodo pritaikomumą mažos koncentracijos medžiagų tirpaluose, tokiuose kaip įvairūs biologiniai skysčiai (šlapimas, kraujas, seilės ir kt.), aptikimui ir analizei ligų diagnostikai. Kitavertus, sklaidos signalo stiprinimui gali būti panaudojami plazmonikos reiškiniai metalų nanodalelėse ir tyrimui taikomas paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos metodas. Jo pritaikomumą klinikinėje praktikoje vis dar riboja registruojamų spektrų intensyvumo atsikartojamumas. Be to, kompleksinės sudėties bandiniuose reikalinga spręsti selektyvumo problemą [27,28].

Galiausiai, virpesinės spektrometrijos metodų taikymo klinikinėje praktikoje paplitimą riboja tai, kad jie diegiami kaip atskiri, tarpusavyje konkuruojantys metodai. Visapusiškai informacijai apie bandinius gauti bei universalumui pasiekti reikalingas kompleksiškas virpesinės spektrometrijos metodų taikymas.

Pagrindinis disertacijos tikslas ir uždaviniai

Atsižvelgiant į aukščiau aptartas problemas, **pagrindinis šios disertacijos tikslas** – kompleksiška pritaikyti virpesinės spektrometrijos ir spektrinės mikroskopijos metodus biomedicinoje svarbiems bandiniams – inkstų akmenims, šlapimo nuosėdoms ir biologiniams skysčiams – tirti. Pagrindinis dėmesys darbe skiriamas eksperimentinių ir duomenų analizės metodų adaptavimui tokių bandinių tyrimams, siekiant patikimų ir atsikartojančių rezultatų.

Tiksliui pasiekti buvo suformuluoti šie **uždaviniai**:

1. Iširti virpesinės spektrometrijos ir spektrinės mikroskopijos metodų tinkamumą išsamiai inkstų akmenų morfologinei ir cheminės sudėties analizei.
2. Iširti infraraudonosios (IR) spektrometrijos ir spektrinės mikroskopijos metodų tinkamumą šlapimo nuosėdų cheminės sudėties analizei.
3. Ištyrus skirtingų formų sidabro nanodalelių substratų, paruoštų džiovinant koloidinius tirpalus, signalo stiprinimo efektyvumą, nustatyti optimalias sąlygas mažos koncentracijos šlapimo rūgšties vandeniniuose tirpaluose aptikimui paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektrometrijos metodu. Atlikti teorinius šlapimo rūgšties molekūles, prisijungusias prie sidabro atomų klasterio, struktūros ir virpesinių spektrų skaičiavimus tankio funkcionalo teorijos artinyje.
4. Siekiant nustatyti spektrinius vėžinio inkstų audinio žymenis, atlikti tarpląstelinio skysčio, paimto iš sveikų audinių ir auglių inkstuose, IR sugerties spektrų analizę.

Ginamieji teiginiai

1. Veidrodinio atspindžio IR spektrinė mikroskopija viduriniojoje ir tolimojoje IR srityse gali būti efektyviai naudojama kietų bandinių šiurkščiu paviršiumi, tokių kaip inkstų akmenys, cheminiam vaizdinimui tik atlikus specialiai parinktą eksperimentinių spektrų apdorojimą.
2. Inkstų akmenų vaizdinimo netiesinės optinės mikroskopijos metodu rezultatai suteikia naudingos informacijos apie jų cheminę sudėtį ir mikrostruktūrą su didesne nei $1\ \mu\text{m}$ skyra.
3. Makro-ATR IR spektrometrija yra tinkamas metodas netipiškos kristalinės struktūros, polikristalinių ir amorfinių šlapimo nuosėdų cheminei sudėčiai nustatyti bei yra pranašesnis nei dabar šiuo tikslu taikoma optinė mikroskopija.
4. Dalinė kiekybinė informacija apie mažas (iki 10^{-6} M) šlapimo rūgšties koncentracijas vandeniniuose tirpaluose gali būti gaunama paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektrometrijos metodu ruošiant džiovinų koloidinių nanodalelių tirpalų substratus.
5. Statistinės analizės taikymas glikogeno spektrinių juostų, priskiriamų C-O valentiniams virpesiams, tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektruose leidžia 91 % tikslumu atskirti sveiką ir vėžinį inkstų audinius.

Darbo naujumas ir aktualumas

- Tik kompleksiskai taikant virpesinės spektrometrijos metodus įmanoma gauti visapusišką informaciją apie biologinės kilmės medžiagas nepriklausomai nuo jų dydžio, agregatinės būsenos ar koncentracijos bandinyje. Tokia galimybė yra itin patraukli taikant metodus klinikinėje praktikoje.

- Tiriant kietus biologinius objektus, tokius kaip inkstų akmenys, veidrodinio atspindžio IR spektrinės mikroskopijos metodu ir siekiant patikimos jų kokybinės ir dalinai kiekybinės analizės, atliekant matematinį spektrų apdorojimą, svarbu įskaityti sklaidaus atspindžio nuo šiurkščių paviršių įtaką. Iki šiol, dažniausiai to buvo nepaisoma.
- Nors iki šiol netiesinės optinės mikroskopijos metodas buvo daugiausiai naudojamas audinių ir lipidų juose analizei, jo panaudojimas taip pat suteikia galimybę tirti inkstų akmenų cheminę sudėtį ir mikrostruktūrą.
- Vienintelis dabar taikomas metodas ankstyvai inkstų akmenligės diagnostikai - optinė šlapimo nuosėdų mikroskopija – yra nepatikimas tiek aptinkant nuosėdas, tiek nustatant jų cheminę sudėtį. Makro-ATR IR spektrometrija yra pranašesnė analizuojant netipiškos kristalinės struktūros, polikristalines ir amorfines šlapimo nuosėdas ir yra tinkamas metodas tokiems tyrimams.
- Siekiant pritaikyti paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektrometrijos metodą kokybinei ir kiekybinei mažos koncentracijos medžiagų biologiniuose skysčiuose analizei klinikinėje praktikoje, svarbu, kad gaunami rezultatai būtų patikimi ir atsikartojantys. Šiame darbe parodoma, kad tai įmanoma ruošiant džiovinėtų koloidinių nanodalelių tirpalų substratus.
- Tarpląstelinio skysčio IR spektrometrinė analizė yra naujas, iki šiol netaikytas metodas siekiant nustatyti, ar tiriamas audinys yra sveikas ar vėžinis.

Publikacijų disertacijos tematika sąrašas

Publikacijos recenzuojamuose žurnaluose

1. M. Pucetaite, V. Hendrixson, A. Želvys, F. Jankevicius, J. Ceponkus, V. Sablinskas, Application of Infrared Spectroscopical Imaging in Specular Reflection Mode for Morphological Studies of Urinary Stones, *J. Mol. Struct.* **1031**, 38-42 (2013).
2. S. Tamošaitytė, V. Hendrixson, A. Želvys, R. Tyla, Z. A. Kučinskienė, F. Jankevičius, M. Pučetaitė, V. Jablonskienė, V. Šablinskas, Combined studies of chemical composition of urine sediments and kidney stones by means of infrared microspectroscopy, *J. Biomed. Opt.* **18(2)**, 027011 (2013).
3. M. Pucetaite, S. Tamosaityte, A. Engdahl, J. Ceponkus, V. Sablinskas, P. Uvdal, Microspectroscopic Infrared Specular Reflection Chemical Imaging of Multi-Component Urinary Stones: MIR vs. FIR, *Cent. Eur. J. Chem.* **12(1)**, 44-52 (2014).
4. 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, *J. Raman Spectrosc.* **47(6)**, 681-686 (2016).
5. M. Pucetaite, S. Tamosaityte, R. Galli, V. Sablinskas, G. Steiner, Microstructure of urinary stones as studied by means of multimodal nonlinear optical imaging, *J. Raman Spectrosc.*, n/a-n/a (2016) (online Early View, DOI: 10.1002/jrs.4985).

Publikacijos nerecenzuojamuose žurnaluose

1. M. Pucetaite, P. Banys, V. Sablinskas, Application of infrared reflection microspectroscopy for chemical imaging of cross-sectioned urinary calculi, *Proc. of SPIE* **8798**, 87980U (2013); doi:10.1117/12.2032506.
2. M. Pucetaite, M. Velicka, S. Tamosaityte, V. Sablinskas, Application of SERS spectroscopy for detection of trace components in urinary deposits, *Proc. of SPIE* **8957**, 895708-1 (2014); doi: 10.1117/12.2040386.
3. V. Urboniene, M. Velicka, J. Ceponkus, M. Pucetaite, F. Jankevicius, V. Sablinskas, G. Steiner, Intra-operative on-line discrimination of kidney cancer from normal

tissue by IR ATR spectroscopy of extracellular fluid, Proc. of SPIE **9704**, 97040E (2016); doi:10.1117/12.2213408.

Publikacijų ne disertacijos tematika sąrašas

1. S. Tamosaityte, E. Baltakyte, D. Blazevic, M. Pucetaite, J. Cefonkus, V. Hendrixson, S. Varvuolytė, V. Sablinskas, Baseline correction of infrared absorption spectra of urinary sediments by taking Mie scattering effects into account, Proc. of SPIE **8798**, 87980V (2013); doi:10.1117/12.2032508.
2. V. Urboniene, M. Pucetaite, F. Jankevičius, A. Želvys, V. Sablinskas, G. Steiner, Identification of kidney tumor tissue by infrared spectroscopy of extracellular matrix, J. Biomed. Opt. **19(8)**, 087005 (2014).
3. J. Cefonkus, M. Jonusas, C. P. Cotter, M. Pucetaite, V. Aleksa, G. A. Guirgis, V. Sablinskas, Structural Studies of 1,1-Dimethyl-2-oxy-1-silacyclohexane by Means of Matrix Isolation Infrared Absorption Spectroscopy, J. Phys. Chem. A **119(11)**, 2721-2726 (2015).
4. J. Cefonkus, V. Sablinskas, V. Aleksa, M. Pucetaite, R. Platakyte, C. W. Reed, C. Cotter, G. Guirgis, Raman and infrared spectroscopic studies of structure and stability of 1,1,2,2-tetrachloro-1,3-disilacyclopentane, Vib. Spectrosc. **81**, 136–43 (2015).
5. M. Velicka, V. Urboniene, J. Cefonkus, M. Pucetaite, F. Jankevicius, V. Sablinskas, Detection of cancerous biological tissue areas by means of infrared absorption and SERS spectroscopy of intercellular fluid, Proc. of SPIE **9550**, 95500A, (2015); doi:10.1117/12.2186395.
6. A. Stirke, R.-M. Apetrei, M. Kirsnyte, L. Dedelaite, V. Bondarenka, V. Jasulaitiene, M. Pucetaite, A. Selskis, G. Carac, G. Bahrim, A. Ramanavicius, Synthesis of Polypyrrole Microspheres by Streptomyces Spp., Polymer **84**, 99–106 (2016).
7. J. Pilipavicius, R. Kaleinikaite, M. Pucetaite, M. Velicka, A. Kareiva, A. Beganskiene, Controllable Formation of High Density SERS-Active Silver

Nanoprism Layers on Hybrid Silica-APTES Coatings, Appl. Surf. Sci. **377**, 134–40 (2016).

Pranešimai konferencijose

1. Valdas Šablinskas, Milda Pucetaite, Justinas Ceponkus, Chemical Imaging of Heterogeneous and Rough Surfaces by Means of Infrared Microspectroscopy in Specular Reflection, SciX2012 39th annual meeting of FACSS, Kansas City, USA
2. Sandra Tamošaitytė, Evelina Baltakytė, Milda Pučetaitė, Valdas Šablinskas, Šlapimo nuosėdų cheminės sudėties tyrimai FT-Ramano sklaidos spektriniu metodu, 40-oji Lietuvos Nacionalinė Fizikos Konferencija, 2013, Vilnius, Lietuva
3. Milda Pucetaite, Jonas P. Banys, Sandra Tamošaitytė, Justinas Čeponkus, Valdas Šablinskas, Biologinių paviršių cheminio vaizdinimo panaudojant infraraudonosios spinduliuotės veidrodinio atspindžio spektrus ypatumai, 40-oji Lietuvos Nacionalinė Fizikos Konferencija, 2013, Vilnius, Lietuva
4. Milda Pucetaite, Jonas P. Banys, Valdas Šablinskas, Application of Infrared Reflection Microspectroscopy for Chemical Imaging of Cross-sectioned Urinary Calculi, European conferences on biomedical optics (ECBO) (part of congress World of photonics) 2013, Munich, Germany
5. Sandra Tamosaityte, Evelina Baltakyte, Dominyka Blazevic, Milda Pucetaite, Justinas Ceponkus, Sonata Varvuolyte, Vaiva Hendrixson and Valdas Šablinskas, Baseline Correction of IR Spectra of Urinary Sediments by Taking *Mie* Scattering Effects into Account, European conferences on biomedical optics (ECBO) (part of congress World of photonics) 2013, Munich, Germany
6. Milda Pucetaite, Martynas Velicka, Valdas Šablinskas, Application of SERS spectroscopy for detection of trace components in urinary deposits, Photonics West 2014, San Francisco, USA
7. Vidita Urboniene, Milda Pucetaite, Feliksas Jankevicius, Valdas Šablinskas, Gerald Steiner, IR spectroscopical studies of intercellular liquid as tool for cancer detection, Photonics West 2014, San Francisco, USA

8. Milda Pucetaite, Martynas Velicka, Jurgis Pilipavicius , Almira Ramanaviciene, Indre Aleknaviciene, Evaldas Pabreza and Valdas Sablinskas, Comparative study of Raman enhancement effect for uric acid on various SERS substrates, EUCMOS 2014, Dusseldorf, Germany
9. Milda Pucetaite, Dominyka Blazevic, Elvyra Malysko, Vaiva Hendrixson and Valdas Sablinskas, Infrared spectroscopic analysis of urinary sediments: transmission vs. ATR, EUCMOS 2014, Dusseldorf, Germany
10. Milda Pučetaitė, Sandra Tamošaitytė, Roberta Galli, Gerald Steiner, Valdas Šablinskas, CARS mikroskopijos taikymas inkstų akmenų cheminiam vaizdinimui (Chemical Imaging of Urinary Stones by CARS Microscopy), 41-oji Lietuvos Nacionalinė Fizikos Konferencija, 2015, Vilnius, Lietuva
11. Milda Pučetaitė, Martynas Velička, Jurgis Pilipavičius, Valdas Šablinskas, SERS spektrometrijos taikymas šlapimo rūgšties aptikimui biologiniuose skysčiuose (Application of SERS Spectroscopy for Detection of Uric Acid in Biological Fluids), 41-oji Lietuvos Nacionalinė Fizikos Konferencija, 2015, Vilnius, Lietuva
12. Martynas Velicka, Milda Pucetaite, Justinas Cefonkus, Valdas Sablinskas, Application of various colloidal SERS approaches for detection of traces of uric acid, Global Biotechnology Congress 2015, Boston, USA

Dalyvavimas finansuojamuose mokslo projektuose

Didžioji dalis šioje disertacijoje pateikiamų tyrimų buvo finansuojami:

- VMS fondo remiamo projekto „Šlapimo takų akmenligės ir metabolinio sindromo priežastinių ryšių paieška ir tyrimas“ (2010-2011).
- Lietuvos mokslo tarybos finansuojamo projekto „Lėtinių neinfekcinių ligų diagnostiniai tyrimai infraraudonosios spektrinės mikroskopijos metodu“ (2011-2012).
- Europos socialinio fondo remiamo projekto „Puslaidininkinėse ir nanotechnologijose perspektyvių medžiagų kūrimas ir charakterizavimas

nuostoviosios ir ultrasparčiosios spektrometrijos metodais plačioje spektrinėje srityje“ (2013-2015).

- Nacionalinės mokslo programos „Sveikas senėjimas“ finansuojamo projekto „Spartusis vėžinių audinių spektrinis analizatorius“ (2015-2018).

Disertacijos santrauka

Disertacijos sandara

Disertaciją sudaro įvadas, trys skyriai, literatūros sąrašas ir keturi priedai. Įvade supažindinama su disertacijos tematika, keliamos su ja susijusios problemos. Joms spręsti, formuluojamas disertacijos tikslas, jam pasiekti – keturios užduotys. Taip pat, įvade pristatomi ginamieji teiginiai bei darbo svarba ir naujumas, pristatomas su disertacija susijusių mokslinių publikacijų sąrašas. Pirmajame skyriuje pateikiama literatūros, susijusios su disertacijos tematika, apžvalga. Antrajame ir trečiajame skyriuose – pristatomi darbo eksperimentinė metodika bei pasiekti rezultatai. Šių skyrių pabaigoje pateikiamos išvados.

Virpesinė spektrometrija ir jos taikymai inkstų akmenų cheminės sudėties bei struktūros tyrimams

Pirmajame disertacijos skyriuje trumpai aprašomi virpesinės spektrometrijos pagrindai bei šiuolaikiniai virpesinės spektrometrijos metodų – visiškojo vidaus atspindžio (angl. *attenuated total reflection* – *ATR*), infraraudonosios (IR) mikrospektrometrijos, paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (angl. *surface enhanced Raman scattering* – *SERS*) bei koherentinės anti-Stokso Ramano sklaidos (angl. *coherent anti-Stokes Raman scattering* – *CARS*) – taikymai biomediciniuose tyrimuose. Antrajame disertacijos skyriuje nagrinėjamos minėtų virpesinės spektrometrijos metodų taikymo inkstų akmenų cheminės sudėties bei struktūros tyrimams problemos, pateikiami šiame darbe siūlomi jų sprendimo būdai bei kompleksinio metodų taikymo rezultatai. Šių rezultatų pagrindu buvo suformuotas protokolas visapusiškai inkstų akmenų analizei. Taip pat, aptariami kontrolinės sveikų žmonių grupės, rizikos grupės pacientų bei inkstų akmenlige sergančiųjų šlapimo nuosėdų tyrimo IR pralaidumo mikrospektrometrijos, IR *ATR* spektrinės mikroskopijos (toliau mikro-*ATR*) bei IR *ATR*

spektroskopijos (toliau makro-ATR) metodais ypatumai. Skyriuje pateikiami rezultatai yra paskelbti penkiose disertantės ir bendraautorių publikacijose.

Inkstų akmenų analizė: eksperimentinė dalis

Inkstų akmenų ir šlapimo nuosėdų bandiniai šiame darbe buvo gauti iš Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų.

Inkstų akmenų cheminės sudėties ir struktūros analizei šiame darbe buvo kompleksiskai taikomi IR sugerties, IR veidrodinio atspindžio mikrospektrometrijos viduriniojoje IR (angl. *middle-infrared* – *MIR*) bei tolimojoje IR (angl. *far-infrared* – *FIR*) spektrinėse srityse, Ramano sklaidos spektrometrijos bei netiesinės optinės mikroskopijos (registruojami *CARS*, dvifotonės fluorescencijos (angl. *two-photon emission fluorescence* – *TPEF*) ir antros harmonikos generacijos (angl. *second harmonic generation* – *SHG*) signalai) metodai. Sugerties spektrų registravimui *MIR* ir *FIR* srityse inkstų akmenų bandiniai buvo ruošiami atitinkamai KBr arba polietileno (PE) tablečių metodais. Kokybinė užregistruotų spektrų analizė buvo atliekama lyginant juos su sintetinių medžiagų, dažniausiai sudarančių inkstų akmenis, tomis pačiomis sąlygomis užregistruotais spektrais.

Neįprasti morfologiniai makro- ir mikro-dariniai ant inkstų akmenų paviršiaus buvo analizuojami Ramano sklaidos spektrometrijos metodu. Spektrai buvo registruojami naudojant žadinantį neodimio jonais legiruatą itrio aliuminio granato (Nd:YAG) lazerį, kurio spinduliuotės bangos ilgis 1064 nm.

IR veidrodinio atspindžio mikrospektrometrija buvo taikoma šalinimo iš paciento organizmo metu neskaldytų akmenų skerspjuvių vaizdinimui. Tam, skenuojant, taškiniu jutikliu (puslaidininkiniu, skystu azotu šaldomu *MCT* – *MIR* spektrinėje srityje, skystu heliu šaldomu Si bolometru – *FIR* spektrinėje srityje) buvo registruojama pasirinkto dydžio atspindžio nuo bandinio paviršiaus spektrų matrica. Siekiant užregistruotus IR veidrodinio atspindžio spektrus, kuriuose dominuoja *Reststrahlen* spektrinės juostos, perskaičiuoti į sugerties spektrus, buvo atliekamas *Kramers-Kronig* vaizdavimas (angl. *Kramers-Kronig transformation* – *KKT*). Taip pat, siekiant išvengti spektrinių juostų iškraipymų, susijusių su sklaidaus atspindžio įtaka, prieš pritaikant *KKT*,

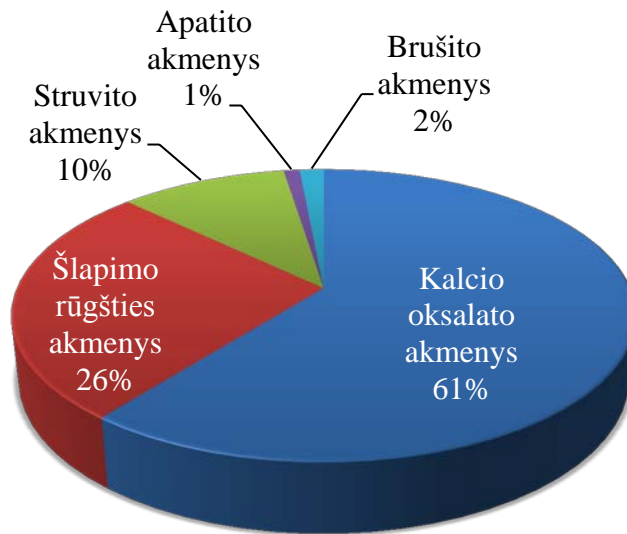
iš užregistruotų spektrų buvo atimama sklaidaus atspindžio dedamoji. Galiausiai, cheminiai žemėlapiai, kurie vaizduoja cheminių komponentų, esančių inkstų akmenyse, pasiskirstymą jų skerspjuvyje, buvo sudaromi dviem būdais: (I) skaičiuojant pasirinktų charakteringų spektrinių juostų integrinius intensyvumus, bei gautas vertes koduojant spalvomis, kurios parodo komponento satykinę koncentraciją tam tikroje bandinio vietoje, arba (II) atliekant hierarchinę klasterių analizę (angl. *hierarchical cluster analysis* – *HCA*), kuomet spalvomis koduojamos skirtingos spektrų grupės, atitinkančios skirtingą cheminę sudėtį bandinyje.

Dalis IR veidrodinio atspindžio mikrospektrometrijos metodu vaizdintų akmenų buvo analizuojami netiesinės optinės mikroskopijos metodu. Du, laike ir erdvėje persikloję lazerių spinduliuotės pluošteliai, vieno iš kurių bangos ilgis lygus 781,5 nm, o kito – yra keičiamas ir šiame darbe nustatytas ties 1005 nm ir 857 nm, buvo naudojami bandinio žadinimui. Tokiu būdu buvo analizuojamos spektrinės juostos ties 2850 cm^{-1} (priskiriama metileno funkcinės grupės CH valentiniams virpesiams) ir 1121 cm^{-1} (priskiriama šlapimo rūgšties C-O, C-N, C-C virpesiams) Ramano sklaidos spektruose. Jutikliais buvo registruojami ne tik *CARS*, bet ir *TPEF* bei *SHG* signalai. Skenuojant bandinį keičiant mikroskopo optinio xyz staliuko padėtį, buvo formuojami sudėtiniai registruojamų signalų vaizdai.

Šlapimo nuosėdų bandiniai šiame darbe buvo analizuojami IR pralaidumo mikrospektrometrijos, mikro-*ATR* ir makro-*ATR* metodais. Nuosėdos iš centrifuguoto šlapimo bandinių buvo išskiriamos filtruojant. Prieš registruojant IR sugerties spektrus IR pralaidumo mikrospektrometrijos metodu, bandiniai buvo sutraiškami siekiant išvengti visiškos spinduliuotės sugerties. Mikro-*ATR* ir makro-*ATR* spektrai buvo registruojami tiesiog prispaudus bandinį prie *ATR* elemento.

Inkstų akmenų tyrimo IR sugerties ir Ramano sklaidos spektrometrijos metodais rezultatai

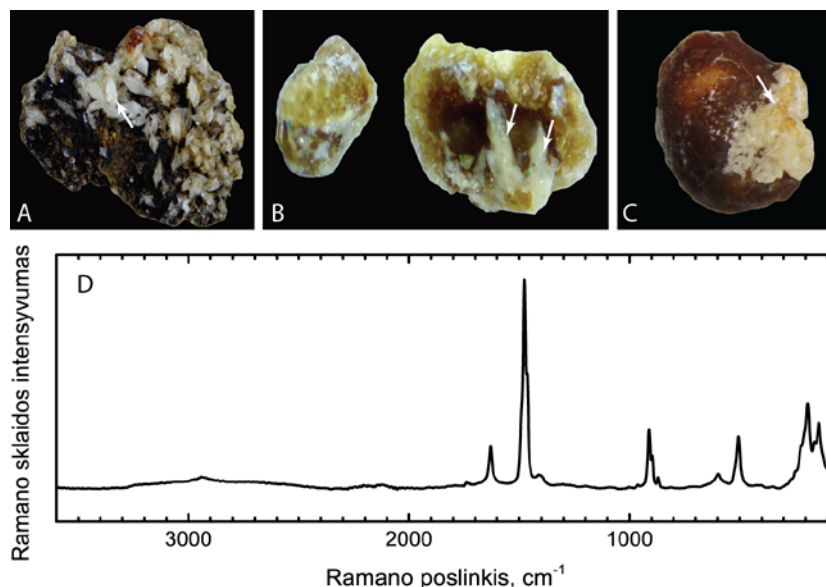
Šiame darbe buvo užregistruoti 403 inkstų akmenų bandinių IR sugerties spektrai, kurių analizė leido nustatyti jų cheminę sudėtį. Šios analizės rezultatai pateikti 1 paveiksle. Didžioji dalis (61 %) tirtų akmenų buvo sudaryti iš kalcio oksalato ar jo



1 pav. Šiame darbe IR spektrometrijos metodu tirtų 403 inkstų akmenų pasiskirstymas pagal tipus; grafikas parodo kalcio oksalato, šlapimo rūgšties, struvito, apatito ir brušito inkstų akmenų, aptinkamų akmenlige sergančių pacientų organizmuose, paplitimą Lietuvoje.

mišinių su įvairiais kalcio fosfatais (kalcio oksalato akmenys). Šlapimo rūgšties akmenys (akmenys, kurių didžiąją dalį sudaro šlapimo rūgštis) sudaro 26 % visų tirtų inkstų akmenų. Likusioji dalis – tai fosfatų - struvito (10 %), brušito (2 %) ir apatito (1 %) - akmenys. Šie rezultatai parodo inkstų akmenų tipų pasiskirstymą Lietuvoje.

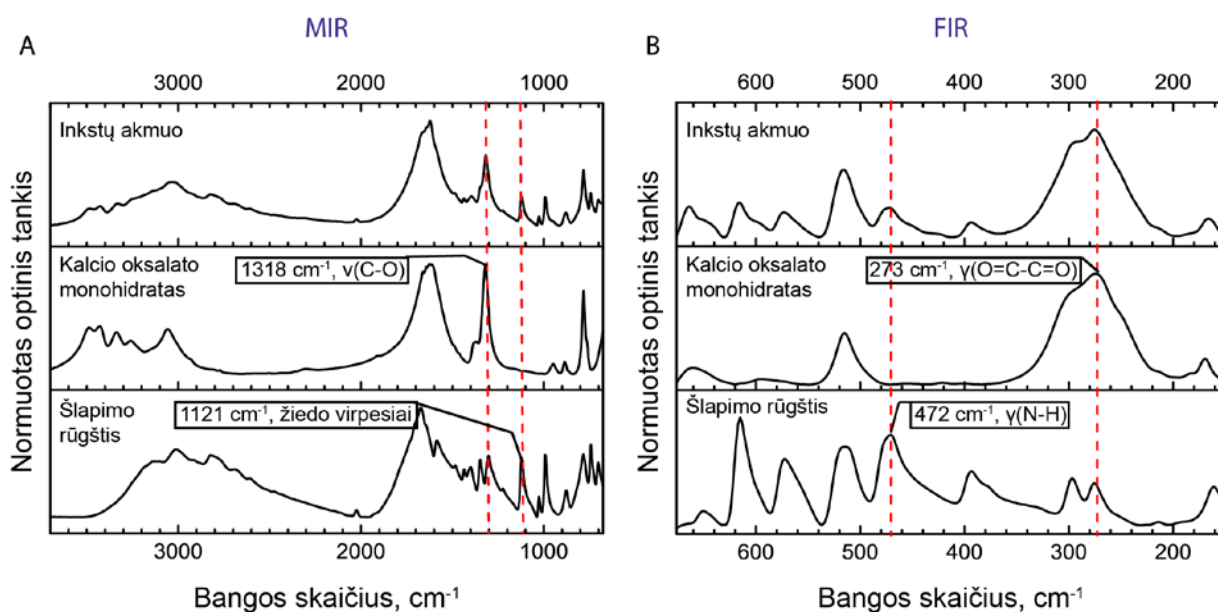
Informacija apie vėliausius inkstų akmenų formavimosi etapus gaunama



2 pav. (A-C) Kalcio oksalato inkstų akmenys, ant kurių paviršiaus matomi balti kalcio oksalato dihidrato kristalų dariniai (pažymėti rodyklėmis). (D) Baltų kalcio oksalato dihidrato kristalų esančių ant inkstų akmens, pavaizduoto (C), Ramano sklaidos spektras.

nustačius morfologinių struktūrų, esančių ant akmenų paviršiaus (2 pav.), cheminę sudėtį. Šiuo tikslu buvo registruojami minėtų struktūrų Ramano sklaidos spektrai. Pavyzdžiui, balti kristalai, esantys ant 2 paveiksle pavaizduotų kalcio oksalato inkstų akmenų paviršiaus, buvo identifikuoti kaip kalcio oksalato dihidratas. Jo Ramano sklaidos spektras pateikiamas 2 paveiksle D. Tokie kristalai yra ženklas, kad akmuo aktyviai formavosi prieš jį pašalinant iš organizmo [29,30].

Dėl stiprios dominuojančių komponentų inkstų akmenyse sugerties, mažos koncentracijos komponentai, taip pat esantys akmenyse, dažnai nėra aptinkami. Jų identifikavimas yra svarbus siekiant kuo tiksliau išsiaiškinti inkstų akmenų augimo organizme procesus, susieti juos su organizmo patologijomis. Šiuo tikslu, buvo registruojami sugerties spektrai ne tik *MIR*, bet ir *FIR* spektrinėje srityje. Inkstų akmens, sudaryto iš šlapimo rūgšties ir kalcio oksalato monohidrato, bei atitinkamų sintetinių medžiagų normuoti *MIR* ir *FIR* spektrai pateikti 3 paveiksle. *MIR* sugerties spektruose kalcio oksalato monohidrato spektrinės juostos yra panašaus intensyvumo bei persiklojusios su šlapimo rūgšties spektrinėmis juostomis. Todėl, maži jo kiekiai šlapimo rūgšties inkstų akmenyse (apytiksliai kai $c_{\text{šlapimo rūgšties}} > 4 \cdot c_{\text{kalcio oksalato monohidrato}}$) dažnai negali būti aptinkami. *FIR* sugerties spektruose kalcio oksalato monohidrato spektrinė

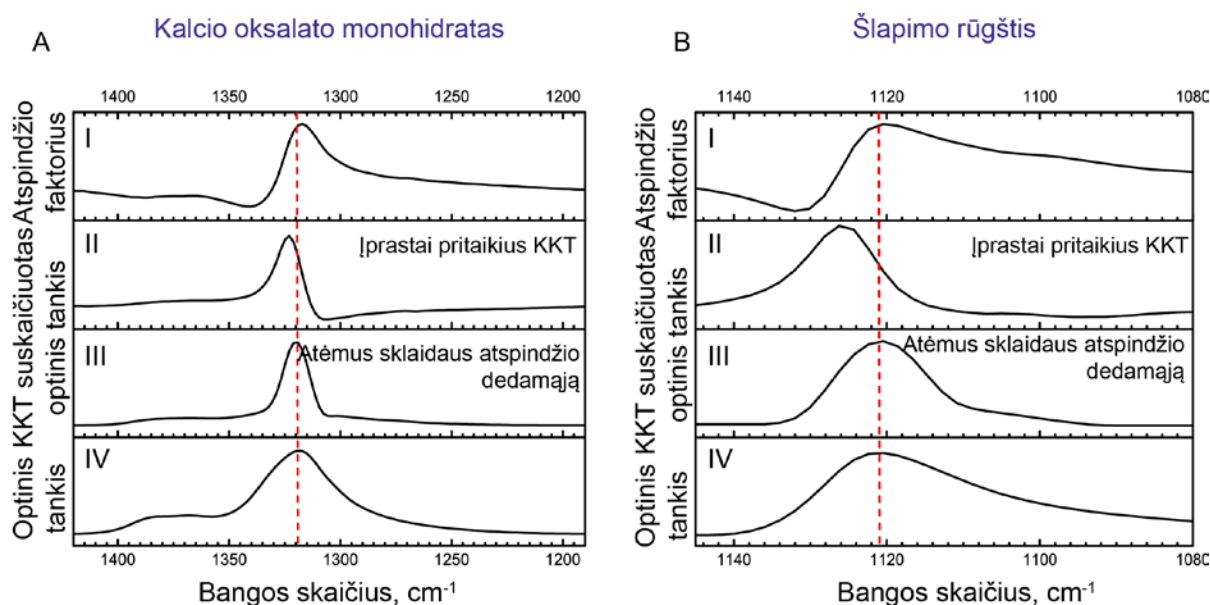


3 pav. IR sugerties spektrai (A) *MIR* ir (B) *FIR* spektrinėse srityse: viršuje – inkstų akmens, sudaryto iš šlapimo rūgšties ir kalcio oksalato, viduryje – sintetinio kalcio oksalato monohidrato, apačioje – sintetinės šlapimo rūgšties. Radonos punktyrinės linijos žymi komponentų charakteringas spektrines juostas, kurios vėliau buvo naudojamos ir sudarant cheminius žemėlapius.

juosta ties 273 cm^{-1} (priskiriama $\nu(\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{O})$ virpesiui) yra daug intensyvesnė nei šlapimo rūgšties spektrinės juostos šioje srityje, todėl, net esant mažiems jo kiekiams, jis gali būti aptinkamas. Atitinkamai, šlapimo rūgštis identifikuojama analizuojant spektrines juostas, esančias $700 - 550\text{ cm}^{-1}$ spektrinėje srityje. Šiuo ir kitais atvejais, spektrų tiek *MIR*, tiek *FIR* srityse registravimas leidžia sėkmingiau identifikuoti visus inkstų akmenyse esančius komponentus.

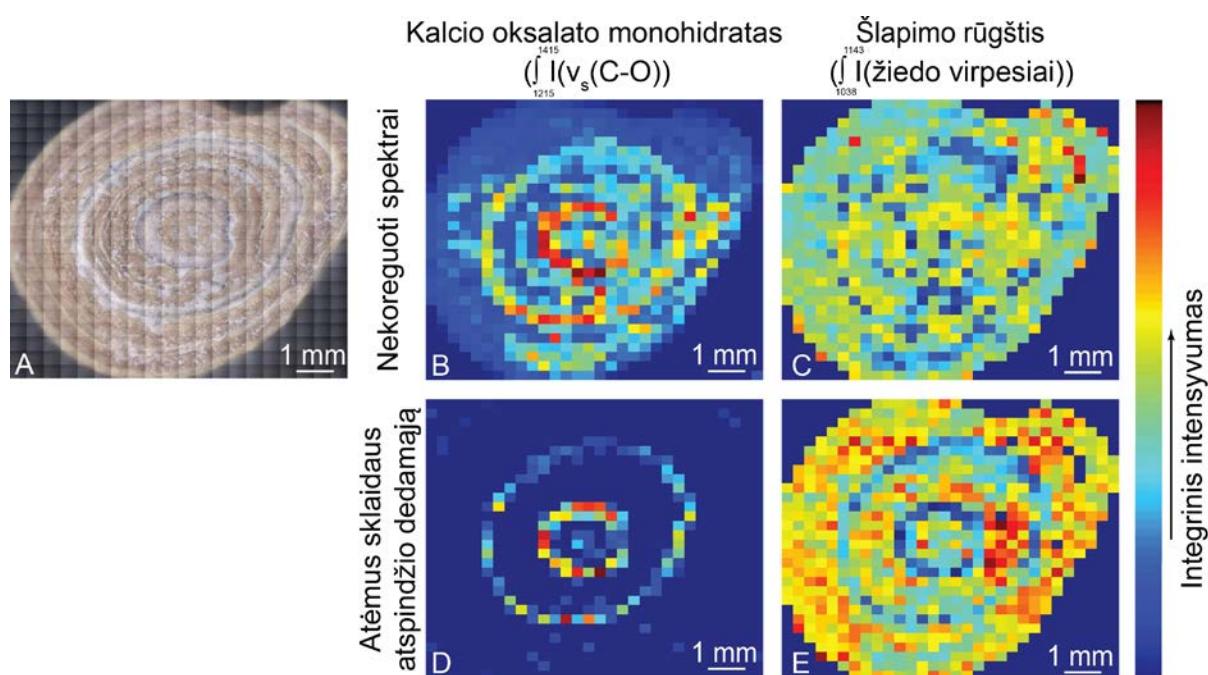
Inkstų akmenų vaizdinimo IR atspindžio mikrospektrometrijos metu rezultatai

Inkstų akmenys, kurie, jų pašalinimo iš žmogaus organizmo procedūros metu, nebuvo suskaldyti, taip pat buvo tiriami IR veidrodinio atspindžio mikrospektrometrijos metodu. Veidrodinio atspindžio spektruose stebimos *Reststrahlen* spektrinės juostos, kurios, dėl anomalous lūžio rodiklio dispersijos, savo forma yra panašios į sugerties spektrinių juostų pirmąją išvestinę. Siekiant atlikti tikslią tokių spektrų analizę bei inkstų akmenų skerspjūvių vaizdinimą skaičiuojant charakteringų juostų integrinius intensyvumus, būtina juos perskaičiuoti į sugerties spektrus, panaudojant *KKT* vaizdavimą. Tačiau taip perskaičiuotų spektrų kokybė labai priklauso nuo bandinio paviršiaus lygumo - kuo lygesnis paviršius, tuo mažesnė sklaidaus atspindžio įtaka spektrui, tuo tiksliau suskaičiuojamas sugerties spektras.



4 pav. Kalcio oksalato monohidrato (A) ir šlapimo rūgšties (B) charakteringos spektrinės juostos IR atspindžio (I), taikant *KKT* vaizdavimą suskaičiuotuose sugerties (II ir III) bei IR sugerties (IV) spektruose.

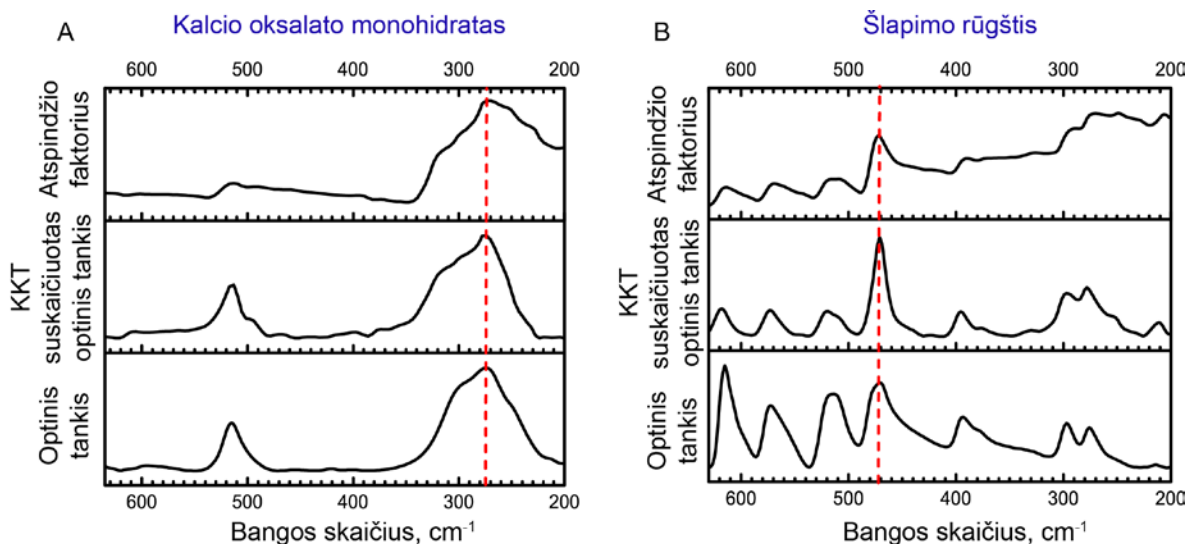
Nupoliruoti inkstų akmenų skerspjūvio paviršius taip, kad nebūtų sklaidoma IR spinduliuotė, ne visuomet įmanoma dėl jų trapumo. Be to, skirtingų cheminių komponentų sandūros akmens skerspjūvyje taip pat yra sklaidos centrai [31]. Todėl, prieš pritaikant IR atspindžio spektrams *KKT* vaizdavimą, buvo atlikta eksperimentinių spektrų korekcija, iš jų eliminuojant sklaidaus atspindžio komponentę. Kaip keičiasi kalcio oksalato monohidratui ir šlapimo rūgščiai charakteringų spektrinių juostų atitinkamai ties 1318 cm^{-1} (simetrinis valentinis C-O virpesys [32]) ir 1121 cm^{-1} (žiedo



5 pav. Optinis inkstų akmenis, sudaryto iš šlapimo rūgšties ir kalcio oksalato monohidrato, vaizdas (A) ir komponentų pasiskirstymo cheminiai žemėlapiai, sudaryti suskaičiuojant integrinius intensyvumus spektrinių juostų eksperimentiniame IR atspindžio spektre (B, C) ir juostų, atėmus sklaidaus atspindžio dedamąją, panaudojant *KKT* suskaičiuotuose spektruose (D, E).

virpesiai [33]) kontūrai IR atspindžio, sugerties ir suskaičiuotuose panaudojant *KKT* spektruose, pavaizduota 4 paveiksle. Kaip matyti, tik atėmus sklaidaus atspindžio dedamąją, panaudojant *KKT* suskaičiuotos spektrinės juostos padėtis bei kontūro forma sutampa su spektrine juosta eksperimentiniame IR sugerties spektre.

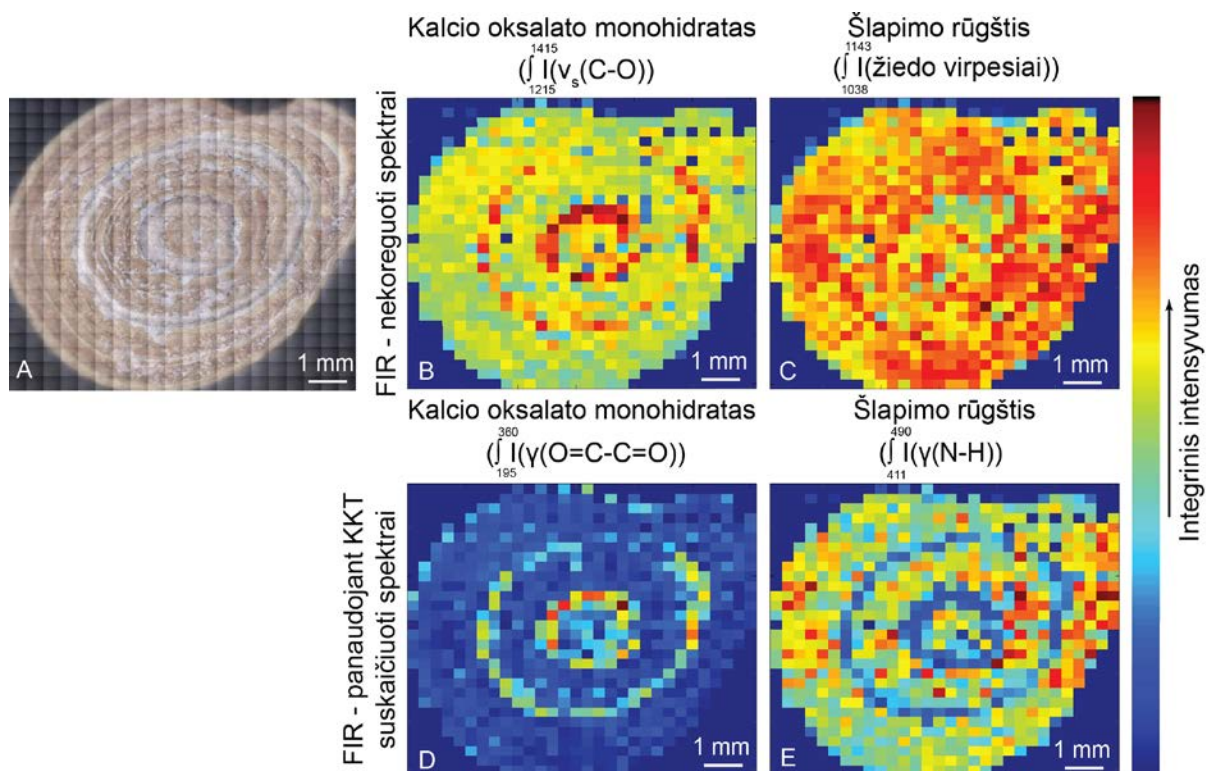
Inkstų akmenis, sudaryto iš šlapimo rūgšties ir kalcio oksalato monohidrato cheminiai žemėlapiai, sudaryti skaičiuojant charakteringų spektrinių juostų integrinius intensyvumus IR atspindžio ir, atėmus sklaidaus atspindžio dedamąją, panaudojant *KKT* suskaičiuotuose spektruose, pavaizduoti 5 paveiksle. Lyginant sudarytus cheminius



6 pav. Kalcio oksalato monohidrato (A) ir šlapimo rūgšties (B) *FIR* atspindžio (viršuje), taikant *KKT* vaizdavimą suskaičiuoti sugerties (viduryje) bei *FIR* sugerties (apačioje) spektrai. Raudonos punktyrinės linijos žymi komponentų charakteringas spektrines juostas bei leidžia stebėti spektrinių juostų poslinkį kiekviename spektre.

žemėlapius su optiniu inkstų akmenų skerspjūvio vaizdu, nustatyta, kad žemėlapių, sudarytų naudojant suskaičiuotas spektrines juostas, kontrastas yra didesnis, t.y., ribos tarp skirtingų komponentų gali būti išskiriamos geriau, jų pasiskirstymas nustatomas tiksliau. Cheminiai žemėlapiai nebuvo sudaromi panaudojant spektrines juostas, taikant *KKT* vaizdavimą, bet prieš tai neatėmus sklaidos atspindžio dedamosios, suskaičiuotuose spektruose; kaip buvo parodyta, spektrinių juostų kontūrai šiuose spektruose iškraipyti ir vaizdinimui netinkami (4 pav.). Panašūs rezultatai buvo gauti tiriant kitų, skirtingų tipų inkstų akmenų cheminę sudėtį ir struktūrą.

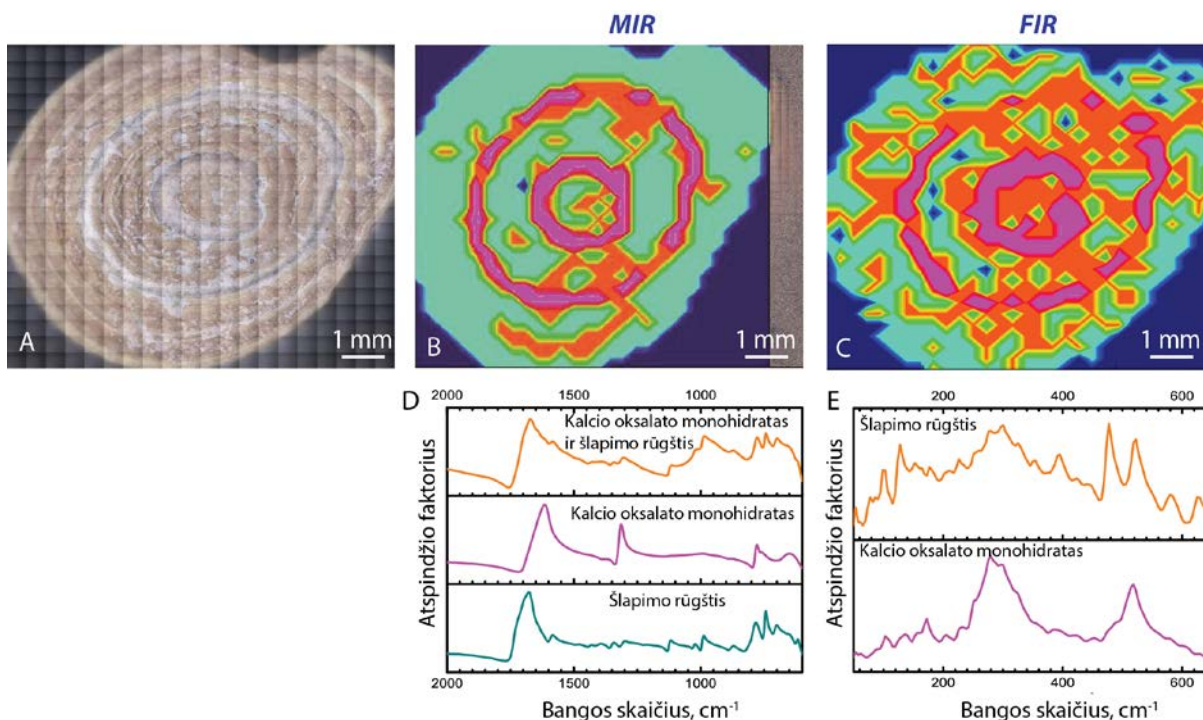
IR atspindžio spektrų koregavimas atimant sklaidos atspindžio dedamąją, nors ir leidžia pasiekti norimus rezultatus, reikalauja sudėtingo spektrų apdorojimo. Toliau bus parodyta, kad inkstų akmenų vaizdinimui naudojant *FIR* spinduliuotę, spektrinė analizė gali būti supaprastinta. Taip yra todėl, kad didesnio bangos ilgio *FIR* spinduliuotė nėra sklaidoma arba sklaidoma mažiau nei mažesnio bangos ilgio *MIR* spinduliuotė ir *FIR* atspindžio spektruose dominuoja veidrodinio atspindžio dedamoji. Tai reiškia, kad *KKT* vaizdavimas gali būti taikomas tiesiog užregistruotiems spektrams, be papildomo apdorojimo atimant sklaidos atspindžio dedamąją. Spektrinių juostų padėtis ir forma *FIR* spektruose, suskaičiuotuose pritaikius *KKT* vaizdavimą, gerai



7 pav. Optinis inkstų akmenis, sudaryto iš šlapimo rūgšties ir kalcio oksalato monohidrata, vaizdas (A) ir komponentų pasiskirstymo cheminiai žemėlapiai, sudaryti skaičiuojant charakteringų spektrinių juostų integrinius intensyvumus *FIR* atspindžio spektruose (B, E) bei *FIR* spektruose, suskaičiuotuose pritaikius *KKT* vaizdavimą (D, E).

sutampa su spektrinėmis juostomis eksperimentiniuose *FIR* sugerties spektruose (6 pav.). Kalcio oksalato monohidratui ir šlapimo rūgščiai charakteringos spektrinės juostos atitinkamai yra ties 274 cm^{-1} (deformacinis O=C-C=O virpesys [34]) ir 472 cm^{-1} (deformacinis N-H virpesys [35]).

Anksčiau aptarto inkstų akmenis, sudaryto iš šlapimo rūgšties ir kalcio oksalato monohidrata, cheminiai žemėlapiai, sudaryti skaičiuojant charakteringų spektrinių juostų integrinius intensyvumus *FIR* atspindžio spektruose bei *FIR* spektruose, suskaičiuotuose pritaikius *KKT* vaizdavimą, pavaizduoti 7 paveiksle. Matyti, kad pastarieji cheminiai žemėlapiai (7 pav. D, E) pasižymi dideliu kontrastu, komponentai inkstų akmenis skerspjūvyje gali būti gerai išskiriami, o jų pasiskirtymas atitinka koncentrinę žiedų struktūrą, matomą optiniame vaizde (7 pav. A). Be to, šie cheminiai žemėlapiai gerai sutampa su 5 paveiksle pavaizduotais cheminiais žemėlapiais, sudarytais skaičiuojant charakteringų spektrinių juostų integrinius intensyvumus *MIR* spektruose, suskaičiuotuose panaudojant *KKT*, prieš tai atėmus sklaidaus atspindžio



8 pav. Optinis inkstų akmens, sudaryto iš šlapimo rūgšties ir kalcio oksalato monohidrato, vaizdas (A) ir komponentų pasiskirstymo cheminiai žemėlapiai, sudaryti pritaikant *HCA* *MIR* atspindžio spektrų (B) ir *FIR* spektrų, suskaičiuotų pritaikius *KKT* vaizdavimą, grupavimui. Grupavimo rezultatus atitinkantys spektrai pateikiami (D) ir (E) grafikuose. Spektrai, priskiriami atskiroms grupėms ir atitinkantys triukšmus, nėra pavaizduoti.

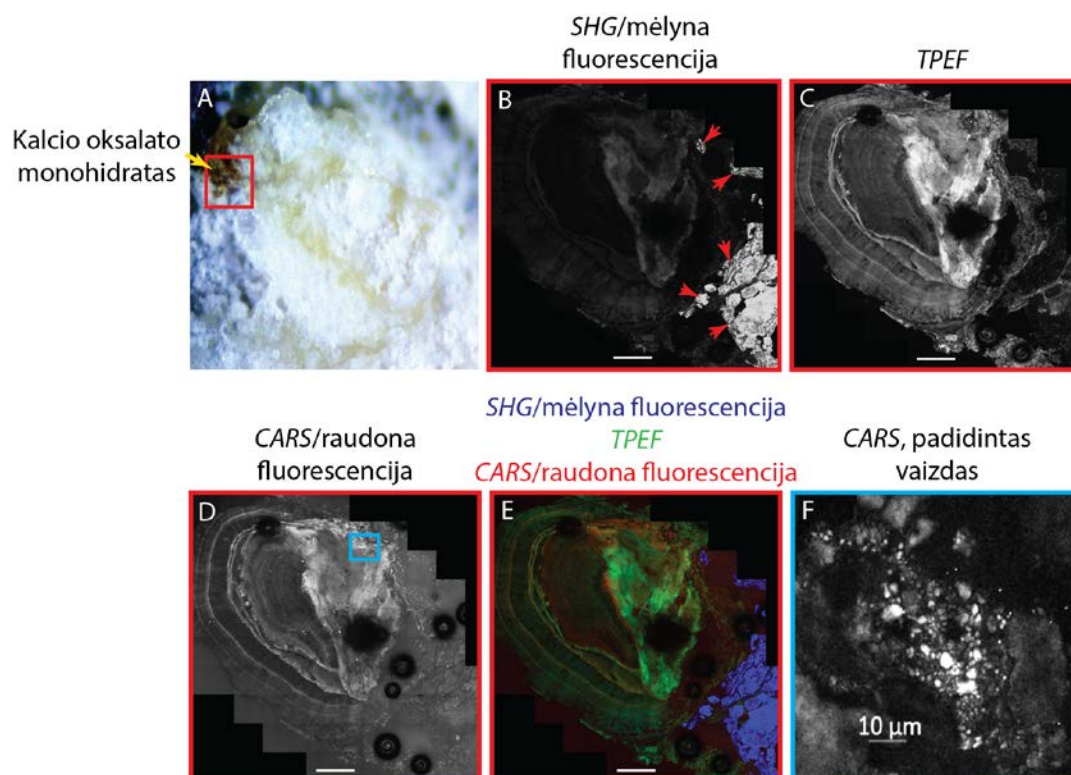
dedamąją. Panašūs rezultatai buvo gauti ir tiriant dar septynių skirtingų tipų inkstų akmenų cheminę sudėtį bei struktūrą. Tai leidžia daryti išvadą, kad veidrodinio atspindžio *FIR* mikrospektrometrija yra tinkamas metodas šiurkštiems, spinduliuotę *MIR* spektrinėje srityje sklaidantiems bandiniams, tokiems kaip inkstų akmenų skerspjuviai, tirti.

Galiausiai, to paties inkstų akmens, sudaryto iš šlapimo rūgšties ir kalcio oksalato monohidrato, cheminiai žemėlapiai buvo sudaryti eksperimentinius *MIR* atspindžio spektrus ir *FIR* spektrus, suskaičiuotus pritaikius *KKT* vaizdavimą, grupuojant panaudojant *HCA* analizę (8 pav.). Panaudojant *HCA* sudarytuose cheminiuose žemėlapuose matomas komponentų pasiskirstymas gerai sutampa su optiniame vaizde bei aukščiau pateiktuose cheminiuose žemėlapuose, sudarytuose skaičiuojant charakteringų juostų integrinius intensyvumus (5 ir 7 pav.), stebima struktūra. *MIR* atspindžio spektrai, dėl didesnio signalo-triukšmo santyko ir siauresnių spektrinių juostų, yra labiau tinkami cheminiams žemėlapiams panaudojant *HCA* sudaryti – toks

cheminis žemėlapis yra didesnio kontrasto ir komponentai gali būti gerai išskiriami. Nors sudarant cheminius žemėlapius panaudojant *HCA*, prarandama kiekybinė informacija, tačiau, vaizdinimo procedūra gerokai supaprastėja, kadangi metodas yra mažiau jautrus spektrinių juostų formai ir papildomas spektrų apdorojimas tampa nereikalingas. Tai ypač palanku, kai mikrospektrometrijos taikymas *FIR* srityje nėra prieinamas.

Inkstų akmenų vaizdinimo netiesinės optinės mikroskopijos metodu rezultatai

Inkstų akmenų mikrostruktūrai nustatyti, jie buvo vaizdinami netiesinės optinės mikroskopijos metodu, registruojant *CARS*, *TPEF* ir *SHG* signalus. Atitinkami inkstų akmens, sudaryto iš kalcio oksalato monohidrato ir struvito, vaizdai pateikti 9 paveiksle. Matyti, kad skirtingi komponentai akmenyje generuoja skirtingą optinį



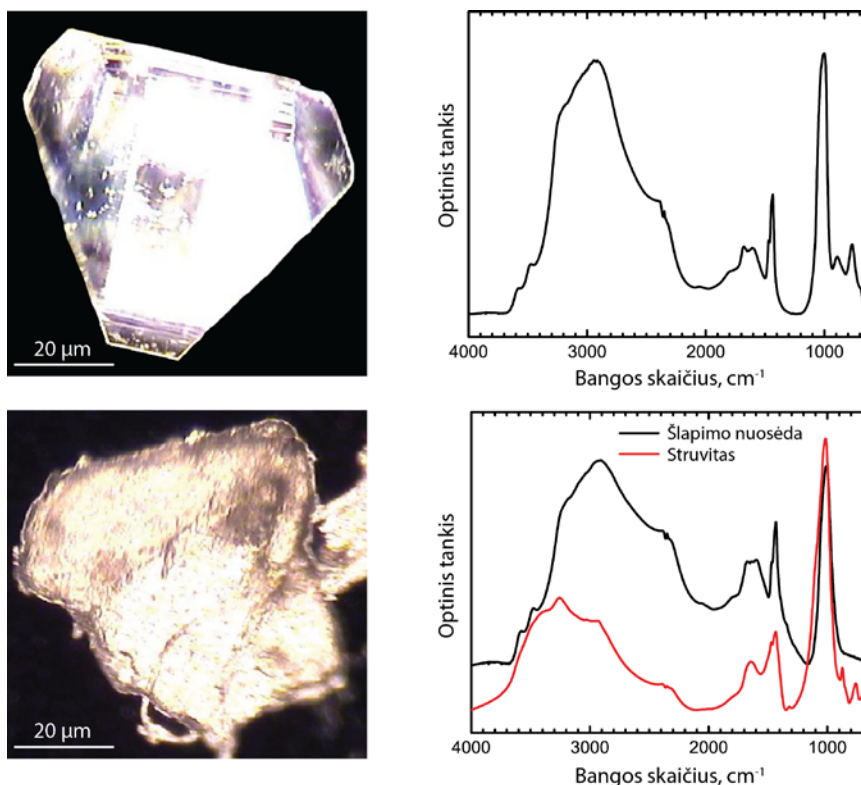
9 pav. Optinis inkstų akmens, sudaryto iš kalcio oksalato monohidrato ir struvito, vaizdas (A) ir spektriniai atvaizdai: (B) *SHG*/mėlynos fluorescencijos intensyvumo, (C) *TPEF* intensyvumo, (D) *CARS*/raudonos fluorescencijos intensyvumo, (D) sudėtinis (B-D) minėtų signalų intensyvumo. Raudonas stačiakampis (A) žymi akmens vietą, kuri buvo tiriama netiesinės optinės mikroskopijos metodu. Mėlynas stačiakampis (D) žymi *CARS* atvaizdo vietą, kurios padidintas vaizdas pateiktas (F). Žymuo (B-E) atvaizduose – 200 μm.

signalą. Struvitas, dėl savo necentrosimetrinės ortorombinės ($Pmn2_1 = C_{2v}^7$) kristalinės struktūros generuoja intensyvią *SHG* signalą (pažymėta raudonomis rodyklėmis 9 pav. B). Tuo tarpu kalcio oksalato monohidratas akmenyje generuoja *TPEF* (9 pav. C) ir fluorescencijos bangos ilgių srityje žemiau 399 nm (toliau – mėlyna fluorescencija) ir ties 633-647 nm (toliau – raudona fluorescencija) signalus. Kadangi sintetinis mineralas šių signalų negeneruoja, greičiausiai jie yra sąlygoti pigmentų bei kitų organinių medžiagų, įsiterpusių į kalcio oksalato monohidrato struktūrą akmeniui besiformuojant ir suteikiančių jam rudą spalvą (9 pav. A). Inkstų akmens skerspjuvyje taip pat buvo aptiktos mažos (1-5 μm dydžio) kristalinės struktūros, kurios generuoja *CARS* signalą (9 pav. D, F). Iki šiol panašūs dariniai nebuvo stebėti. Buvo nustatyta, kad tai šlapimo rūgšties kristalai, kurie įsiterpia į akmens struktūrą jam besiformuojant. Analizuojant sudėtinį, visų generuojamų signalų vaizdą (9 pav. E) matyti, kad netiesinė optinė mikroskopija leidžia atskirti skirtingus cheminius komponentus inkstų akmenyje bei stebėti jų mikrostruktūrą.

Iš viso netiesinės optinės mikroskopijos metodu buvo tiriami 10 įvairių tipų inkstų akmenų. Buvo nustatyta, kad optinius signalus, leidžiančius atskirti vieną cheminį komponentą nuo kito, generuoja dauguma dažnai inkstų akmenyse aptinkamų medžiagų – kalcio oksalato monohidratas, šlapimo rūgštis, struvitas, apatitas. Vis dėlto, metodas nėra tinkamas norint akmenyje atskirti du kalcio oksalato hidratų – mono- ir dihidratą. Amorfinis kalcio fosfatas, kurio akmenyse buvo identifikuotas IR spektrinės mikroskopijos metodu, taip pat nebuvo aptiktas netiesinės optinės mikroskopijos metodu.

Šlapimo nuosėdų analizė

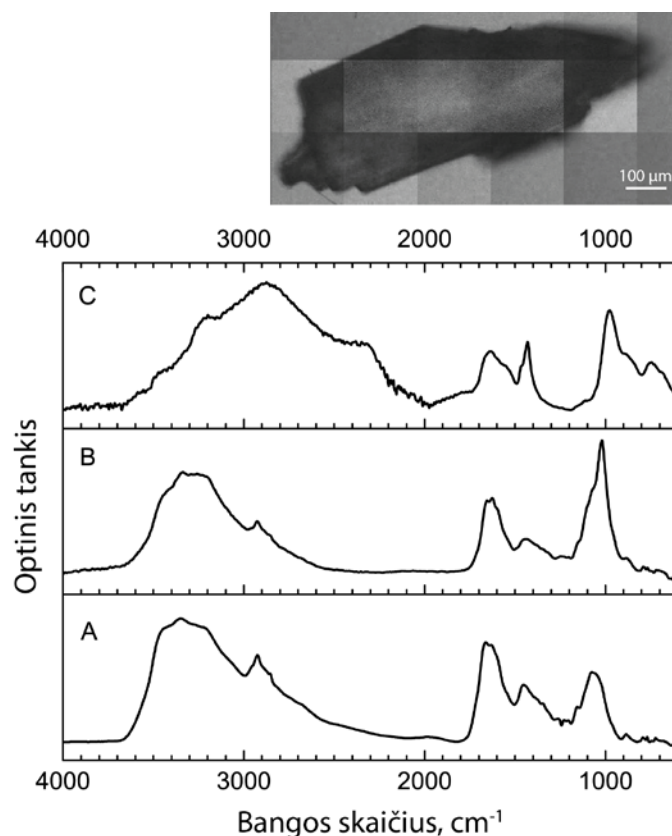
Inkstų akmenų cheminės sudėties ir struktūros tyrimai yra svarbūs siekiant išsiaiškinti akmenligės priežastis, inkstų akmenų augimo veiksnius bei norint pacientui paskirti atitinkamą gydymą. Ankstyvai akmenligės diagnozei ir prevencijai yra tiriamos rizikos grupėje esančių pacientų šlapimo nuosėdos. Dabar naudojamas optinės mikroskopijos metodas nėra patikimas, ypač kai tiriamos netipinio kristališkumo, polikristaliniai ar amorfiniai dariniai. Šiame darbe šlapimo nuosėdos buvo tiriamos IR



10 pav. Optiniai skirtingos morfologijos šlapimo nuosėdų vaizdai (kairėje) ir atitinkami IR sugerties spektrai, užregistruoti IR pralaidumo mikroskopijos metodu (dešinėje); spektrinė analizė rodo, kad abi nuosėdos sudarytos iš struvito.

spektroskopijos ir spektrinės mikroskopijos metodais. Dviejų skirtingos morfologijos nuosėdų kristalų optiniai vaizdai bei atitinkami IR sugerties spektrai, užregistruoti IR pralaidumo mikroskopijos metodu, pavaizduoti 10 paveiksle. Pastaryjų analizė leido nustatyti, kad abi nuosėdos sudarytos iš tos pačios medžiagos - struvito. Tai parodo, kad optinė mikroskopija nėra patikimas metodas cheminei šlapimo nuosėdų sudėčiai nustatyti.

Šlapimo nuosėdų tyrimui jų cheminei sudėčiai nustatyti, buvo palyginti trys skirtingi IR spektrometrijos metodai: IR pralaidumo spektrinė mikroskopija, mikro-ATR ir makro-ATR. Šlapimo nuosėdos, sudarytos iš struvito ir organinių medžiagų matricos (baltymų ir lipidų), optinis vaizdas ir IR, mikro-ATR ir makro-ATR spektrai pavaizduoti 11 paveiksle. Nors spektrų signalo-triukšmo santykis skiriasi, nuosėdos cheminė sudėtis galėjo būti nustatyta bet kuriuo iš trijų būdų. Kitavertus, juos lyginant matyti, kad visi jie skiriasi: IR sugerties spektruose, užregistruotuose IR pralaidumo spektrinės mikroskopijos ir mikro-ATR metodais, stebimos spektrinės juostos, būdingos tiek



11 pav. Optinis šlapimo nuosėdos, sudarytos iš struvito ir organinės matricos, vaizdas ir jos IR sugerties spektrai, užregistruoti IR pralaidumo mikroskopijos (A), mikro-ATR (B) ir makro-ATR (C) metodais.

struvitui, tiek organinei matricai; tuo tarpu makro-ATR metodu užregistruotame spektre dominuoja tik struvitui būdingos spektrinės juostos. Kadangi prieš kiekvieną matavimą ta pati nuosėda buvo perkeliama nuo vieno prietaiso prie kito, buvo registruojama ne ta pati jos dalis. Be to, perkėlimas neišvengiamai sąlygoja dalies bandinio praradimą.

Norint taikyti pralaidumo metodą, tam, kad nebūtų stebimas sugerties įsisotinimas, bandinio storis neturi viršyti 10 μm storio. Tai reiškia, kad šlapimo nuosėdos turi būti suspaudžiamos ir sutraiškamos tarp dviejų stiklo plokštelių ar optinių langelių. Pirmuoju atveju, bandinį perkeliant nuo plokštelės ant spektrų registravimui tinkamo optinio langelio, dalis bandinio bus neišvengiamai prarasta. Kitavertus, nuosėdą iškart spaudžiant tarp optinių langelių, jie pažeidžiami ir jų naudojimo laikas tampa ribotas. Taikant ATR metodus, specialus bandinio paruošimas nėra reikalingas, todėl jų taikymas yra patogesnis. Kaip matyti 11 paveiksle, makro-ATR spektras yra triukšmingesnis nei mikro-ATR spektras. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad nuosėda nepadengia viso makro-ATR elemento ploto (2×2 mm), todėl į jutiklį patenka

spinduliuotė, kuri nesąveikavo su bandiniu. Šiame darbe buvo nustatyta, kad, nepaisant mažesnio signalo-triukšmo santykio, makro-ATR metodu galima tirti nuosėdas, kurių dydis yra ne mažesnis nei $100 \times 100 \mu\text{m}$. Mikro-ATR metodu buvo užregistruoti $15 \times 10 \mu\text{m}$ dydžio šlapimo nuosėdų IR sugerties spektrai. Tačiau, yra parodyta, kad inkstų akmenlige sergančių žmonių organizme formuojasi didesnio dydžio ir labiau linkusios agreguotis nuosėdos nei sveikų žmonių organizme [36,37]. Kadangi makro-ATR metodo, priešingai nei mikro-ATR, taikymas nereikalauja sudėtingos ir brangios aparatūros, jis yra tinkamiausias pasirinkimas šlapimo nuosėdų cheminei sudėčiai tirti klinikinėse laboratorijose.

Šiame darbe buvo ištirti 68 sveikų, 151 rizikos grupės ir 76 inkstų akmenlige sergančių žmonių šlapimo nuosėdų bandiniai. Pirmuoju atveju, tik 23 tirtuose bandiniuose buvo rasta nuosėdų, kurių dydis neviršijo $270 \mu\text{m}$. Didžioji dalis šių nuosėdų buvo sudarytos iš šlapimo rūgšties dihidrato ir organinių medžiagų (baltymų, lipidų). Rizikos grupėje esančių žmonių šlapimo nuosėdos, kurių buvo rasta 127 bandiniuose, buvo pastebimai didesnės (iki $800 \mu\text{m}$ dydžio). Nors didžioji dalis jų taip pat buvo sudarytos iš šlapimo rūgšties dihidrato ir organinių medžiagų, taip pat buvo aptiktos ir kalcio oksalato monohidrato bei įvairių forfatų (struvito, brušito) nuosėdos. Visuose tirtuose sergančių inkstų akmenlige žmonių šlapimo bandiniuose buvo rasta nuosėdų ir 73 % atvejų bent vienas jose aptiktas komponentas sutapo su to paties paciento inkstų akmens sudėtimi. Šie rezultatai parodo, kad IR spektrometrija yra tinkamas metodas šlapimo nuosėdų cheminei sudėčiai tirti siekiant anksti diagnozuoti inkstų akmenligę.

Inkstų akmenų ir šlapimo nuosėdų analizės išvados

1. Inkstų akmenų morfologinė analizė suteikia informacijos apie jų formavimosi procesus, o detalesnė informacija gaunama nustatčius specifinių morfologinių struktūrų, tokių kaip kalcio oksalato dihidratas, cukrozė ar kraujas, esančių ant akmenų paviršiaus, cheminę sudėtį Ramano sklaidos spektrometrijos metodu.

2. Išsami inkstų akmenų cheminės sudėties analizė IR spektrometrijos metodu gali būti atliekama tik panaudojant spinduliuotę *MIR* ir *FIR* spektrinėse srityse. Ištyrus 403 inkstų akmenų cheminę sudėtį, buvo nustatytas jų pasiskirstymas pagal tipus: kalcio oksalato inkstų akmenys - 61 %, , šlapimo rūgštis - 26 %, struvito - 10 %, brušito - 2 %, apatito – 1 %.
3. *MIR* veidrodinio atspindžio spektrinė mikroskopija inkstų akmenų vaizdinimui gali būti efektyviai taikoma tik tuomet, (I) kai, prieš atliekant spektrų korekciją *KKT* metodu, atsižvelgiama į sklaidaus atspindžio įtaką ir jo dedamoji atimama iš užregistruotų spektrų; (II) kai cheminių žemėlapių sudarymui panaudojama *HCA* analizė.
4. *FIR* veidrodinio atspindžio spektrinė mikroskopija inkstų akmenų vaizdinimui gali būti efektyviai taikoma tik atlikus spektrų korekciją *KKT* metodu, kadangi sklaidaus atspindžio įtaka šioje spektrinėje srityje yra maža ir papildomas spektrų apdorojimas nėra reikalingas.
5. Netiesinė optinė mikroskopija, kuomet registruojami *CARS*, *TPEF* ir *SHG* signalai, gali būti taikoma inkstų akmenų cheminei sudėčiai ir mikrostruktūrai nustatyti. Skirtingi komponentai akmenyse generuoja skirtingus optinius signalus, todėl gali būti identifikuojami.
6. Visi trys IR spektrometrijos metodai – pralaidumo, makro-*ATR* ir mikro-*ATR* – yra tinkami kristalinių, netipinio kristališkumo, polikristalinių bei amorfinių šlapimo nuosėdų cheminei sudėčiai nustatyti; be to, yra pranašesni nei dabar šiam tikslui naudojama optinė mikroskopija. Makro-*ATR* metodas, kuriuo gali būti registruojami didesnių nei 100 μm dydžio nuosėdų spektrai ir kuriam nereikalinga sudėtinga aparatūra, yra tinkamas metodas taikymams klinikinėje praktikoje.

7. Ištyrus 76 akmenlige sergančių žmonių inkstų akmenų ir šlapimo nuosėdų cheminę sudėtį, nustatyta, kad 73 % atvejų bent vieno komponento juose cheminė sudėtis sutampa. Visiškas sutapimas buvo stebėtas 41 % šių atvejų.

Virpesinės spektrometrijos taikymai biologinių skysčių tyrimams

Trečiajame disertacijos skyriuje aptariami virpesinės spektrometrijos taikymai biologinių skysčių tyrimams: mažos koncentracijos medžiagų aptikimui ir identifikavimui kūno skysčiuose (šlapime, kraujyje, ašarose ir pan.) *SERS* spektrometrijos metodu bei vėžinių inkstų audinių diagnostikai atliekant tarpląstelinio skysčio IR spektrometrinę analizę. Pirmuoju atveju, skyriuje aprašoma bandinių paruošimo *SERS* eksperimentui problematika bei galimi sprendimo būdai, pateikiama detali metabolito, aptinkamo kūno skysčiuose ir svarbaus ligų diagnostikai – šlapimo rūgšties – *SERS* spektrų analizė, taip pat atliekant teorinius molekulių struktūros bei virpesinių spektrų skaičiavimus tankio funkcionalo teorijos artinyje. Antruoju atveju, aptariami kompleksinės cheminės sudėties tarpląstelinio skysčio bandinių spektrinės analizės vėžio diagnostikai ypatumai. Skyriuje pateikiami rezultatai buvo paskelbti trijose disertantės ir bendraautorių publikacijose.

Šlapimo rūgšties aptikimas vandeniniuose tirpaluose: eksperimentinė dalis

SERS substratams ruošti buvo pagaminti trys skirtingų formų sidabro nanodalelių koloidiniai tirpalai: (I) redukuojant AgNO_3 natrio citratu, kuomet tirpale gaunamos įvairių formų nanodalelės [38], (II) redukuojant AgNO_3 hidroksilamino hidrochloridu, kuomet tirpale gaunamos sferinės nanodalelės [39] ir (III) askorbo rūgštimi paveikiant tirpalą, su sidabro agregacijos centrais (angl. *seed*), kuomet tirpale gaunamos prizmės formos dalelės [40]. Siekiant padidinti nanodalelių koncentraciją, pagaminti koloidai buvo centrifuguojami 30 min. ($\text{RCF}=10400\times g$). Iš 100 ml pradinio tirpalo buvo gaunama apie 20 ml koncentrato.

Šlapimo rūgšties vandeniniai tirpalai buvo gaminami tirpinant šlapimo rūgšties miltelius distiliuotame vandenyje ir, siekiant padidinti tirpumą, įlašinant 2 % NaOH tirpalo. Mažų koncentracijų tirpalai buvo ruošiami distiliuotu vandeniui skiedžiant 1 mM koncentracijos šlapimo rūgšties tirpalą.

Substratai *SERS* matavimams buvo ruošiami lašinat 23 μl koncentruoto koloidinio tirpalo ant stiklinės plokštelės, padengtos aliuminio oksido sluoksniu, ir

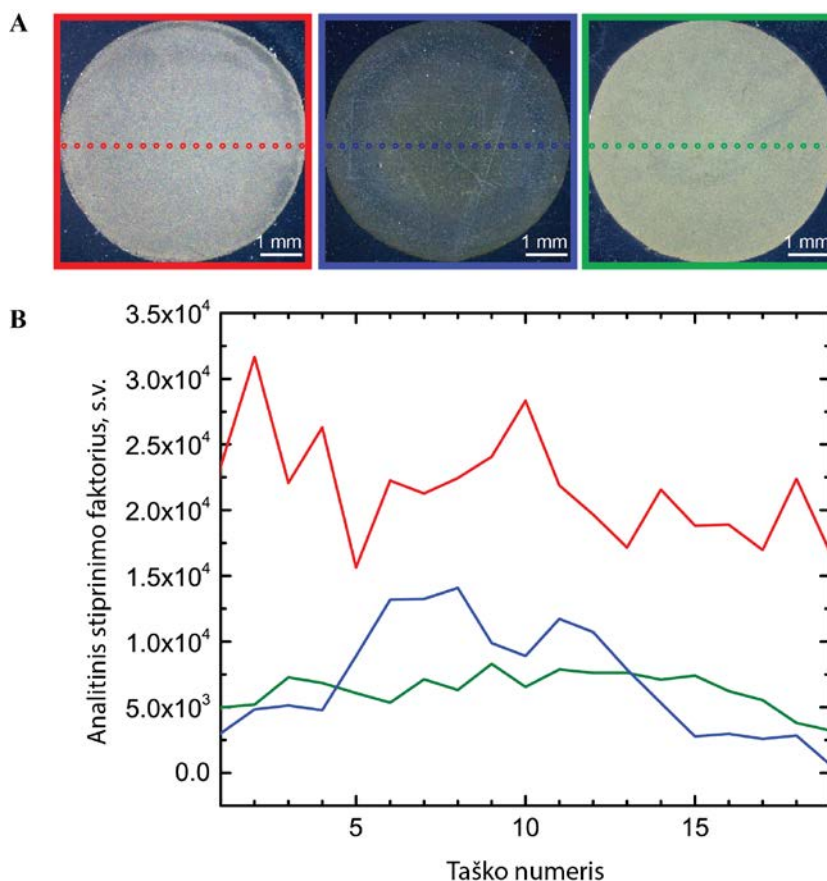
leidžiant 9 lašams išdžiūti kambario temperatūroje (23°C), uždaroje $23\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 9\text{ cm}$ dydžio dėžėje. Ant taip paruoštų substratų, buvo lašinami šlapimo rūgšties tirpalai ir taip pat išdžiovinami, o prieš atliekant matavimą, papildomai nuplaunami distiliuoto vandens srove. Tokių bandinių *SERS* spektrai buvo registruojami FT-Ramano sklaidos spektrometru (MultiRAM, Bruker Optik GmbH), žadinant Nd:YAG lazerio 1064 nm spinduliuote.

Teoriniai šlapimo rūgšties molekūlės, jos tautomerų bei anijonų ir penkių Ag atomų rinkinio geometrijos ir virpesinių spektrų skaičiavimai buvo atlikti Gaussian programiniu paketu, naudojant B3LYP tankio funkcionalą bei 6-311++G(d,p) ir LANL2DZ bazines funkcijas. Nustačius stabiliausias (mažiausios energijos) šlapimo rūgšties molekūlės struktūras vakuume ir vandenyje (homogeniškoje dielektrinėje terpėje), iš jų ir Ag atomų rinkinio buvo sudaryti kompleksai. Optimizavus jų geometriją bei radus mažiausios energijos kompleksus, buvo skaičiuojami jų virpesiniai spektrai, kurie buvo lyginami su eksperimentiniais *SERS* spektrais.

Šlapimo rūgšties aptikimas vandeniniuose tirpaluose: SERS substratų paruošimo metodikos įvertinimas

Šiame darbe, mažos koncentracijos šlapimo rūgšties aptikimui vandeniniuose tirpaluose *SERS* metodu, bandinio žadinimui buvo naudojama 1064 nm bangos ilgio spinduliuotė. Kadangi šioje spektrinėje srityje stebima vandens OH valentinių virpesių trečiojo virštonio sugertis, dėl kurios Ramano sklaidos intensyvumas mažėja, bandiniai buvo džiovinami. Siekiant išvengti koloidinius tirpalus džiovinant dažniausiai susidrančio nanodalelių žiedo (angl. *coffee-ring*), substratams ruošti buvo parinktas mažiau nei įprastai naudojamas stiklas drėkinantis aliuminio oksido pagrindas ir uždara dėžė, kurioje stebimas drėgmės lygis. Didesnis paviršiaus drėkinimo kampas laše sąlygoja silpnesnes vidines sroves, dėl kurių nanodalelės migruoja link kraštų [41]. Be to, džiovinimas uždaroje dėžėje leidžia sudaryti drėgmės gradientą lašų džiūvimo aplinkoje. Dėl santykinai mažos 29 % pradinės drėgmės, vyksta greitas vandens garavimas, o tai sąlygoja pradinės lašų kraštų padėties fiksavimąsi [42] – džiūstant nesikeičia lašų diametras, bet keičiasi aukštis. Vėliau, drėgmei padidėjus iki 58 – 60 %, garavimas

sulėtėja, todėl nesusidaro stiprios vidinės srovės, nešančios nanodaleles į lašų kraštus [42]. Išdžiovintų bandinių optiniai vaizdai bei lašų skerspjuvyje užregistruotų devyniolikos 1 mM koncentracijos šlapimo rūgšties vandeninio tirpalo *SERS* spektrų analitinio stiprinimo faktoriaus [43] vertės, suskaičiuotos deformacinių C-N ir plokštuminių žiedo



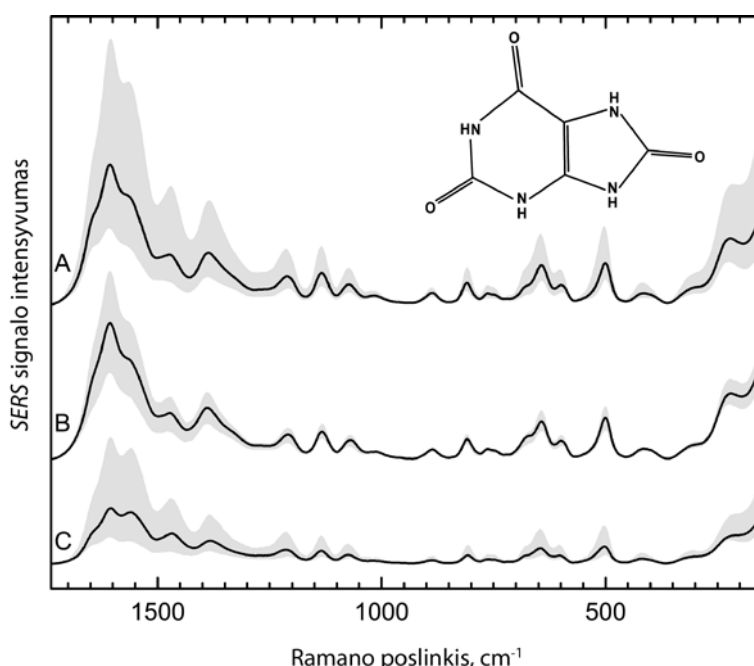
12 pav. (A) Optiniai substratų, pagamintų iš skirtingų formų nanodalelių koloidų, vaizdai: kairėje – įvairių formų, vidurje – nanoprizmių, dešinėje – sferinių. Taškai ties substratų skerspjuviu nurodo šlapimo rūgšties *SERS* spektrų registravimo pozicijas. (B) Analitinio stiprinimo faktoriaus vertės kiekviename iš matuotų taškų, suskaičiuotos šlapimo rūgšties deformacinių C-N ir plokštuminių žiedo virpesių juostai ties 500 cm⁻¹.

virpesių juostai ties 500 cm⁻¹, pavaizduoti 12 paveiksle. Skaičiavimuose buvo naudojamas 65 mM koncentracijos šlapimo rūgšties vandeninio tirpalo Ramano sklaidos spektras. Matyti, kad, naudojant iš įvairių formų ir sferinių Ag nanodalelių koloidų pagamintus substratus, visame bandinio skerspjuvyje gaunamos panašios analitinio stiprinimo faktoriaus vertės, jų standartinis nuokrypis nuo vidurkio yra ne daugiau nei 30 %. Iš Ag nanoprizmių koloido pagamintuose substratuose, nanodalelės nėra pasiskirsčiusios tolygiai, todėl ir stiprinimo faktoriaus vertės yra didesnės bandinio

centre nei kraštuose. Šie substratai taip pat nepasižymėjo rezultatų atsikartojamumu. Tolesnei šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų analizei buvo pasirinkti iš įvairių formų Ag nanodalelių koloidų pagaminti substratai.

Šlapimo rūgšties aptikimas vandeniniuose tirpaluose: SERS spektrų analizė

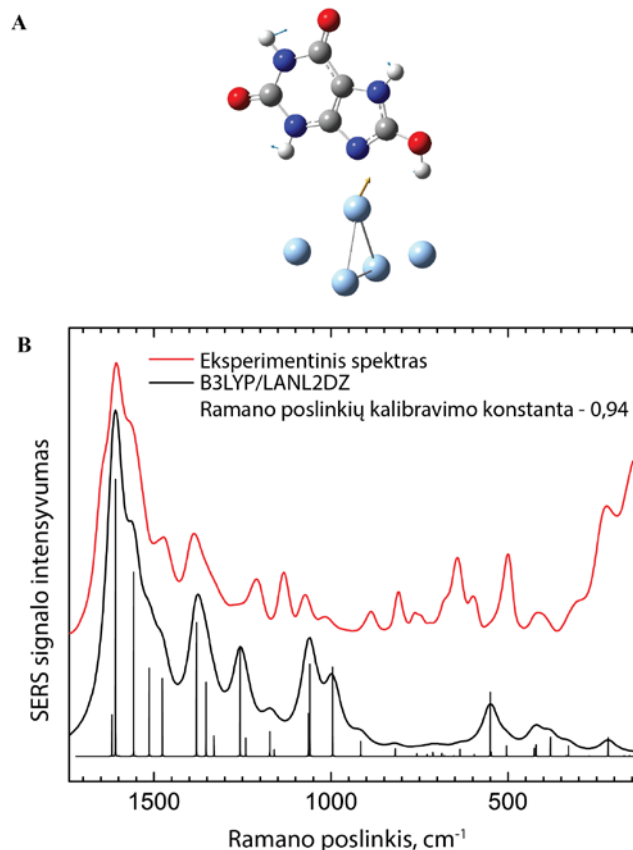
Įvairių koncentracijų šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų SERS spektrai, užregistruoti naudojant iš įvairių formų Ag nanodalelių koloidų pagamintus substratus, pavaizduoti 13 paveiksle. Kaip matyti, intensyvus sklaidos signalas gali būti



13 pav. Šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų SERS spektrai užregistruoti naudojant substratus, pagamintus iš įvairių formų Ag nanodalelių koloido: (A) 10⁻³ M, (B) 10⁻⁵ M, (C) 10⁻⁶ M.

registruojamas net tuomet, kai šlapimo rūgšties koncentracija vandeniniame tirpale siekia 10⁻⁶ M. Kadangi realiuose biologiniuose skysčiuose šlapimo rūgšties koncentracija yra apie 10⁻³ – 10⁻⁴ M, toks signalo stiprinimas ir metodo jautrumas yra pakankamas, kad galėtų būti taikomas šio metabolito aptikimui.

Kiekybinei analizei atlikti svarbu užtikrinti pagamintų substratų stiprinimo faktoriaus atsikartojamumą. Nors šiame darbe džiovinant koloidinių tirpalų lašus specifinėmis, aukščiau aptartomis sąlygomis buvo įmanoma pasiekti dalinai tolygų sidabro nanodalelių pasiskirstymą substrate, tačiau nepavyko užtikrinti gero skirtingų substratų atsikartojamumo. Tai matyti 13 paveiksle, kur pilkai nuspalvintos sritys žymi



14 pav. (A) Stabiliausio šlapimo rūgšties tautomero ir penkių Ag atomų komplekso struktūra; tamsiai mėlyna – azotas, tamsiai pilka – anglis, raudona – deguonis, šviesiai pilka – vandenilis, šviesiai mėlyna – sidabras; mėlynos rodyklės nurodo deformacinio N-H virpesio atomų poslinkio vektorius, geltona rodyklė – dipolinio momento vektorių. (B) Eksperimentinis 1mM koncentracijos šlapimo rūgšties vandeniniame tirpale *SERS* spektras (viršuje) ir suskaičiuotas komplekso Ramano sklaidos spektras (apačioje).

SERS spektrų intensyvumo variacijas. Vis dėlto, griežtas koloidų lašų džiovavimo aplinkos sąlygų kontroliavimas galėtų būti naudojamas substratams, kurių stiprinimo faktorius atsikartoja, ruošti.

Kadangi šlapimo rūgšties Ramano sklaidos ir *SERS* spektrai skiriasi, norint identifikuoti *SERS* spektrines juostas, svarbu suprasti, kokios sąveikos vyksta tarp molekulės ir sidabro nanodalelių. Didelę įtaką spektriniam pokyčiams daro tai, kad šlapimo rūgšties molekulė tautomerizuojasi vandiniuose tirpaluose ir arti metalų paviršiaus [44]. Todėl, buvo atlikti stabiliausio molekulės tautomero, prisijungusio prie sidabro atomų klasterio, teoriniai struktūros ir virpesinių spektrų skaičiavimai (14 pav.). Nors atliekant tokius skaičiavimus nėra įskaitomas elektromagnetinis Ramano sklaidos stiprinimo mechanizmas, spektrinėje srityje nuo 1740 cm^{-1} iki 900 cm^{-1} buvo stebėtas

geras sutapimas tarp eksperimentinių ir teorinių spektrų, atlikta spektrinių juostų interpretacija (14 pav. B). Mažesnių bangos skaičių srityje stebimi skirtumai tarp spektrinių juostų intensyvumų gali būti paaiškinti paviršiaus atrankos taisyklėmis, galiojančiomis *SERS* spektrams: (I) labiausiai stiprinami tie virpesiai, kurie vyksta statmenai sidabro paviršiui (14 pav. A), (II) nestiprinami tie virpesiai, kurie vyksta lygiagrečiai sidabro paviršiui. Gauti rezultatai leidžia teigti, jog skirtumai tarp šlapimo rūgšties Ramano sklaidos ir *SERS* spektrų yra stebimi tiek dėl molekulės struktūros pokyčių tirpale bei arti metalo paviršiaus, tiek dėl adsorbcijos, tiek dėl skirtingo stiprinimo faktoriaus skirtingoms spektrinėms juostoms.

Tarpląstelinio skysčio tyrimai: eksperimentinė dalis

Pritarus Vilniaus regioninei etikos komisijai (leidimo nr.: 158200-15-803-312), inkstų audinių bandiniai buvo gauti iš Vilniaus universitetinių klinikų Santariškių ligoninės Urologijos skyriaus po dalinės, paprastos ar radiklios nefraktomijos operacijų. Tarpląstelinio skysčio bandiniai buvo ruošiami prispaudžiant sveiko ar vėžinio audinio dalį prie spektrometro „Alpha“ (*Bruker Optik GmbH*) ATR elemento ir, ją atitraukus, leidžiant skysčiui išdžiūti kambario temperatūroje. Buvo registruojami taip paruoštų bandinių IR sugerties spektrai. Atlikus jų bazinės linijos tiesinimą, vektorinį normavimą ir suskaičiavus pirmąją išvestinę, spektrai buvo analizuojami panaudojant *HCA* ir principinių komponentų analizę (angl. *principal component analysis – PCA*). *HCA* rezultatai pateikiami dendrogramose, kur artimiausios grupės yra suskirstytos taip, kad jų kraštiniai elementai būtų panašiausi [45]. *PCA* analizės rezultatai pateikiami pirmų dviejų principinių komponentų projekcijų grafike.

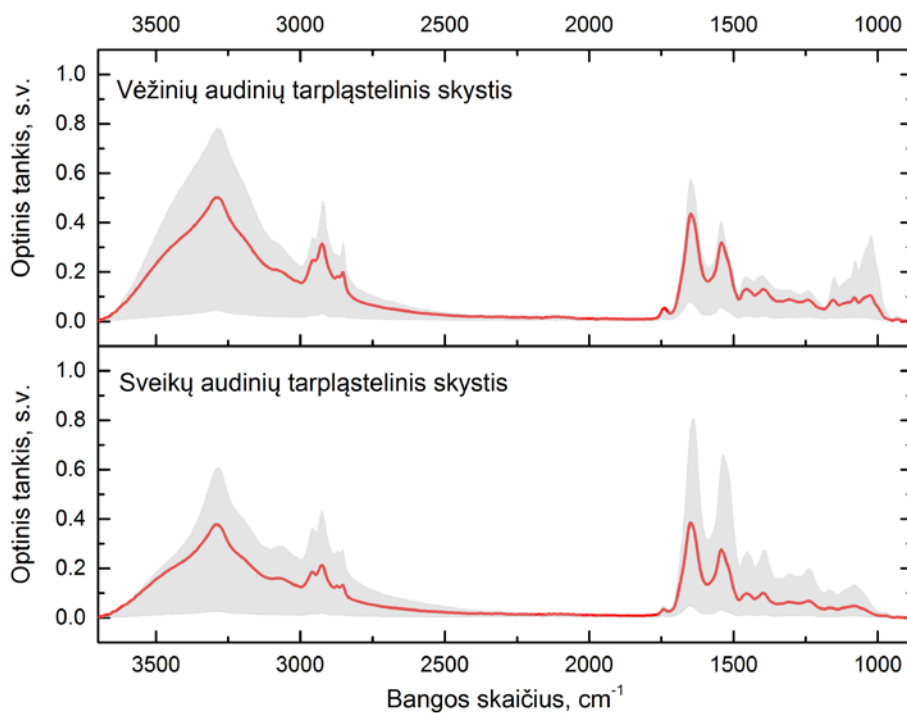
Tarpląstelinio skysčio tyrimai: spektrinės analizės rezultatai

Šiame darbe buvo analizuoti 84 pacientų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio bandinių IR sugerties spektrai. Analizės rezultatai buvo lyginami su histopatologų išvadamis apie vėžinio audinio piktybiškumą (G indeksą) (1 lentelė).

1 lentelė. Inkstų audinių tarpląstelinio skysčio bandinių skirstymas pagal vėžio piktybiškumą (G indeksą), atsižvelgiant į histopatologų išvadas.

Audinio tipas	Bandinių skaičius	Pastabos
Sveikas audinys	84	
G1*	11	1 bandinys – chromofobinė inksto ląstelių karcinoma
G2*	44	2 bandiniai – papilinė, 2 bandiniai – multilokalinė cistinė, 1 bandinys - chromofobinė inksto ląstelių karcinoma
G3*	23	1 bandinys – epitelio ir strumos auglys, 1 bandinys – papilinė inksto ląstelių karcinoma
Inkstų angiomiolipoma	1	
Inkstų onkocitoma	4	
Pielonefritas	1	

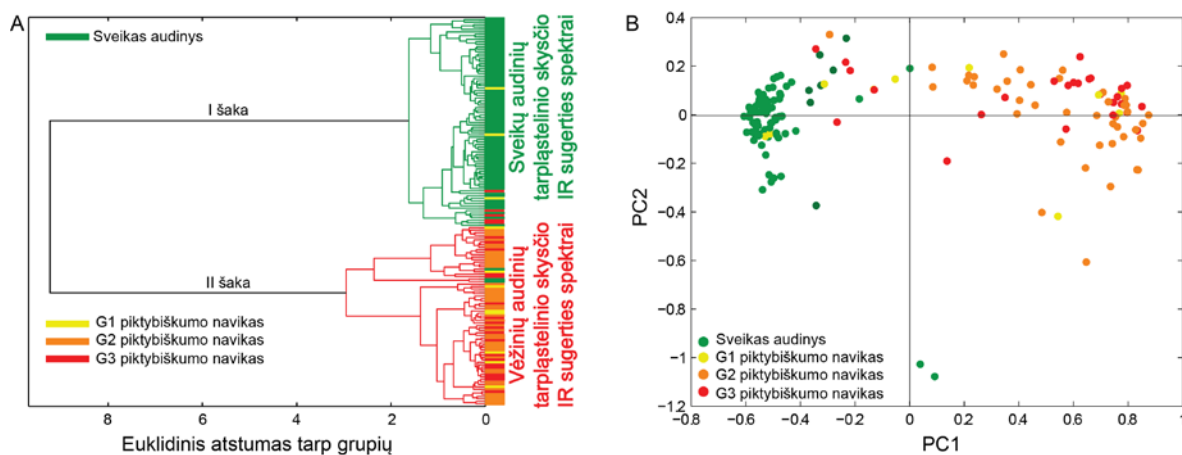
*Visi augliai buvo diagnozuoti kaip šviesių ląstelių karcinoma; išskirtiniai atvejai paminėti Pastabose.



15 pav. Sveikų (apačioje) ir vėžinių (viršuje) inkstų audinių tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektrai. Raudona linija žymi visų spektrų vidurkį, o pilka sritis – spektrų intensyvumo pokyčius tarp bandinių.

Visi sveikų ir vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektrai pateikiami 15 paveiksle. Raudona linija žymi visų spektrų vidurkj, o pilka dalis – spektrų intensyvumo pokyčius tarp bandinių. Matyti, kad didžiausi skirtumai tarp sveikų ir vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektrų yra 1200-890 cm^{-1} spektrinėje srityje, kurioje stebimi angliavandenių valentiniai C-O ir deformaciniai CHO grupių virpesiai. Trys spektrinės juostos ties 1152, 1080 ir 1022 cm^{-1} vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektruose yra priskiriamos glikogenui ir gali būti laikomos patikimu inkstų vėžio spektriniu žymeniu. Yra parodyta, kad vėžinių audinių (ir ypač, šviesių ląstelių karcinomos) ląstelės yra linkusios savo citoplazmoje intensyviai kaupti glikogeną kaip gliukozės atsargas tam, kad galėtų išgyventi esant maisto medžiagų trūkumui ar anaerobinėmis sąlygomis [46]. Tai, jog glikogenas stebimas tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektruose parodo, kad bandinyje taip pat yra ir pačių ląstelių bei viduląstelinio skysčio, ištekėjusio iš pjūvio metu pažeistų ląstelių.

Statistinė spektrų analizė leidžia geriau suprasti ryšius tarp skirtingų bandinių grupių. Dendrograma, sudaryta pagal sveikų ir vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektrų *HCA* analizės rezultatus, pavaizduota 16 paveiksle A. Joje gerai išskiriamos dvi pagrindinės šakos, (I) sudarytos iš sveikų (pažymėta žalia spalva) ir (II) vėžinių (pažymėta geltona, oranžine arba raudona spalva, priklausomai nuo piktybiškumo) audinių tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektrų. Tai, kad šias dvi grupes



16 pav. Dendrograma (A) ir pirmų dviejų principinių komponentų projekcijų grafikas (B), sudaryti atitinkamai pagal sveikų ir vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektrų *HCA* ir *PCA* analizės rezultatus.

sudarantys spektrai sudaro mažesnes subgrupes parodo, kad skirtingų pacientų audiniai ir jų spektrai skiriasi. Šie skirtumai sąlygoja ir tai, kad II šakoje nestebimas grupavimasis pagal naviko piktybiškumą, nors G1, G2 ir G3 grupėms priskiriamų vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio spektrų vidurkių analizė parodė, kad charakteringų glikogeno spektrinių juostų intensyvumas didėja, didėjant G indeksui. Dendrogramoje matyti, kad trys sveiko audinio spektrai yra priskiriami vėžinių audinių grupei. Tai gali būti paaiškinama tuo, jog šiuose spektruose, kaip paaiškėjo po detalesnės jų analizės, dominuoja lipidų spektrinės juostos. PCA analizė taip pat leido gerai atskirti sveikų ir vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektrus. Tai matyti pirmų dviejų principinių komponentų projekcijų grafike (16 pav. B).

Biologinių skysčių analizės išvados

1. Ruošiant substratus mažos koncentracijos šlapimo rūgšties aptikimui vandeniniuose tirpaluose SERS spektrometrijos metodu, džiovinant koloidų lašus buvo gautas dalinai tolygus sidabro nanodalelių pasiskirstymas. Substratų skerspjuviuose registruotų SERS spektrų analitinio stiprinimo faktoriaus verčių vidutinis nuokrypis nuo vidurkio - apie 30 %.
2. Panaudojant džiovintus įvairių nanodalelių koloidų substratus, pavyko užregistruoti SERS spektrus bandinių, kuriuose šlapimo rūgšties koncentracija buvo 10^{-6} M. Atlikus šlapimo rūgšties molekulės ir jos tautomerų, prisijungusių prie sidabro atomų, struktūros ir virpesinių spektrų skaičiavimus, nustatyta, kad skirtumai tarp šlapimo rūgšties SERS ir Ramano sklaidos spektrų gali būti paaiškinami molekulės tautomerų susidarymu bei jų adsorbcija ant sidabro.
3. Analizuojant inkstų audinio tarpląstelinio skysčio IR sugerties spektrus nustatyta, kad vėžio aptikimui tinkami spektriniai žymenys yra $1200-890\text{ cm}^{-1}$ srityje ir yra priskiriami glikogeno valentiniams C-O ir deformaciniams CHO grupių virpesiams. Atlikus šios spektrinės srities HCA analizę, metodo jautrumo ir specifiškumo vertės yra atitinkamai 91 % ir 96 %.

Bibliografija

- [1] F. Siebert and P. Hildebrandt, *Vibrational spectroscopy in life science* (Wiley-VCH, Weinheim, 2008).
- [2] P. Lasch and J. Kneipp, Eds., *Biomedical vibrational spectroscopy* (Wiley-Interscience, Hoboken, N.J, 2008).
- [3] C. Krafft and J. Popp, The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 699–717 (2014).
- [4] C. Krafft, I. W. Schie, T. Meyer, M. Schmitt, and J. Popp, Developments in spontaneous and coherent Raman scattering microscopic imaging for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1819–1849 (2016).
- [5] C. Hughes and M. J. Baker, Can mid-infrared biomedical spectroscopy of cells, fluids and tissue aid improvements in cancer survival? A patient paradigm, *Analyst* **141**, 467–475 (2016).
- [6] L. Opilik, T. Schmid, and R. Zenobi, Modern Raman Imaging: Vibrational Spectroscopy on the Micrometer and Nanometer Scales, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **6**, 379-398 (2013).
- [7] A. A. Bunaciu, S. Fleschin, and H. Y. Aboul-Enein, Biomedical Investigations Using Fourier Transform-Infrared Microspectroscopy, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **44**, 270–276 (2014).
- [8] H. Kim and M. Cho, Infrared Probes for Studying the Structure and Dynamics of Biomolecules, *Chem. Rev.* **113**, 5817–5847 (2013).
- [9] R. Adato and H. Altug, In-situ ultra-sensitive infrared absorption spectroscopy of biomolecule interactions in real time with plasmonic nanoantennas, *Nat. Commun.* **4**, 2154 (2013).
- [10] A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, and M. Baranska, Raman spectroscopy of proteins: a review, *J. Raman Spectrosc.* **44**, 1061–1076 (2013).

- [11] M. J. Baker, S. R. Hussain, L. Lovergne, V. Untereiner, C. Hughes, R. A. Lukaszewski, G. Thiéfin, and G. D. Sockalingum, Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review, *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1803–1818 (2016).
- [12] J.-X. Cheng and X. S. Xie, Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine, *Science* **350**, aaa8870 (2015).
- [13] M. Diem, A. Ergin, S. Remiszewski, X. Mu, A. Akalin, and D. Raz, Infrared microspectroscopy of human tissue: principles and future promises, *Faraday Discuss.* (2016).
- [14] D. I. Ellis, D. P. Cowcher, L. Ashton, S. O’Hagan, and R. Goodacre, Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool, *Analyst* **138**, 3871–3884 (2013).
- [15] A. L. Mitchell, K. B. Gajjar, G. Theophilou, F. L. Martin, and P. L. Martin-Hirsch, Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting, *J. Biophotonics* **7**, 153–165 (2014).
- [16] M. J. Baker and K. Faulds, Fundamental developments in clinical infrared and Raman spectroscopy, *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1792–1793 (2016).
- [17] C. Petibois and B. Desbat, Clinical application of FTIR imaging: new reasons for hope, *Trends Biotechnol.* **28**, 495–500 (2010).
- [18] A. B. Seddon, Mid-infrared (IR) – A hot topic: The potential for using mid-IR light for non-invasive early detection of skin cancer in vivo, *Phys. Status Solidi B* **250**, 1020–1027 (2013).
- [19] K. Kong, C. Kendall, N. Stone, and I. Notingher, Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **89**, 121–134 (2015).
- [20] Z. Wang, Y. Liu, L. Gao, Y. Chen, P. Luo, K. K. Wong, and S. T. Wong, Use of multimode optical fibers for fiber-based coherent anti-Stokes Raman scattering microendoscopy imaging, *Opt. Lett.* **36**, 2967–2969 (2011).
- [21] S. Kumar, T. Verma, R. Mukherjee, F. Ariese, K. Somasundaram, and S. Umapathy, Raman and infra-red microspectroscopy: towards quantitative evaluation for clinical research by ratiometric analysis, *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1879–1900 (2016).

- [22] N. C. Purandare, J. Trevisan, I. I. Patel, K. Gajjar, A. L. Mitchell, G. Theophilou, G. Valasoulis, M. Martin, G. von Büнау, et al., Exploiting biospectroscopy as a novel screening tool for cervical cancer: towards a framework to validate its accuracy in a routine clinical setting, *Bioanalysis* **5**, 2697–2711 (2013).
- [23] M. J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H. J. Butler, K. M. Dorling, P. R. Fielden, S. W. Fogarty, N. J. Fullwood, et al., Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials, *Nat. Protoc.* **9**, 1771–1791 (2014).
- [24] H. J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N. J. Fullwood, B. Gardner, et al., Using Raman spectroscopy to characterize biological materials, *Nat. Protoc.* **11**, 664–687 (2016).
- [25] J. Trevisan, P. P. Angelov, A. D. Scott, P. L. Carmichael, and F. L. Martin, IRootLab: a free and open-source MATLAB toolbox for vibrational biospectroscopy data analysis, *Bioinformatics*, btt084 (2013).
- [26] J. C. Anderson, J. C. Williams, A. P. Evan, K. W. Condon, and A. J. Sommer, Analysis of urinary calculi using an infrared microspectroscopic surface reflectance imaging technique, *Urol. Res.* **35**, 41–48 (2007).
- [27] C. Haisch, Raman-based microarray readout: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, 1–11 (2016).
- [28] D.-W. Li, W.-L. Zhai, Y.-T. Li, and Y.-T. Long, Recent progress in surface enhanced Raman spectroscopy for the detection of environmental pollutants, *Microchim. Acta* **181**, 23–43 (2013).
- [29] J. Cloutier, L. Villa, O. Traxer, and M. Daudon, Kidney stone analysis: “Give me your stone, I will tell you who you are!,” *World J. Urol.* **33**, 157–169 (2015).
- [30] C. Conti, M. Casati, C. Colombo, M. Realini, L. Brambilla, and G. Zerbi, Phase transformation of calcium oxalate dihydrate–monohydrate: Effects of relative humidity and new spectroscopic data, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **128**, 413–419 (2014).
- [31] B. J. Davis, P. S. Carney, and R. Bhargava, Theory of mid-infrared absorption microspectroscopy, *Anal. Chem.* **82** (2010).

- [32] S. Popescu, M. Stefanescu, E. Popovici, and I. Perhaita, Evaluation of the renal calculi compositions, *J. Therm. Anal. Calorim.* **114**, 765–775 (2013).
- [33] G. Vasuki and R. Selvaraju, Growth and Characterization of Uric Acid Crystals, *International Journal of Science and Research* **3(8)**, 696-699 (2014).
- [34] R. L. Frost, J. Yang, and Z. Ding, Raman and FTIR spectroscopy of natural oxalates: Implications for the evidence of life on Mars, *Chin. Sci. Bull.* **48**, 1844–1852 (2003).
- [35] A. K. Chandra and T. Zeegers-Huyskens, Theoretical study of the acidity and basicity of uric acid and its interaction with water, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **811**, 215–221 (2007).
- [36] J. Gao, J.-F. Xue, M. Xu, B.-S. Gui, F.-X. Wang, and J.-M. Ouyang, Comparison of Physicochemical Properties of Nano- and Microsized Crystals in the Urine of Calcium Oxalate Stone Patients and Control Subjects, *J Nanomater.* **2014**, 49:49–49:49 (2014).
- [37] J. Y. He, S. P. Deng, and J. M. Ouyang, Morphology, Particle Size Distribution, Aggregation, and Crystal Phase of Nanocrystallites in the Urine of Healthy Persons and Lithogenic Patients, *IEEE Trans. NanoBioscience* **9**, 156–163 (2010).
- [38] P. C. Lee and D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys. Chem.* **86**, 3391–3395 (1982).
- [39] N. Leopold and B. Lendl, A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B* **107**, 5723–5727 (2003).
- [40] D. Aherne, D. M. Ledwith, M. Gara, and J. M. Kelly, Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature, *Adv. Funct. Mater.* **18**, 2005–2016 (2008).
- [41] H. Hu and R. G. Larson, Analysis of the Microfluid Flow in an Evaporating Sessile Droplet, *Langmuir* **21**, 3963–3971 (2005).
- [42] Y. Xie, S. Guo, C. Guo, M. He, D. Chen, Y. Ji, Z. Chen, X. Wu, Q. Liu, et al., Controllable Two-Stage Droplet Evaporation Method and Its Nanoparticle Self-Assembly Mechanism, *Langmuir* **29**, 6232–6241 (2013).

- [43] F. S. Ameer, W. Hu, S. M. Ansar, K. Siriwardana, W. E. Collier, S. Zou, and D. Zhang, Robust and Reproducible Quantification of SERS Enhancement Factors Using a Combination of Time-Resolved Raman Spectroscopy and Solvent Internal Reference Method, *J. Phys. Chem. C* **117**, 3483–3488 (2013).
- [44] B. L. Goodall, A. M. Robinson, and 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. PCCP* **15**, 1382–1388 (2013).
- [45] Z. Bar-Joseph, D. K. Gifford, and T. S. Jaakkola, Fast optimal leaf ordering for hierarchical clustering, *Bioinforma. Oxf. Engl.* **17 Suppl 1**, S22-29 (2001).
- [46] C. E. Zois, E. Favaro, and A. L. Harris, Glycogen metabolism in cancer, *Biochem. Pharmacol.* **92**, 3–11 (2014).

Summary

Rapid advance in biology and medicine leads to an increasing demand of knowledge about chemical composition and structure of related molecular compounds, their function and response to changing environment. Vibrational spectroscopy has been increasingly used for this purpose. It provides information about vibrational modes in sample molecules and is a standard method for determination of chemical composition, molecular structure and intermolecular interactions. Versatility of sample preparation methods, possibility to analyze small samples provided by coupling the spectrometers to microscopes and the fact that no labelling is needed to obtain contrast makes vibrational spectroscopy extremely attractive for studies of biological samples: from small molecules to complex structures of proteins, from biological fluids to cells and tissues.

Many scientific research nowadays is based on a thought that vibrational spectroscopy could also be useful for early diagnostics of diseases. It allows detecting alterations in biochemistry of cells, tissues, biological fluids, etc. caused by various pathologies. Due to sensitivity of vibrational spectroscopy, these alterations could be discovered earlier than with any other currently available chemical or spectroscopic method. When experiments are performed according to protocol and under constant conditions, vibrational spectroscopy can also provide objective and operator independent results. In addition, availability of fiber optics and the fact that vibrational spectra can be recorded in a fraction of seconds opens up a possibility for diagnosis *in vivo*.

Despite the potential of vibrational spectroscopy methods and a vast amount of laboratory research being carried out, application of vibrational spectroscopy in routine biomedical tests is still episodic. There are several reasons for this. Firstly, for the method to be approved in medical practice, it has to produce certain values of sensitivity and specificity, go through reliability tests and clinical trials. With lack of close cooperation between medics and scientists, this is a difficult task to

accomplish. Secondly, analysis of biological samples is challenging in itself due to issues related to sample preparation and spectral analysis. Normally, they contain a mixture of macromolecules which all contribute to the resultant spectrum causing spectral bands to overlap and broaden. While such spectra contain vast amounts of information that can be used for diagnostic purposes, their analysis by simply evaluating peak positions, intensities and half-widths usually gives little use; particularly, when the spectral data set is large. Therefore, data pre-processing algorithms and multivariate statistical analysis for data reduction and classification is necessary. Furthermore, samples of various nature and in various environments require consideration of the most suitable approach for their analysis. Solid biological samples, such as urinary stones, often require use of infrared (IR) microscopy in specular reflection mode which yields Reststrahlen spectral bands in the recorded spectra. This method allows obtaining information about both chemical composition and structure of samples as, unlike other techniques, does not require sample grinding. On the other hand, specular reflectance spectra require complex mathematical processing before both qualitative and quantitative analysis can be performed. Standard Kramers-Kronig transform is rarely applicable due to issues related to acquisition of spectra, sample homogeneity and surface roughness. Alternatively to the specular reflection IR microspectroscopy, Raman scattering methods could be applied. While this technique requires no sample preparation, fluorescence background is a common issue when biological samples are analyzed. In addition, due to low yield of Raman scattered photons, spectral acquisition time is long.

Low efficiency of Raman scattering also prevents it from applications in detection of small concentrations of substances in solutions, such as biological fluids. This can be overcome by using signal enhancement by metal nanoparticles – surface enhanced Raman scattering spectroscopy. The challenge for this method to be used in clinical practice lies in achieving reproducibility and selectivity when biological fluids of complex compositions are analyzed.

Finally, despite the fact that complementary use of vibrational spectroscopy techniques provides the best perspectives for their practical applications, they are often

viewed at as separate and competing techniques. This limits their acceptance among other routine methods.

Goals and tasks of the thesis

Responding to the challenges highlighted above, **the main goal of this thesis** is complementary application of vibrational spectroscopy and microspectroscopy methods for analysis of biomedical samples - urinary stones, urinary deposits and biological fluids. The work is focused on adapting the methods and data analysis techniques to obtain reliable and repeatable results. To achieve this goal, the following **tasks were formulated:**

1. Apply and evaluate potential of vibrational spectroscopy and microspectroscopy techniques for comprehensive morphochemical analysis of human urinary stones.
2. Apply and evaluate potential of infrared spectroscopy and microspectroscopy for chemical analysis of urinary deposits.
3. Explore enhancement effects of various drop-dried colloidal substrates with differently shaped silver nanoparticles and find optimal experimental conditions for detection traces of uric acid in aqueous solutions by means of surface enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy and perform assignment of the SERS spectral bands by means of density functional theory calculations.
4. Perform infrared spectral analysis of extracellular fluid taken from healthy and tumor kidney tissue during nephrectomy surgery for identification of spectral markers of cancer.

Statements of the thesis

1. Specular reflection IR microspectroscopy in MIR and FIR spectral region can be efficiently used for chemical imaging of solid, rough surface samples such as human urinary stones only when specific spectral pre-processing is performed.
2. Epi-detected non-linear optical imaging provides chemically sensitive information concerning microstructure of urinary stones at lateral resolution higher than 1 μm .

3. Macro-ATR IR spectroscopy is found to be superior method to conventional optical microscopy for determining chemical composition of atypical crystal, poly-crystal and amorphous urinary deposits.
4. Semi-quantitative analysis of uric acid in biological fluids by means of colloidal SERS with detection limits down to 10^{-6} M is possible only when special drop-drying technique is used for preparation of the substrates.
5. Statistical multivariate analysis applied to IR spectral bands of glycogen in the spectral region of C-O stretching vibrations allows differentiating between healthy and cancerous kidney tissue with sensitivity up to 91 %.

Novelty and relevance of the results

- Complementary use of vibrational spectroscopy techniques has the best prospects for practical biomedical applications due to their versatility regarding sample size, aggregation state or concentration.
- In this work we show for the first time that for solid samples, such as urinary stones, diffuse reflection influence has to be taken into account for reliable qualitative and semi-quantitative analysis using specular reflection IR microspectroscopy. This can be done either by subtracting the diffuse reflection component from the specular reflection spectra or by applying FIR radiation for the analysis.
- Despite the fact that nonlinear optical microscopy has been mostly used for analysis of tissues and lipid structures, the method is suitable to determine both chemical composition and microstructure of urinary stones for more comprehensive pathogenesis of urolithiasis.
- The only currently applied method for early diagnosis of urolithiasis – optical microscopy of urinary deposits – is unreliable both in detecting the deposits and determining their chemical composition. Macro-ATR IR spectroscopy is found to be

superior method for determining chemical composition of atypical crystal, polycrystal and amorphous urinary deposits.

- Possibility to obtain quantitative information about low concentration substances in solutions (or biological fluids) by means of SERS is of great importance if the method is going to be used in clinical practice. We show that for detection of uric acid by colloidal SERS technique it is possible only when special drop-drying technique is used for preparation of the substrates
- IR spectroscopic analysis of extracellular fluid is a new, never before applied method for differentiation of healthy and cancerous tissue.

Main results

Results of the analysis of urinary stones and urinary deposits

In this work, human urinary stones were analyzed by means of vibrational spectroscopy. Complementary use of methods such as IR absorption spectroscopy, IR specular reflection microspectroscopy, Raman spectroscopy and nonlinear optical microscopy, was implemented for the first time. Visual inspection of the stones by optical stereomicroscopy allowed obtaining information about their growth processes. For instance, papillary surface is typical to stones that formed attached on a surface in the urinary system, while smooth, glossy surface is caused by rubbing between multiple unattached stones confined in the same anatomical site in urinary tract. Specific morphological features suggesting last stages of stones' growth were additionally analyzed by Raman scattering microscopy which revealed chemical composition of minor components in urinary stones such as sucrose, COD or blood.

IR absorption spectroscopy in the MIR and FIR spectral regions allowed determining complete chemical composition of 403 urinary stones. The results reflect prevalence of different types of stones in Lithuania: calcium oxalate stones – 61 %, uric acid stones – 26 %, struvite stones - 10 %, brushite stones - 2 % and apatite stones - 1 %. While these results correlate well with observations in other countries such as

Germany or the USA, the percentage of calcium oxalate stones is lower and the percentage of uric acid stones – unexpectedly high.

IR specular reflection microspectroscopic imaging was used to deduce both the chemical composition and structure of urinary stones simultaneously. In the MIR spectral region, the method can only be effectively used if diffuse reflection influence is taken into account. Specular reflection spectra that are affected by the diffuse reflection require modification of the experimental spectra – subtraction of the diffuse reflection component – prior application of Kramers-Kronig transform to convert Reststrahlen spectral bands to absorbance bands. Only then chemical images can be created by integrating areas under the characteristic calculated bands. Such chemical images have higher contrast and boundaries between different components in the stones can be determined more precisely. Otherwise, HCA analysis can be used to group raw specular reflectance spectra and create the chemical images. Despite the fact that quantitative information is lost, the analysis procedure is much simpler and the HCA chemical images correspond well with the chemical images created by integrating areas under the characteristic calculated bands. When FIR radiation is used for the chemical imaging, the diffuse reflection influence is significantly diminished and Kramers-Kronig transform can be directly used to convert Reststrahlen spectral bands to absorbance bands. High contrast images can be created by calculating integral intensities of such converted characteristic spectral bands.

Nonlinear optical microscopy (CARS, TPEF and SHG signals are recorded) was used to determine chemical composition and microstructure of urinary stones. It was determined that different chemical constituents of urinary stones can be well discriminated in the multimodal images by the optical signal they generate. For instance, TPEF, blue and red fluorescence were generated by COM, intense CARS signal and TPEF – by uric acid and SHG signal - by struvite. However, neither COD nor ACP could be discriminated from COM. Apatite, on the other hand, generated both red fluorescence and blue fluorescence, as well as green TPEF signal which were more intense than those generated by COM and thus clearly distinguishable. These five chemical components constitute the majority (93.5 %) of human urinary stones. One

advantage of the method over the previously proposed IR specular reflection microspectroscopy is its speed - the images can be captured in less than an hour. In addition, high lateral resolution allows revealing hidden information about the microstructure of the stones.

For early diagnosis of urolithiasis, analysis of urinary deposits in the urine of high risk urolithiasis patients is crucial. Optical microscopy is currently the only method used for this purpose, however, this method is not reliable to determine chemical composition of atypical crystal, poly-crystal and amorphous deposits. In this work we show that IR transmission microspectroscopy, macro-ATR and micro-ATR spectroscopic methods are suitable to determine chemical composition of such formations. While crushing of the deposits is necessary in order to obtain the transmission spectra, the ATR methods do not require any additional sample preparation. Furthermore, micro-ATR spectra of deposits as small as $15 \times 10 \mu\text{m}$ in size could be recorded. On the other hand, ease of use and availability of the portable IR spectrometer with macro-ATR unit makes the method more attractive for routine measurements. High quality macro-ATR spectra of urinary deposits larger than $100 \mu\text{m}$ could be recorded.

Analyzing chemical composition of urinary deposits and urinary stones of urolithiasis patients, it was determined that at least one component is common both in the deposits and in the stones in 73 % of the cases of the 76 patients investigated. In 41 % of those cases, a complete match of chemical composition was observed. The level of correlation varied depending on the type of the stones.

Results of the analysis of biological fluids

In this work, analysis of biological fluids was performed for diagnostic purposes. Low concentration uric acid aqueous solutions were analyzed by means of colloidal SERS spectroscopy. For experimental setup with 1064 nm excitation laser, liquid aqueous solutions cannot be analyzed due to water absorption (third overtone of OH stretching vibration). Therefore, drop-dried colloidal substrates using Lee-Meisel, Leopold-Lendl and Aherne et al. colloids, containing differently shaped, spherical and prism shaped nanoparticles respectively, were produced. Nearly uniform spread of the

nanoparticles across the area of the drop was achieved which, in turn, led to relatively small variance (approx. 30 %) in analytical enhancement factor across the drops' diameter. Such substrate preparation could eventually lead to creation of reproducible self-assembled layers of nanoparticles which could then be used for reproducible SERS enhancement and quantitative analysis.

The most uniform and providing the highest enhancement SERS substrates produced by using the Lee-Meisel colloid allowed detecting uric acid in aqueous solutions of concentrations down to 10^{-6} M. Density functional theory calculations of uric acid tautomer – five-atom silver cluster complexes allowed correct assignment uric acid spectral bands in SERS spectra. Differences between Raman and SERS spectra of uric acid can be mainly explained by tautomerization of the molecule and its bonding to the silver surface.

Analysis of extracellular fluid taken from healthy and cancerous kidney tissue was performed by means of IR spectroscopy. It was determined that IR absorption spectra of the extracellular fluid contain spectral markers, mainly assigned to glycogen, which can be used for reliable differentiation between normal tissue and cancer. Application of HCA and PCA analysis methods to the spectral region where the glycogen bands are located allowed better evaluation of relationship between samples: dried extracellular fluid films can be reliably separated into two groups corresponding to the tissue type. Sensitivity and specificity values of the HCA are 91 % and 96 % respectively.

Conclusions

Conclusions of the analysis of urinary stones and urinary deposits

1. Morphological examination of urinary stones provided both valuable information about their growth processes and some clue on what path further vibrational spectroscopic analysis should take. Specific morphological features suggesting last stages of stones' growth were additionally analyzed by Raman scattering microscopy which revealed chemical composition of minor components in urinary stones such as COD, sucrose or blood.

2. Comprehensive chemical analysis of urinary stones by means of IR spectroscopy is only possible when both MIR and FIR radiation is used. After performing IR spectroscopic analysis of 403 urinary stones, distribution according to their type was determined: calcium oxalate stones – 61 %, uric acid stones – 26 %, struvite stones – 10 %, brushite stones - 2 % and apatite stones - 1 %.
3. Specular reflection microspectroscopic imaging of urinary stones in MIR spectral region can be effectively used only if (I) modification of the experimental spectra – the subtraction of the diffuse reflection component – is performed prior application of KKT to convert Reststrahlen spectral bands to absorbance bands or (II) HCA is used to group the spectra and create the chemical images.
4. Specular reflection microspectroscopic imaging of urinary stones in FIR spectral region allows suppressing influence of diffuse reflection. KKT can be directly used to convert Reststrahlen spectral bands to absorbance bands without any additional pre-processing.
5. Epi-detected nonlinear optical microscopy, when CARS, TPEF and SHG signals are recorded, can be used to determine chemical composition and microstructure of urinary stones. Different constituents of urinary stones can be well discriminated according to the optical signal they generate.
6. IR transmission microspectroscopy, macro-ATR and micro-ATR spectroscopic methods were shown to be suitable to determine chemical composition of atypical crystal, poly-crystal and amorphous urinary deposits and are superior to the conventional optical microscopy. The fact that high quality macro-ATR spectra of urinary deposits larger than 100 μm could be recorded and that the method does not require sophisticated equipment, makes it attractive for applications in clinical practice.

7. High correlation between chemical composition of urinary deposits and urinary stones obtained from the same urolithiasis patients was observed. At least one common component was found both in the deposits and in the stones in 73 % of the cases of the 76 patients investigated. In 41 % of those cases, a complete match of chemical composition was observed.

Conclusions of the analysis of biological fluids

1. For detection of metabolites in biological fluids, drop-dried colloidal substrates using Lee-Meisel, Leopold-Lendl and Aherne et al. colloids containing nanoparticles of different shapes were produced. Nearly uniform spread of the nanoparticles across the area of the drop was achieved which, in turn, led to relatively small variance (approx. 30 %) in analytical enhancement factor across the drops' diameter.
2. The SERS substrates produced by using the Lee-Meisel colloid allowed detecting uric acid in aqueous solutions of concentrations down to 10^{-6} M. DFT calculations of uric acid tautomer – five-atom silver cluster complexes allowed correct assignment uric acid spectral bands in SERS spectra. Differences between Raman and SERS spectra of uric acid can be mainly explained by tautomerization of the molecule and its bonding to the silver surface.
3. IR absorption spectra of dried ECF taken from kidney tissue contain reliable spectral markers, mainly assigned to glycogen, capable of differentiating between healthy and tumor tissue. Results of the HCA of the spectra show that the spectra of healthy and tumor tissue films can be reliably separated into two groups. Sensitivity and specificity values of the method are 91 % and 96 % respectively.