

Vilniaus universiteto  
Fizikos fakulteto  
Cheminės fizikos institutas

Dominyka Grašytė

ŠLAPIMO PŪSLĖS NUOPLOVŲ TYRIMAS SERS METODU, NAVIKŲ DIAGNOSTIKAI

Magistro baigiamasis darbas

Gyvybės ir cheminės fizikos studijų programa

Studentė

Dominyka Grašytė

Leista ginti

2023-05-25

Darbo vadovas

prof. Justinas Čeponkus

Instituto direktorius

prof. Darius Abramavičius

Vilnius 2023

## Turinys

Įvadas.....	3
I. Teorinė dalis .....	5
1. Šlapimo pūslės vėžys.....	5
2. Ramano sklaida .....	6
3. Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida (SERS).....	7
3.1 Krūvio pernašos modelis .....	8
3.2 Elektromagnetinis modelis .....	8
4. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos registravimo metodai .....	12
5. Nanodalelių koloidiniai tirpalai.....	13
II. Eksperimentas.....	16
1. Koloidinių irpalų ruošimui naudoti prietaisai ir medžiagos .....	16
2. Koloidinių sidabro nanodalelių tirpalo centrifugavimas.....	16
3. Koloidinio tirpalo sugerties spektrai .....	17
4. Bandinių ruošimas .....	17
5. Prietaisai spektrų registravimui .....	17
III. Statistinės analizės metodai .....	19
1. Hierarchinė klasterių analizė .....	19
2. Pagrindinių komponentų analizė.....	19
3. K-vidurkių analizė .....	20
IV. Rezultatai.....	22
1. Koloidinis sidabro nanodalelių tirpalas.....	22
2. Mokslo tiriamojo darbo I-II dalyje atlikti tyrimai .....	23
3. SERS spektriniai rezultatai .....	25
3.1 Šlapimo pūslės nuoplovų tyrimai .....	25
3.2 Statistinė analizė .....	28
Pagrindiniai rezultatai ir išvados.....	36
Literatūra.....	42

## Ivadas

Šlapimo pūslės vėžys – tai liga, kuomet šlapimo pūslėje formuojasi piktybiniai navikai. Šie susirgimai labiau būdingi vyrams, nes yra diagnozuojama net 4 kartus dažniau nei moterims. Dažniausiai ši liga diagnozuojama vyresniems nei 50 metų asmenims. Pagal statistinius duomenis, jeigu nustatomas ankstyvos stadijos šlapimo pūslės vėžys ir yra skiriamas tinkamas gydymas, net penkerius metus išgyvena daugiau nei 90% ligonių, esant išplitusiam vėžiui, kai stadija jau pažengusi – 46%, o atsiradus metastazių – tik 9% ligonių išgyvena iki penkerių metų. Pacientams aptikus navikus, kurie yra įsiskverbę į raumeninį sluoksnį ir giliau, 5% atvejų randama metastazių [1]. Svarbu paminėti, kad ankstyvoje stadijoje, liga dažniausiai yra besimptomė. Vienas pirmųjų simptomų, kuris atsiranda susirgus – kraujo atsiradimas šlapime, tačiau jis gali būti aptinkamas ir dėl cistito, akmenligės ar prostatos ligų. Mokliškai įrodyta, kad pagrindiniai veiksniai, lemiantys šlapimo pūslės piktybinio naviko susiformavimą, yra rūkymas, lėtinis ir nuolatos besikartojantis šlapimo pūslės uždegimas.

Ligos diagnozavimui yra sukurta daugybė tyrimų įskaitant hematauriją, kompiuterinės tomografijos urografiją (KTU), intraveninę urografiją (IVU), multiparametrinę magnetinę rezonansą bei citoskopiją. Kraujo šlapime (hemataurija) tyrimo metodas yra gana paprastas ir gali būti atliekamas bendrosios sveikatos patikrinimo metu, bet rezultatų patikimumas yra mažas, todėl reikalingi tolimesni ir sudėtingesni testai. KTU pranašumai, lyginant su IVU, ypač stebimi esant invaziniam šlapimo pūslės vėžiui ar viršutinių šlapimo takų urotelio karcinomai. Tačiau KTU turėtų būti taikoma tik pradinei vėžio diagnostikai. Šio tyrimo atlikimas po nustatytos diagnozės, yra abejotinas, dėl žemo reikšmingų radinių dažnio [1-3]. Multiparametrinio magnetinio rezonanso pranašumas yra didesnis minkštųjų audinių kontrastas bei tai, kad išvengiama apšvitos. Tačiau pasak Europos urologų asociacijos, multiparametrinio magnetinio rezonanso reikšmė šlapimo pūslės vėžio diagnostikoje ir stadijos nustatyme kol kas nėra patikrinta ir patvirtinta patikimais moksliniais tyrimais [4].

Geras šlapimo ar šlapimo pūslės nuoplovų tyrimas klinikinėje praktikoje yra suprantamas, kaip tyrimas, galintis padėti išvengti invazinių diagnostinių metodų bei aptikti tuos piktybinius pakitimus, kurie nebuvo užfiksuoti vaizdiniais ar invaziniais tyrimais. Klinikinėje praktikoje yra taikoma keletas šlapimo ir šlapimo pūslės nuoplovų tyrimų, tačiau kol kas idealaus tyrimo nėra. Jų pritaikomumą apriboja prastas jautrumas ir specifiskumas, ypač pirmose naviko stadijose [5-7]. Labiausiai klinikinėje praktikoje naudojamas šlapimo pūslės nuoplovų citologinis tyrimas atipinėms ląstelėms nustatyti. Tai yra didelio jautrumo (84%) tyrimas, tačiau tik tuomet, kai šlapimo pūslės vėžys yra G3 stadijos arba aukšto piktybiškumo. Šlapimo pūslės vėžiui esant G1 stadijos ar žemo piktybiškumo, tyrimo jautrumas siekia tik 16% [8]. Todėl siekiant efektyvaus pacientų gydymo, reikia sukurti nebrangų, neinvazinį, greitą ir automatizuotą didelio jautrumo diagnostikos metodą.

Atlikti moksliniai tyrimai įrodo, kad virpesinė spektroskopija gali būti naudojama tiksliai ir didelių išlaidų nereikalaujančiam biologinių audinių bei skysčių žymenų identifikavimui. Yra žinoma, jog šios metodikos tinkamos ir naudojamos sveikų ir vėžinių skydliaukės, plaučių, prostatos bei odos audinių žymenų aptikimui [9]. Sveikų ir vėžinių audinių ląstelių biologiniai skirtumai nedideli, tačiau gali nulemti labai skirtingus ląstelių metabolizmus. Vėžio diagnozavimas būtent ir yra atliekamas remiantis vėžinių ląstelių metabolizmo pokyčiu. Šlapimo pūslės nuoplovų cheminė sudėtis vėžiniuose ir sveikuose audiniuose yra skirtinga, todėl atlikus fizikinę, cheminę ir biologinę šlapimo pūslės nuoplovų analizę galima nustatyti ar pacientas, kurio šlapimo pūslės nuoplovos tiriamos serga vėžiu ar ne. Tokią analizę galima atlikti naudojant Ramano sklaidą.

Susiduriama su problema, kad šlapimo pūslės nuoplovų bandinius sudarančių molekulių koncentracija yra per maža, jog būtų galima užregistruoti kokybiškus šio bandinio Ramano sklaidos spektrus. Tačiau yra išeitis, nes bandinių, kuriose molekulių koncentracija nedidelė, virpesinius spektrus galima užregistruoti pasinaudojus paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (angl. *surface enhanced Raman scattering* – SERS) metodu. SERS naudojamas kartu su koloidiniais sidabro (arba aukso) nanodalelių tirpalais. Jų pagalba gaunamas itin didelis Ramano sklaidos signalo stiprinimas, o tirpalų paruošimas nėra sudėtingas ir nereikalauja didelių išlaidų.

Magistro baigiamojo darbo tikslas – taikyti paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos metodą šlapimo pūslės vėžio tyrimams.

Tiksliui pasiekti iškeltos užduotys:

1. Užregistruoti pacientų vėžinių ir sveikų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrus.
2. Atlikti užregistruotų spektrų statistinę analizę, juos sugrupuoti į grupes vėžinis/nevėžinis.
3. Atlikti spektrinių juostų priskyrimą molekuliniais dariniais ir nustatyti spektrinius vėžio žymenis.

## I. Teorinė dalis

### 1. Šlapimo pūslės vėžys

Šlapimo pūslės vėžys atsiranda dėl labai spartaus „išsigimusių“ ląstelių augimo ir plitimo. Vėžinės ląstelės susidaro pakitus genams, kurie ir lemia ląstelių augimą. Šlapimo pūslės audinio vėžys šiuolaikinėje medicinoje yra išskiriamas į kelias klases, pagal vėžio vietą organizme, kilmės priežastis ir fiziologines savybes organe. Bendrai išskiriamos trys esminės šlapimo pūslės vėžio rūšys: urotelio karcinoma, plokščialąstelinė karcinoma ir adenokarcinoma. Šlapimo pūslės vėžys susidaro, kai mutuoja šlapimo pūslės gleivinės ląstelės, todėl pagrindinės vėžio rūšys ir yra vadinamos pagal ląsteles, kuriose atsiranda piktybinių (vėžinių) pakitimų.

Dažniausiai diagnozuojama šlapimo pūslės navikų rūšis yra pereinamųjų ląstelių (urotelio) karcinoma (90–95% atvejų) [10]. Pereinamųjų ląstelių karcinomos pradžia fiksuojama inkstuose, šlapimtakiuose ir šlapimo pūslėje. Pastarosios ląstelės turi gebėjimą išsiplėsti, kai šlapimo pūslė yra pilna, ir susitraukti, kai ji lieka tuščia, nes šios ląstelės yra išklojusios visą šlapimo pūslės, šlapimtakių ir šlaplės vidų. Pagal vėžinių ląstelių diferenciacijos laipsnį urotelio karcinoma yra išskiriama dar į du tipus: į mažo ir didelio diferenciacijos laipsnio. Vėžinių ląstelių diferenciacijos laipsnis nustatomas mikroskopu ištyrus naviko biopsinės medžiagos ląsteles. Diferenciacijos laipsnis naudojamas apibūdinti kaip labai vėžinės ląstelės yra pakitusios, lyginant su tomis ląstelėmis, iš kurių jos išsivystė [11]. Kuo diferenciacijos laipsnis didesnis, tuo naviko ląstelės yra mažiau panašios į sveikas, pats navikas greičiau auga, liga vis agresyvesnė. Kuo diferenciacijos laipsnis mažesnis tuo naviko ląstelės labiau panašios į sveikas, patys navikai formuojasi lėčiau, o ligos eiga gali būti mažo agresyvumo. Mažo diferenciacijos laipsnio (G1, G2) pereinamųjų ląstelių karcinoma po gydymo gali ir pasikartoti, tačiau labai retai išplinta į kitus organus ar kūno dalis. Didelio diferenciacijos laipsnio (G3, G4) pereinamųjų ląstelių karcinoma po gydymo labai dažnai pasikartoja, yra reikalingas nuolatinis paciento stebėjimas, taip pat dažniau pasitaiko, kad išplinta į kitus organus, kūno dalis ir limfmazgius. Kitas šlapimo pūslės vėžio tipas, plokščialąstelinė karcinoma, kuri formuojasi iš plokščiųjų ląstelių (sudaro 3–7% atvejų). Dažnu atveju susidaro po ilgalaikės stiprios infekcijos ar nuolatinio dirginimo, pavyzdžiui dėl dažno ilgo kateterio naudojimo [12]. Paskutinioji šlapimo pūslės vėžio rūšis – adenokarcinoma, kuri susidaro iš liaukų ląstelių, kurios yra šlapimo pūslės gleivinėje. Adenokarcinoma sudaro tik 1–2% visų šlapimo pūslės vėžio atvejų. Vėžys išplitęs ir pažeidęs šlapimo pūslės gleivinę, įsiskverbęs į raumeninį pūslės sienelės sluoksnį arba išplitęs į netoliese esančius organus, vadinamas.

Vėžinių šlapimo pūslės audinių ląstelių cheminė sandara skiriasi nuo sveikų ląstelių. Visi navikai yra genetiškai unikalūs dėl kiekviename naviko klone įvykusių skirtingų mutacijų kiekio. Todėl net ir tų pačių navikų ląstelės turi skirtingą morfologiją bei fenotipą, ir skirtingai sąveikauja su navikų

mikroaplinka. Kai navikas formuojasi, kuria sau palankią mikroaplinką formuodamas kraujagysles, jis sutrikdo imuninę sistemą, perorganizuoja kolageno gijų (angl. *fiber branches*) neuroninį tinklą, kad užsitikrintų kelius išplitimui. Atlikti tyrimai parodė labai didelę įtaką daugumos terapijų efektyvumui bei tokios unikalios sąveikos svarbą bendram naviko piktybiškumui [13]. Vėžio atsiradimo ir vystymosi metu naviko mikroaplinkos komponentas tarpląstelinė matrica (angl. *extracellular matrix* – ECM) patiria struktūrinius pokyčius [14]. ECM sudaro specifinę erdvinę struktūrą - tinklą, kuriame įsitvirtina naviko ląstelės. ECM pagrindas yra sudarytas iš baltymo kolageno gijų. Tokia matricos sandara pakinta esant atitinkamoms žmogaus organizmo patologijoms, bei tvirtų audinių navikuose. Dėl to, šlapimo pūslės patologinių būklių identifikavimui itin svarbu atpažinti kolageno gijas ir detalai kiekybiškai jas charakterizuoti.

Tyrimų metu taip pat pastebėta, kad tabako rūkymas yra svarbiausias šlapimo pūslės vėžio rizikos veiksnys. Net daugiau nei 50% pacientų sergančių šlapimo pūslės vėžiu yra rūkantys [16-18]. Rūkančių šlapime kaupiasi kenksmingos cheminės medžiagos, kurios dažniausiai sukelia šlapimo pūslės epitelio ląstelių DNR mutacijas. Rizika, susijusi su elektroninėmis cigaretėmis, nėra tinkamai ištirta, tačiau rūkančių šlapime aptikti kancerogenai, kurie gali lemti šlapimo pūslės vėžio išsivystymą [18]. Aromatinių aminių, policiklinių aromatinių angliavandenilių ir chlorintų angliavandenilių poveikis yra antras pagal svarbą šlapimo pūslės vėžio rizikos veiksnys, kuris sudaro apie 10% visų atvejų. Profesinis poveikis dažniausiai pasireiškia pramonės įmonėse, kurios apdoroja dažus, metalą ir naftos produktus [15]. Išsivysčiusiose pramonės įmonėse ši rizika buvo sumažinta laikantis darbo saugos gairių, todėl darbuotojų rizika išsivystyti šlapimo pūslės vėžiui nebėra didesnė nei bendros populiacijos [15-16].

## 2 Ramano sklaida

Ramano sklaida – tai fotonų netampri sklaida medžiagoje. Šis sklaidos rūšis yra apibūdinama kvantinės mechanikos sklaidos teorija, bet pagrindinius dėsnius galima paaiškinti klasikinės mechanikos teorijos pagalba [19]. Elektrinio lauko svyravimai, kai į molekulę krinta monochromatinė elektromagnetinė banga, aprašomi lygtimi:

$$E = E_0 \cos \omega t, \quad (1)$$

Tada molekulėje indukuojamas dipolinis momentas, išreiškiamas lygtimi:

$$\mu = \alpha E, \quad (2)$$

čia  $\alpha$  – molekulės poliarizuojamumas.

Daugiaatomės molekulės virpa  $3N-6$  normaliųjų virpesių ( $N$  – atomų skaičius). Tokie virpesiai apibūdinami harmoniniu artiniu pagal formulę:

$$Q = Q_0 \cos \omega_m t, \quad (3)$$

čia  $m$  – normaliojo virpesio numeris. Tuomet molekulės poliarizuojamumas priklauso nuo visų 3N-6 virpesių koordinačių. Jeigu normaliųjų virpesių pusiausvirųjų atstumų aplinkoje, poliarizuojamumą  $\alpha$  išskleidžiame Teiloro eilute, gauname:

$$\alpha = \alpha_0 + \sum_m \frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} Q_m + \dots \quad (4)$$

Galima matyti, kad indukuotas dipolinis momentas molekuleje kinta ir  $\omega_0$  dažniu, ir  $\omega_0 \pm \omega_m$  dažniais. Indukuoto dipolinio momento išraiška tuomet atrodo taip:

$$\mu_{ind} = \alpha_0 E_0 \omega t + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} Q_m E_0 [\cos(\omega_0 - \omega_m)t + \cos(\omega_0 + \omega_m)t] + \dots \quad (5)$$

Šioje lygtyje pirmasis narys nusako nepakitusio dažnio antrinį dipolinį spinduliavimą, kuris vadinamas Reilėjaus (Rayleigh) sklaida. Antrasis ir trečiasis nariai suteikia informaciją apie neelastinę padidėjusio ir sumažėjusio dažnio sklaidą, atitinkamai vadinamas Ramano Stokso bei Ramano anti-Stokso sklaida. Dažniausiai Ramano sklaidos eksperimentuose yra registruojama Ramano Stokso sklaida, kadangi ji intensyvesnė už Ramano anti-Stokso sklaidą. Anti-Stokso sklaida vyksta iš sužadintų virpesinių lygmenų, o jų užpilda yra mažesnė. Ramano sklaidos intensyvumas yra  $10^7$  -  $10^8$  kartų mažesnis nei žadinančios spinduliuotės intensyvumas, o žadinimui reikia galingo monochromatinio šaltinio. Tokį reikalavimą atitinka lazeriai, todėl dažniausiai jie ir yra naudojami Ramano sklaidos eksperimentuose. [19].

### 3 Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida (SERS)

Britų kilmės chemikas Martin Fleischman, padedant kolegoms, 1972 metais atrado paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (SERS) reiškinį [19]. Tyrimų metu, kuomet ant elektrocheminiu būdu šiuurškinto elektrodo paviršiaus tyrinėjo piridino molekulės adsorbciją, pastebėjo, kad piridino molekulės Ramano sklaidos intensyvumas yra sustiprinamas net keliomis eilėmis. Iš pradžių mokslininkai nesuprato ir negalėjo paaiškinti stiprinimo prigimties, todėl galvojo, kad signalo intensyvumas didėja dėl ant aktyvuoto elektrodo paviršiaus padidėjusios adsorbuotų piridino molekulių koncentracijos. Tačiau po penkerių metų, 1977 metais literatūroje atsirado pirmosios publikacijos literatūroje, buvo aptariami paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos paaiškinimai. Dvi atskiros tyrėjų grupės pateikė skirtingus modelius, kurie aiškino stiprinimo prigimtį. Šie modeliai yra vadinami krūvio pernašos ir elektromagnetiniu modeliu. Tokie stiprinimo mechanizmai realiuose SERS eksperimentuose yra labai svarbūs, todėl stiprinimo efektas turi būti aiškinamas abejais modeliais: ir elektromagnetiniu, ir krūvio pernašos.

### 3.1 Krūvio pernašos modelis

Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos reiškinys gali būti aiškinamas pasitelkiant krūvio pernašos komplekso tarp metalo paviršiaus ir tiriamosios molekulės susidarymą [19]. Toks kompleksas susidaro ir yra stebimas retai, nes ant metalo paviršiaus reikalinga tiriamosios molekulės chemisorbcija turi būti pakankamai didelė. Ramano sklaidos signalo stiprinimui krūvio pernašos svarba dažnai yra neitin didelė, nes dauguma molekulių su metalo paviršiumi nesudaro cheminių ryšių. Šiuo modeliu galima paaiškinti tik nedidelę dalį Ramano sklaidos signalo stiprinimo efekto. Tokio stiprinimo faktoriaus vertė gali išaugti net iki 100 kartų, nes naujai susidarantys krūvio pernašos kompleksai tarp molekulės ir metalo stipriai jį veikia. Todėl šio modelio atskiro išsamaus nagrinėjimo nebus.

Dar vienas svarbus efektas – paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos kontinuumas, kuris pasireiškia dėl krūvio pernašos. Kontinuumas, tai pastovus fonas, stebimas SERS spektruose, kuris gali būti aiškinamas molekulės ir paviršiaus plazmonų sąveika [20], tačiau iki šiol dar nėra nustatyta, kaip jį panaikinti.

### 3.2 Elektromagnetinis modelis

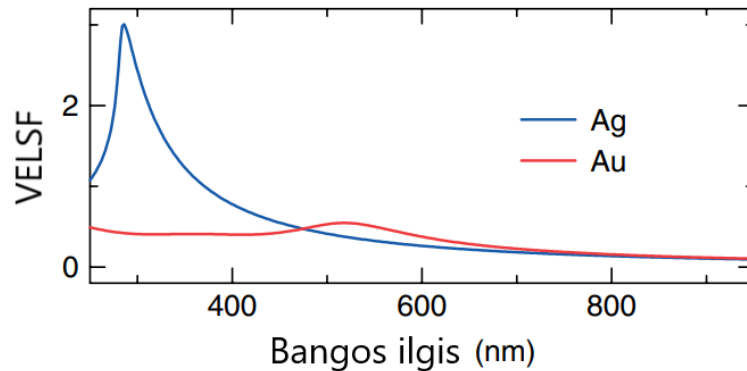
Elektromagnetinis modelis tiria šviesos, kuri sklinda kaip banga, elektrinio lauko poveikį metalo paviršiuje ir paaiškina, kodėl Ramano sklaidos signalas yra stiprinamas. Tokiu modeliu yra nusakomas spektrinių signalų stiprinimas, kuris stebimas ir tuomet, kai cheminis ryšys tarp tiriamos molekulės ir metalo paviršiaus nestebimas. Dėl šios priežasties yra labai svarbu atsižvelgti į elektromagnetiniu modeliu aprašomus efektus, kai nagrinėjama paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida.

Elektromagnetinis stiprinimo modelis yra susijęs su elektromagnetinės bangos ir metalo nanodalelių paviršiuje esančių elektronų sąveika – paviršiaus plazmonų rezonansu. Paveikus metalo nanodalelių elektronus elektromagnetine banga, elektronai pradeda osciliuoti, t.y. sukeliama elektronų tankio fliuktuacijų sklidimas metalo paviršiumi. Šios elektronų osciliacijos vadinamos paviršiaus plazmonais [21]. Nagrinėjant tokį modelį, kad būtų paprasčiau, yra įvedamas dydis, kuris yra vadinamas vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriumi (VELSF). Toks dydis parodo, kiek kartų apibrėžtame erdvės taške padidėja elektromagnetinio lauko stipris dėl metalo nanodalelių. Norint apskaičiuoti VELSF yra randamas intensyvumų santykis, kuomet nagrinėjama erdvės sritis yra prie metalo paviršiaus ir kai nagrinėjamas taškas nėra šalia metalo paviršiaus. VELSF galima apskaičiuoti pagal formulę:

$$VELSF(r, \omega) = \frac{|E(r, \omega)|^2}{|E_0(r, \omega)|^2}, \quad (6)$$

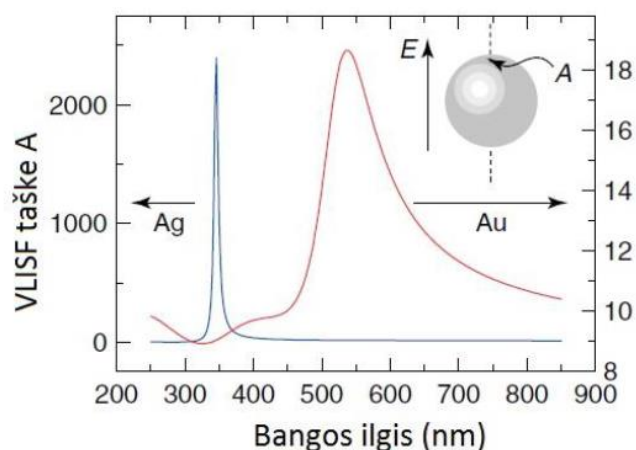


čia  $E(r, \omega)$  – elektrinio lauko stipris erdvės taške, kur yra lokalizuota tiriama molekulė, kai šalia yra metalo paviršius,  $E_0(r, \omega)$  - elektrinio lauko stipris tame pačiame erdvės taške, kai šalia nėra metalo paviršiaus. Vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktorius priklauso nuo spinduliuotės dažnio  $\omega$  ir lokalizacijos vektoriaus  $r$ . VELSF priklausomybė nuo bangos ilgio aukso ir sidabro metalams yra pavaizduota grafiškai 1 pav [21].



1 pav. Aukso ir sidabro VELSF priklausomybė nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio (adaptuota pagal [21])

Didesnės stiprinimo faktoriaus vertės gaunamos parinkus atitinkamas metalų nanodalelių formas. Stiprinimą paaiškina indukuotas dipolis tam tikros formos dalelėse. Taške, esančiame virš dalelės, lauko stiprumas sumuojasi ir jį sudaro krintantysis bei dipolio sukurtas laukai. Didžiausias stiprinimo faktorius gaunamas trikampio formos dalelėse, nes jų smailėse kaupiasi krūvis, tačiau tokios formos dalelės sunku sukurti. Todėl praktikoje dažniausiai naudojamos sferinės dalelės. 2 pav. pavaizduoti stiprinimo faktoriai sferinėms aukso ir sidabro dalelėms.



2 pav. Sferinių dalelių vietinio lauko intensyvumo stiprinimo faktoriaus priklausomybė nuo krintančios elektromagnetinės spinduliuotės bangos ilgio. (adaptuota pagal [21])

Kadangi elektromagnetinė spinduliuotė sąveikauja su metalo paviršiumi, vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus vertė gali išaugti net kelis kartus. Tokią sąveiką galima paaiškinti nagrinėjant vienos metalo nanodalelės sąveiką su spinduliuote, kuri krenta į ją. Tiriamosios nanodalelės matmenys yra daug mažesni už Ramano sklaidą žadinančios spinduliuotės bangos ilgį  $r \ll \lambda$ , kur  $r$  – nanodalelės spindulys, o  $\lambda$  – spinduliuotės bangos ilgis. Todėl spinduliuotės elektrinis laukas ties kiekvienu bangos pusperiodžiu nanodalelės atžvilgiu yra laikomas vienalyčiu. Kai nanodalelė sąveikauja su vienalyčiu elektriniu lauku, laidumo elektronai paviršiuje persiskirsto, tokiu būdu sukurdami nanodalelės elektrinį dipolinį momentą.

Elektrinis laukas, kuomet sklinda banga, osciliuoja nanodalelės atžvilgiu, tai reiškia, kad elektrinio lauko kryptis keičiasi kas pusė periodo. Tuomet susidaro plazmonai – metalo nanodalelių paviršiaus laidumo elektronų tankio osciliacijos. Kuomet elektronų debesėlis išeina iš pusiausvyros būsenos, skirtinguose nanodalelės pusėse yra sukuriamas krūvių skirtumas, kuris aprašomas osciliuojančiu vietiniu elektriniu dipoliu. Nanodalelės matmenys nedideli, todėl indukuotojo dipolio galuose elektrinio lauko linijos sutankėja. Tokiuose taškuose elektrinis laukas, kurį sukuria krintanti spinduliuotė yra mažesnis už krintančios spinduliuotės ir lokaliajo elektrinio lauko susumuotą elektrinį lauką. Dėl to tiriamąją molekulę, kuri yra šalia nanodalelės, veiks stipresnis elektrinis laukas ir Ramano sklaidos signalas bus didesnis už molekulės, kuri yra toliau nuo nanodalelės [21].

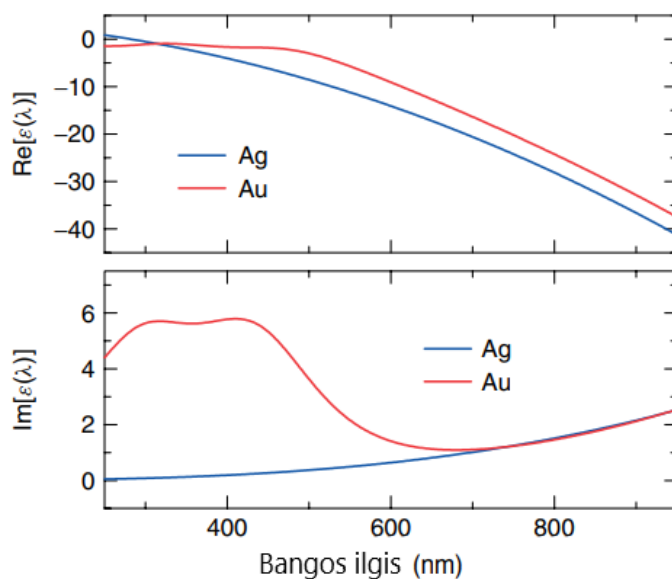
Stipresnį suminį elektrinį lauką ir vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktorių galima gauti, jei yra tenkinama rezonanso sąlyga. Tokią sąlygą aprašo formulė, kuri nusako metalo nanodalelės indukuoto dipolio momentą (7):

$$p \propto \left( \frac{\varepsilon(\lambda) - \varepsilon_M}{\varepsilon(\lambda) + 2\varepsilon_M} \right), \quad (7)$$

kur  $p$  – indukuotas dipolinis momentas,  $\varepsilon(\lambda)$  – metalo nanodalelės dielektrinė skvarba, o  $\varepsilon_M$  – dielektrinė skvarba aplinkos, kurioje yra nanodalelė.

Jei metalo, iš kurio sudaryta nanodalelė, dielektrinė skvarba yra du kartus didesnė už aplinkos, kur ta nanodalelė patalpinta, dielektrinę skvarbą ir yra priešingo ženklo, tuomet galios rezonanso sąlyga, stipriai padidės indukuotas dipolinis momentas ir išaugs lokaliajo ir suminio elektrinio lauko stipriai. Jei tenkinama rezonanso sąlyga, pats rezonanso dažnis taip pat yra priklausomas nuo elektronų efektyviosios masės, krūvio tankio, bendrojo krūvio ir nanodalelės dydžio. Tokiai sąlygai esant, vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktorius vertė gali išaugti iki  $10^6$  -  $10^9$ . Tai sunku pasiekti, nes norint, kad būtų tenkinama rezonanso sąlyga, reikia metalo, kurio dielektrinė skvarba yra neigiama. Tam tinkami tik keli metalai: varis, sidabras, auksas. Tokių medžiagų, kurios nepraleidžia spinduliuotės, dielektrinė skvarba yra kompleksinis dydis, kur reali dalis susijusi su dispersija, menama – apibūdina sugertį. Dažnu atveju, paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektroskopijoje naudojami du metalai – auksas

ir sidabras. Jų dielektrinės skvarbos priklausomybė nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio yra pateikta 3 pav. [21].

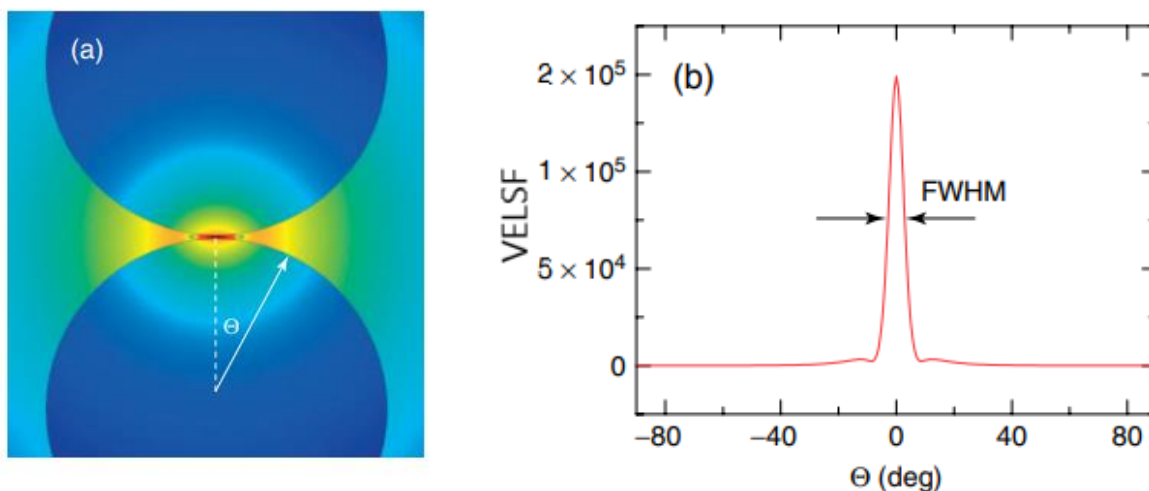


3 pav. Aukso ir sidabro menamos ir realios dielektrinės skvarbos priklausomybė nuo bangos ilgio. (adaptuota pagal [21])

Aukso ir sidabro dielektrinės skvarbos realiosios dalys yra neigiamos bangų ilgių srityje 300 nm – 1000 nm, kaip parodyta 3 pav. Tai yra priežastis, kodėl šie metalai nanodalelėje nepriekaištingai tenkina indukuoto elektrinio dipolio momento rezonanso sąlygą.

Būtina atkreipti dėmesį, kad tiriamą molekulę yra sąveikoje ne su viena nanodalele, o su jų sankaupomis. Svarbu atsižvelgti į efektus, kurie atsiranda dėl šaltinio elektromagnetinės spinduliuotės kritimo į metalo nanodalelių sankaupas. Stiprinimo faktorius priklauso nuo atstumo tarp nanodalelių sankaupose, todėl tai yra vienas iš efektų. Atstumas tarp nanodalelių turi būti labai optimalus, jei siekiama gauti optimalų stiprinimą. Jei tarp nanodalelių esantis atstumas yra labai mažas (<1 nm), dalelės gali uždengti viena kitą ir suformuoti vieną atskirą struktūrą, kuriai atsiradus stiprinimo efektas beveik nestebimas. Tačiau, kai atstumas tarp nanodalelių padidėja iki ~20 nm, stiprinimo efektas mažėja. Toks reiškinys atsiranda dėl indukuotojo dipolio, kurį sukuria lokalus elektrinis laukas ir kuris vis silpnėja, kai atstumas didėja. Didžiausia stiprinimo vertė fiksuojama, kai atstumas tarp nanodalelių yra vos didesnis už vieną nanometrą. Tačiau, kai atstumas yra optimalus, įmanoma stebėti ir kitą efektą, kuris vyksta tyrinėjant nanodalelių sankaupas [21]. Nanodalelių, kurios yra viena prie kitos, indukuotieji elektriniai dipoliai sąveikauja tarpusavyje vienas kitą sustiprindami. Sąveikaudami jų vietiniai elektriniai laukai lygiai taip pat stiprėja ir tarp suminio elektrinio lauko vertė išauga dar stipriau. Toks reiškinys yra vadinamas suporuotų plazmonų rezonansu, kur erdvės sritis, kuomet elektrinio lauko vertė

yra pati didžiausia – vadinama karštuoju tašku (angl. *hot-spot*). Tokio karštojo taško vaizdavimas brėžinyje ir kaip VELSF priklauso nuo kritimo kampo, parodo 4 pav.



4 pav. Karštasis taškas (a); VELSF priklausomybė nuo kampo (b) (adaptuota pagal [21])

#### 4. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos registravimo metodai

Tyrimams yra naudojamos įvairios metodikos, pritaikytos specialioms eksperimentams ir specifinėms molekulėms [22]. Yra trys pagrindinės paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos metodikos [23]. Jos yra skirstomos pagal substratus, kurie naudojami taikant kiekvieną tokių metodikų:

- Šiurkštinto elektrodo paviršius,
- Nanostruktūrizuoti metaliniai paviršiai,
- Koloidiniai nanodalelių tirpalai.

Elektrodo paviršius, substratas, kuris naudojamas paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos elektrocheminiame taikyme. Šiuo metodu (angl. *electrochemical surface enhanced Raman scattering EC-SERS*) įvertinama tiriamų molekulių adsorbcija, kuri reikalinga valdyti keičiant potencialą, kai jis perduodamas į elektrodą. Molekulių adsorbcijos kontrolė užtikrina didesnę eksperimento rezultatų atsikartojamumą. Deja, metodikos pritaikymas yra sudėtingas, nes yra reikalingi tikslūs ir brangūs elektronikos prietaisai, bei reikia gerai išmanyti elektrocheminius procesus. Remiantis tokia metodika registravimas gaunasi lėtas, dėl paties substrato paruošimo (elektrodo šiurkštinimo) proceso, kuris yra sudarytas iš kelių etapų. Dėl sudėtingumo ir ilgo pasiruošimo laiko tokia metodika yra naudojama rečiau nei kitos. Kiti, nanostruktūrizuotų metalinių paviršių substratai yra gaminami metalų garinimo, litografijos, savitvarkių sluoksnių ar kitomis metodikomis [24]. Kadangi gamybos technologijos yra sudėtingos, tokie substratai yra brangūs. Substratai struktūriškai pasikeičia, nes juos paveikia žadinanti lazerinė spinduliuotė. Pasekmė - visiškasis signalo išnykimas arba keletą kartų sumažėjęs signalas. Kita,

gaminamų iš koloidinių nanodalelių tirpalų, substratų grupė yra bene plačiausia, nes literatūroje aprašytų koloidinių tirpalų paruošimo būdų skaičius yra labai didelis. Dažniausiai yra naudojami mišiniai iš bandinio ir koloidinio tirpalo, todėl substratų iš koloidinių nanodalelių tirpalų pagaminimas yra lengvas ir greitas. Substratų paruošimo procedūra yra žymiai lengvesnė ir pigesnė už nanostruktūrizuotų metalinių paviršių substratų ruošimo procedūrą ir trunka ne taip ilgai, kaip elektrodo paviršiaus paruošimas. Galima pasiekti ir viršyti stiprinimo faktorių vertes, kurios gaunamos pasitelkiant nanostruktūrizuotų metalinių paviršių substratus, jei yra naudojami šie substratai. Taip pat, galima paruošti įvairios sudėties, formų ir dydžių nanodaleles. Tai leidžia atitinkamai tokius substratus panaudoti kiekvienai naudojamai spektrų registravimo sistemai. Įmanoma pakeisti ir plazmonų rezonansą tenkinantį bangos ilgį keičiant nanodalelių dydį. Sferinės formos sidabro nanodalelių dydis su plazmonų rezonanso bangos ilgiu susietas empirine (8) formule:

$$d = \sqrt{24,01 + 100(\lambda_{max} - 385)^2} + 4,9 \quad (8)$$

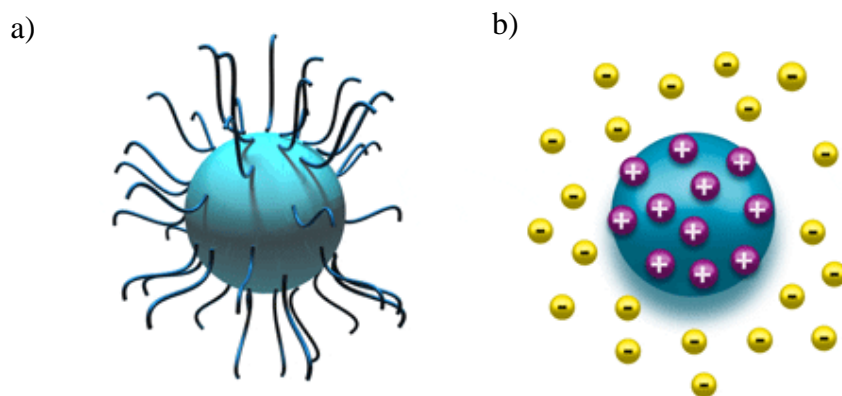
čia  $d$  (nm) – nanodalelės skersmuo,  $\lambda_{max}$  (nm) – bangos ilgis nusakantis koloidinio tirpalo sugerties spektro maksimumo padėtį. Ši kalibracinė kreivė buvo įvertinta iš eksperimentinių duomenų remiantis *Mie* sklaidos teorija [25]. Naudojantis ja yra nagrinėjamos ir optinės nanodalelių savybės. Tokia teorija yra apibrėžiama kaip plokščiosios bangos sklaida sferinėmis dalelėmis. Nanodalelių optinės savybės priklauso nuo kelių veiksnių, tokių kaip nanodalelių medžiagos savybės, nanodalelių dydis, forma, tankis bei atstumas tarp dalelių. Kai keičiama nanodalelių forma, galima pasiekti didesnę stiprinimą. Toks reiškinys yra aiškinamas kaip žaibolaidžio efektas elektrostatikos teorijoje, susijęs su indukuoto dipolio elektrinio lauko jėgų linijų tankiu ir mažesniais už krintančios spinduliuotės bangos ilgį nanodalelės matmenimis.

## 5. Nanodalelių koloidiniai tirpalai

Šio eksperimento metu buvo naudojamas vienos rūšies sidabro nanodalelių koloidinis tirpalas. Tirpalas buvo ruošiamas pritaikius literatūroje pateiktą nanodalelių sintezės metodiką, aprašytą pagal *Lee* ir *Meisel* metodiką.

Nanodalelių sintezės procedūros skirstomos į dvi grupes: taip vadinamosios „iš viršaus žemyn“ (angl. *top-down*) ir „iš apačios aukštyn“ (angl. *bottom-up*) [25]. Pirmosios procedūrų grupės atveju - iš didelių cheminių darinių yra išpjaunamos ar kitu būdu suformuojamos SERS metodikai reikiamo dydžio nanodalelės, o antrosios procedūrų grupės atveju iš paprastesnių ir mažesnių darinių cheminių reakcijų metu yra suformuojamos nanodalelės. Šiame darbe buvo naudojama antroji procedūrų grupė, nes

nanodalelės buvo formuojamos iš mažesnių cheminių darinių, jonų, kurie yra vandeniniame tirpale, į didesnius darinius vykstant oksidacijos–redukcijos reakcijoms. Taip yra suformuojamos norimo dydžio ir formos metalo nanodalelės. Koloidinių tirpalų stabilumą lemia nanodalelės, kurios gali agreguotis ir sudaryti nemažus spiečius arba vėl skilti į smulkesnes dalis [25]. Galima to išvengti stabilizuojant nanodaleles sterinės arba elektrostatinės stabilizacijos metodais. Sterinė stabilizacija gaunama prijungus prie nanodalelių paviršiaus ilgų grandinių polimerus, vadinamus surfaktantais. Elektrostatiškai daleles galima stabilizuoti prie jų paviršių prikabinant skirtingus jonus. Tada tie jonai išsidėsto aplink daleles, o jų apvalkalai turintys tą patį krūvį dėl elektrostatinės stūmos jėgų nesuteikia galimybės dalelėms priartėti vienai prie kitos. Štai ši stabilizacija vadinama mechaniniu izoliavimu, o patys, iš surfaktantų sudaryti nanodalelių apvalkalai, nereaguoja tarpusavyje, dėl to tirpale nanodalelės nesąveikauja vienos su kitomis. Abiejų nanodalelių stabilizacijos metodai yra pateikti 5 pav.

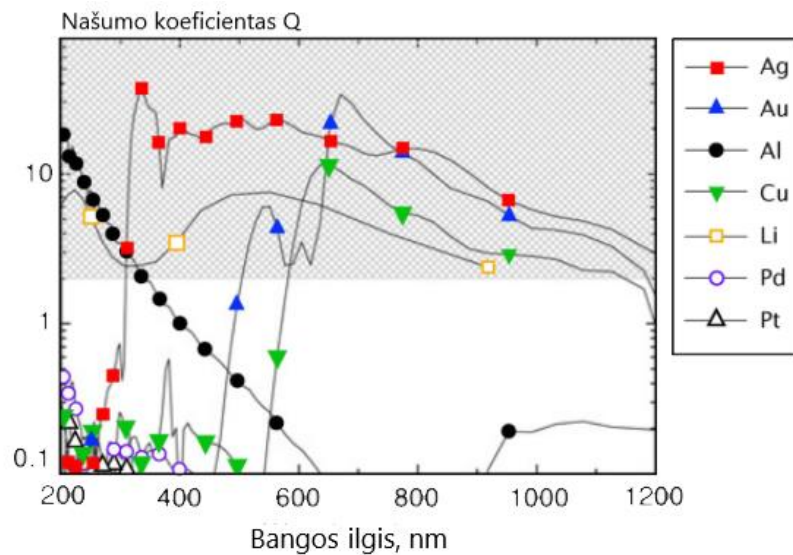


5 pav. Sterinės (a) ir elektrostatinės (b) nanodalelių stabilizacijos metodai koloidiniuose tirpaluose (adaptuota pagal [25])

Nanodalelės turi unikalių optinių savybių, nes sugeba sužadinti lokalizuotą paviršiaus plazmonų rezonansą (angl. *localized surface plasmon resonance* – LSPR). Tai medžiagos, kurios turi neigiamą realią ir mažą teigiamą menamą dielektrinę konstantą. Šis rezonansas – tai koherentiniai metalo paviršiaus elektronų virpesiai, sužadinti krintančios šviesos, kurios bangos ilgis sutampa su virpesių dažniu. Tai sąlygoja ypač stiprų šviesos išbarstymą ir absorbciją, todėl medžiagos, pasižyminčios LSPR, gali būti naudojamos paviršiaus sustiprintoje Ramano spektroskopijoje, tyrinėjant biochemines ir chemines sąveikas. Nuo dalelių dydžio ir formos priklauso LSPR juostos padėtis, aptinkama plačioje spektrinėje dalyje, regimosios šviesos ir artimų ultravioletinių (UV) diapazone. Sidabro nanodalelėms LSPR galima aptinkti 300 – 1200 nm spektro dalyje.

Paviršiaus plazmonų rezonansas gali susidaryti paviršiuose, kurie pasižymi elektriniu laidumu ir gali rezonuoti prie atitinkamo bangos ilgio. Regimosios ir NIR šviesos regionuose SPR sudaro Ag, Au, Cu, Li ir Al [18]. Naudojimui plazmonikoje yra svarbu pasirinkti metalą, kuris gali sudaryti stiprų SPR prie tam tikro bangos ilgio. SPR stiprumui įvertinti yra įvedamas našumo koeficientas  $Q$  [26]: didelės  $Q$

reikšmės reiškia sudaromus stiprius paviršiaus plazmonų rezonansus, mažos reikšmės – silpnus. Daugeliui plazmoninių panaudojimų  $Q$  turėtų būti didesnis nei  $\sim 10$ . Metalų, galinčių sukelti LSPR, našumo koeficientai prie skirtingų bangos ilgių yra sužymėti 6 pav. Matyti, kad metalų, kurie per didesnę bangos ilgių intervalą išlieka pilkoje zonoje, kokybės faktorius yra didžiausias. Sidabras pasižymi itin stipriu LSPR ir turi didelį našumo koeficientą atitinkamoje spektro dalyje nuo 300 iki 1200 nm.



6 pav. Metalų LSPR našumo koeficientai. Tamsioje srityje parodyti naudojimui tinkamiausi  $Q$ .  
(adaptuota pagal [26])

## II. Eksperimentas

### 1. Koloidinio tirpalo ruošimui naudoti prietaisai ir medžiagos

Koloidinio tirpalo paruošimui naudojami šie prietaisai: pipetė (*Eppendorf*), magnetinė maišyklė su kaitinamuoju pagrindu (*Thermo scientific*, „*Cimaerac*“), laboratorinės elektroninės svarstyklės (*Ohaus*, „*Pioneer*“), ledo vonelė, stikliniai indai.

Medžiagos ir iš jų pagaminti tirpalai, kurie buvo naudojami koloidinių tirpalų paruošimui: distiliuotas vanduo, trinatrio citratas ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), (*Sigma-Aldrich*), sidabro nitratas ( $\text{AgNO}_3$ ), (*Sigma-Aldrich*).

Tirpalas buvo ruošiamas pritaikius literatūroje pateiktą nanodalelių sintezės metodiką. Sferinių nanodalelių koloidinis tirpalas darbo metu buvo ruošiamas pagal metodiką, aprašytą *Lee* ir *Meisel* [28]. Pirmiausia 50 ml distiliuoto vandens įpilama į tuščią stiklinį indą, jame ištirpinama 9 mg sidabro nitrato. Tuomet indas su  $5 \cdot 10^{-3}$  M sidabro nitrato tirpalu dedamas ant magnetinės maišyklės su kaitinamu pagrindu, kur greitai maišant sušildomas iki virimo temperatūros. Kaitinimo metu stiklinį indą geriau laikyti uždarytą, kad tirpalas neišgaruotų. Kuomet tirpalas pradeda virti, pipetės pagalba į indą su tirpalu įlašinama 1 ml iš anksto paruošto 1% trinatrio citrato tirpalo. Šio metodo pagalba trinatrio citratas stabilizuoja metalo nanodaleles elektrostatiškai. Pagaminus tirpalą, paliekamas kelioms valandoms virti, kol tirpalas įgauna žalsvai pilką spalvą. Tada stiklinis indas su nanodalelių koloidiniu tirpalu nuimamas nuo magnetinės maišyklės yra patalpinamas į ledinio vandens vonelę ir atvėsinamas iki kambario temperatūros. Kol nenaudojamas, tirpalas laikomas šaldytuve, kad būtų sulėtinti sidabro nanodalelių struktūriniai pokyčiai ir kad kuo ilgiau pavyktų išlaikyti dalelių tinkamumą Ramano sklaidos signalo stiprinimui.

### 2. Koloidinių sidabro nanodalelių tirpalo centrifugavimas

Pagal šiame darbe aprašytą metodą ruošiamam koloidiniam tirpalui reikia naudoti mažos koncentracijos tirpalą, nes suformuotų sidabro nanodalelių koncentracija jame yra labai nedidelė. Tai daro įtaką SERS signalo stiprinimo faktoriui, nes nanodalelių sankaupoms būdingi specifiniai efektai, tokie kaip suporuotų plazmonų rezonansas, kuris pasireiškia nedažnai. Siekiant išmatuoti koloidinio tirpalo sugertį, reikia padidinti sidabro nanodalelių koloidinio tirpalo koncentraciją. Atitinkamas kiekis (apie 20 – 30 ml) paruošto nanodalelių tirpalo centrifuguojamas apie 10 minučių, sukant 9000 apsisukimų per minutę greičiu, veikiant dalelių išcentrine jėga. Šiame darbe tai buvo atliekama naudojant centrifugą *Centrifuge 5804* (*Eppendorf*). Centrifuguojant dėl išcentrinės jėgos nanodalelės kaupiasi ant indo dugno. Tuomet skaidrus paviršiuje likęs mažos koncentracijos tirpalas (supernatantas) lėtai nupilamas, o sukonzentruotas likęs tirpalas naudojamas sugerties matavimams.



### **3. Koloidinio tirpalo sugerties spektrai**

Ekspimento metu ruošto sidabro nanodalelių koloidinio tirpalo charakterizavimui buvo nagrinėjamas šio tirpalo sugerties spektras 250 nm – 1100 nm srityje. Sugerties matavimui tirpalas buvo ruošiamas iš šviežiai pagaminto, centrifuguoto koloidinio nanodalelių tirpalo. Distiliuotu vandeniu 2:1 (vanduo:tirpalas) santykiu tirpalas yra praskiedžiamas. Analizuojant užregistruotą spektrą, buvo įvertinamas sugerties juostos maksimumo bangos ilgis, kuris atitinka plazmonų rezonanso bangos ilgį.

### **4. Bandinių ruošimas**

Šlapimo pūslės nuoplovos SERS spektriniais tyrimams surinktos plaunant šlapimo takus fiziologiniu tirpalu (prieš biopsiją) ir buvo perduotos spektrinei analizei iš karto jas gavus. Visos šlapimo pūslės nuoplovos, kurių analizė buvo atlikta darbo metu, buvo gautos iš Vilniaus universiteto Santaros klinikų.

Bandinio paruošimo procedūra tokia: pipete ant aliuminio folija dengtos stiklinės plokštelės užlašinamas mažas šlapimo pūslės nuoplovos lašas. Toks plokštelės paviršius buvo ruošiamas todėl, kad aliuminis gerai atspindi infraraudonąją spinduliuotę, krintančią į ją. Taip pat, aliuminio paviršius yra hidrofobinis, dėl to koloido tirpalo lašelis neišsiplečia. Prieš paruošiant nanodalelių sluoksnius ant aliuminiu padengto stiklo, pagrindas buvo nuvalomas metanolio, kad būtų pašalintos nusėdusios dulkės, pirštų antspaudai ar kiti nešvarumai, nugulę ant aliuminio folijos paviršiaus. Tuomet bandinys paliekamas išdžiūti kambario temperatūroje, užlašinamas koloidinio tirpalo lašas ir taip pat išdžiovinamas. Taip substrato paviršiuje susidaro ovalo formos bandinys, kurio kraštuose registruojamas sustiprintos Ramano sklaidos spektras.

### **5. Prietaisai spektrų registravimui**

Paruošto sidabro nanodalelių koloidinio tirpalo sugerties spektras UV-VIS srityje buvo registruojamas spektrofotometru Lambda 1050 (*Perkin Elmer*). Spektrofotometre naudojamas spinduliuotės šaltinis – halogeninė lempa, o signalas užregistruojamas PMT (fotodaugintuvo) jutikliu, kurio jautrumo sritis ties 175 nm – 860 nm. Matavimo metu koloidinis tirpalas buvo talpinamas į 5 mm storio kvarcinio stiklo kiuvetę. Spektras buvo registruojamas 250 nm – 1100 nm spektrinėje srityje, kur spektrinė skyra 5 nm.

SERS spektrai buvo registruojami Furjė vaizdavimo (angl. *Fourier Transform* – FT) Ramano spektrometru MultiRAM (*Bruker*). Ramano sklaidos signalo žadinimui bandinio vieta parenkama naudojantis motorizuotu bandinių staleliu, kurio judėjimą galima kontroliuoti programiškai arba

mechaniškai. Eksperimentų metu naudojama 1064 nm (Nd:YAG) bangos ilgio lazerinė spinduliuotė. Ramano sklaidos žadinimui ir surinkimui naudojama  $180^\circ$  laipsnių geometrija. Lazerinė spinduliuotė fokusuojama ir surenkama veidrodiniu objektyvu. Objektyvo priedėlyje yra kamera (CCD jutiklis), kuria stebimas bandinys ir parenkama bandinio paviršiaus vieta, kurioje žadinama Ramano sklaida. Registravimo metu parinkta  $4 \text{ cm}^{-1}$  skyra. Norint padidinti signalo ir triukšmo santykį visi spektrai buvo vidurkinami. Kiekvienas iš spektrų buvo registruojamas 200 kartų (angl. 200 *scans*), o gautieji rezultatai vidurkinami.

### III. Statistinės analizės metodai

#### 1. Hierarchinė klasterių analizė

Hierarchiniai klasterizavimo metodai – tai tokie klasterizavimo metodai, kuriais nustatoma bendra visų klasterių tarpusavio priklausomybių struktūra. Šis metodas dažnai pateikiamas grafiškai naudojant tam tikrą diagramą, vadinamą dendrograma, kuri parodo kiekvieno iš klasterių sąryšį bei tvarką, kuria klasteriai buvo sujungti. Išskiriami keli pagrindiniai svarbiausi klasterizavimo etapai: klasterizavimo objektų parinkimas; požymių, pagal kuriuos objektai bus klasterizuojami apibrėžimas, panašumo mato nustatymas, objektų suskirstymas į klasterius ir gauto rezultato analizavimas. Objektų panašumo matai taip pat gali būti keli tipų. Dažniausiai naudojami yra metriniai atstumo matai, koreliacijos ir asociatyvumo koeficientai.

Metodikos tikslumas diagnozuoti vėžinius atvejus buvo nustatytas atlikus klasterinę darbo metu užregistruotų spektrų analizę. Ši analizė buvo atlikta naudojantis programoje OPUS įdiegta klasterinės analizės funkcija. Spektrų duomenys buvo analizuojami naudojant Ward algoritmą. Naudojant šį algoritmą, analizės pradžioje kiekvienas narys yra laikomas kaip atskira grupė (klasteris). Tada analizuojamų narių grupės yra jungiamos į didesnes grupes taip, kad būtų minimizuotas kvadratinis klaidos kriterijus (angl. *sum of the squared error* - SSE). Kvadratinis klaidos kriterijus aprašomas tokia lygtimi:

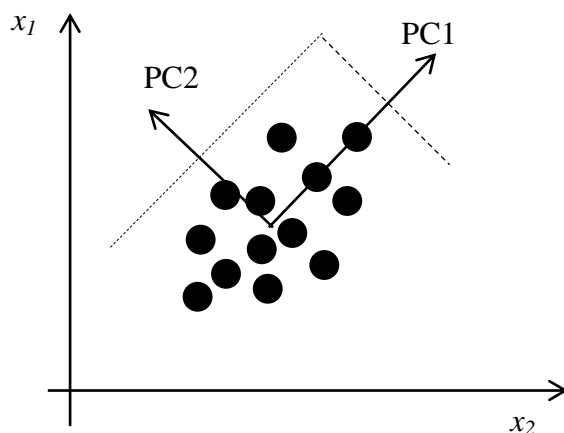
$$SSE = \sum_{j=1}^K \sum_{x_i \in c_j} dis(c_j, x_i)^2 \quad (9)$$

kur  $K$  – grupių (klasterių) skaičius,  $C_j$  – viena iš grupių,  $c_j$  – jos centras,  $x_i$  – objektas, esantis grupėje,  $dist(c_j, x_i)$  – Euklidinis atstumas tarp objekto ir klasterio centro. Analizė baigiama, kai visos grupės yra sujungiamos į vieną bendrą grupę.

#### 2. Pagrindinių komponentių analizė

Pagrindinių komponentių analizė (PCA - *Principal Component Analysis*) yra naudojama, norint sumažinti duomenų dimensiškumą ir kuo didesnę dispersiją, juos tiesiškai transformuojant bei atmetant gautus komponentus, kurių maža dispersija [29]. Pagrindinė šios analizės idėja yra sumažinti duomenų skaičių atliekant tiesinę transformaciją, kuri padeda atmesti dalį po transformacijos atsiradusių kitų komponentių, su maža dispersija. Pirmiausia ieškoma kryptis, kur dispersija yra didžiausios vertės. Tokia kryptis yra vadinama pirmąja pagrindine komponente. Ji eina per centrinį duomenų tašką. Visų taškų vidutinis atstumas iki šios tiesės yra minimalus, t. y. ši tiesė yra kiek galima arčiau visų duomenų taškų.

Antrosios pagrindinės komponentės ašis taip pat eina per centrinį duomenų tašką ir yra statmena pirmajai. Lyginant su kitais metodais, PCA dimensijų kiekį sumažina greičiausiai, tačiau šiuo metodu galima atlikti tik tiesines transformacijas.



7 pav. Pagrindinių komponentių analizės principinė schema

Ši analizė buvo atlikta naudojantis programoje QUASAR įdiegta PCA analizės funkcija [37]. Algoritmo vykdymo metu iš duomenų sudaroma kovariacinė matrica, iš kurios apskaičiuojami tikrinės reikšmės ir vektoriai. Iš surūšiuotų tikrinių vektorių gaunama pagrindinių komponentių matrica. Pagrindinių komponentių matrica paprastai sudaroma iš atitinkamo kiekio tikrinių vektorių, dažniausiai turinčių didžiausias tikrines reikšmes, nes kiti tikriniai vektoriai turi pernelyg mažą įtaką rezultatui.

### 3. K-vidurkių analizė

K-vidurkių metodas – nehierarchinis klasterizavimo metodas, taikomas, kai klasterių skaičius yra iš anksto žinomas arba parenkamas. Šį klasterizavimo metodą galima laikyti ir kvadratinės paklaidos algoritmu, nes jis minimizuoja kvadratinę paklaidą. Kvadratinė paklaida vienam klasteriui ( $K_i$ ) yra Euklido atstumų tarp kiekvieno klasterio elemento ir klasterio centro ( $C_i$ ) kvadratų suma:

$$E_{K_i} = \sum_{j=1}^{\mu_i} \|X_i^j - C_i\|^2 \quad (10)$$

Kvadratinė paklaida klasterių aibei  $K = \{K_1, K_2, \dots, K_K\}$  apskaičiuojama pagal formulę:

$$E_K = \sum_{i=1}^K E_{K_i} \quad (11)$$

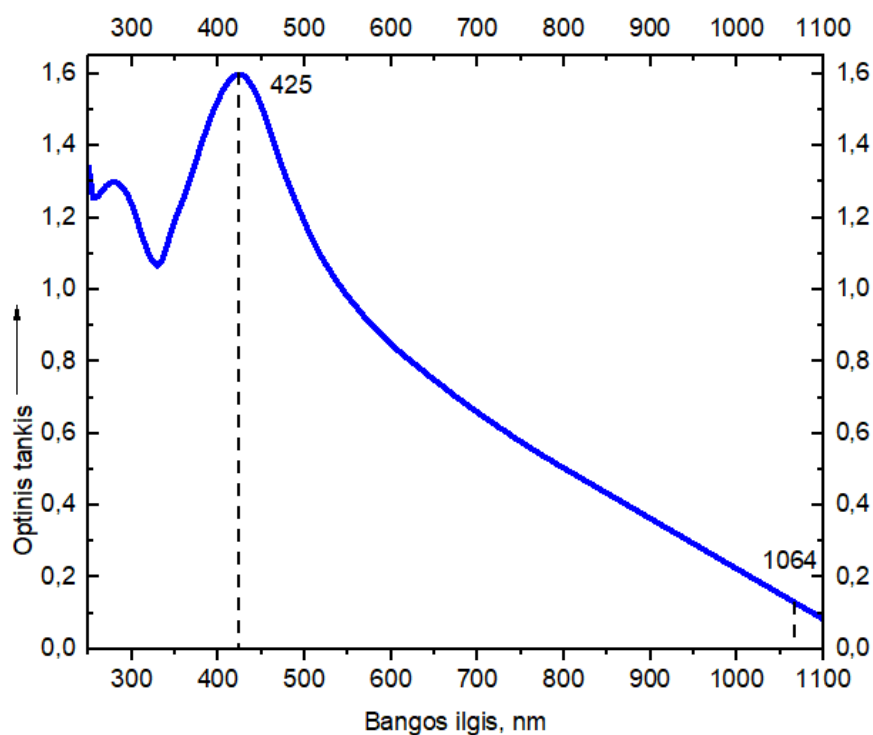
Naudojant K-vidurkių metodą, iš pradžių visi tiriamieji objektai yra sugrupuojami į k pagrindinių klasterių, tuomet apskaičiuojamas kiekvieno objekto atstumas iki klasterių centrų (Euklido atstumas). Kiekvienas analizuojamų duomenų aibės objektas priskiriamas tam klasteriui, iki kurio centro atstumas

yra mažiausias. Tada pagal formulę (11) perskaičiuojami kiekvieno klasterio centrai ir suskaičiuojama kvadratinė paklaida. Veiksmai kartojami, kol kvadratinės paklaidos reikšmė tampa mažesnė už pasirinktą slenkstinę reikšmę arba objektai nebepersiskirsto kitiems klasteriams. Svarbu paminėti, kad Euklidinių atstumų skaičiavimas yra ne vienintelis, o tik vienas iš galimų algoritmų šiam metodui. Ši analizė buvo atlikta naudojantis programoje QUASAR įdiegta K-vidurkių analizės funkcija [38].

## IV. Rezultatai

### 1. Koloidinis sidabro nanodalelių tirpalas

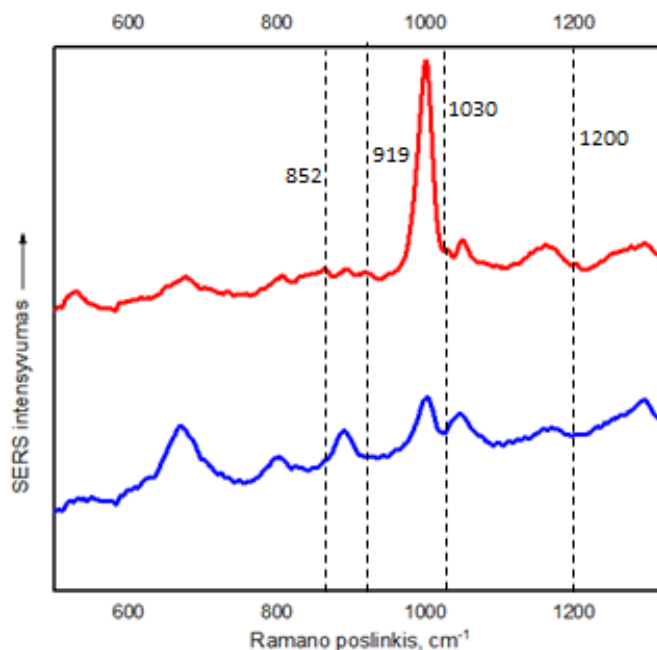
Paruošto ir naudoto sferos formos sidabro nanodalelių koloidinio tirpalo sugerties spektras buvo užregistruotas UV-VIS srityse. Koloidinio sidabro nanodalelių tirpalo UV-VIS sugerties spektrinės juostos maksimumo vieta yra ties  $\lambda = 425$  nm (8 pav.). Pagal formulę (8) apskaičiuotas sferinės formos nanodalelių skersmuo  $d = 68,5$  nm. Galima matyti, kad sugertis ties 1064 nm yra maža ir artima, bet nelygi nuliui. Dėl šios priežasties registruojant SERS spektrus ir naudojant šį bangos ilgį yra stebimas stiprinimas. Taip pat galima išvengti liuminescencijos, kas yra dažna problema, kai naudojami kiti bangos ilgiai. Taigi UV-VIS sugertis ne tik leidžia paskaičiuoti dalelių dydį, bet ir parodo kurioje spektro srityje galima tikėtis didžiausio SERS efekto.



8 pav. Sidabro formos nanodalelių koloidinio tirpalo, sugerties spektras registruotas UV-VIS srityje

## 2. Mokslo tiriamoji darbo I-II dalyje atlikti tyrimai

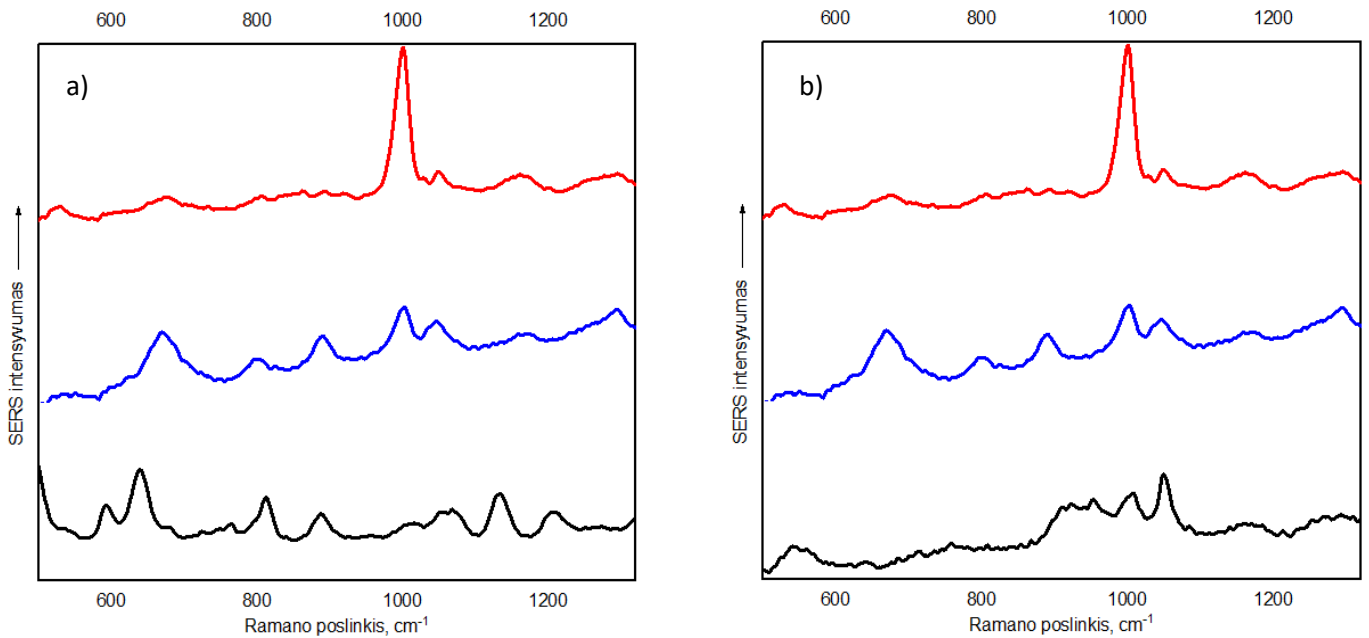
Mokslo tiriamoji darbo I dalyje, buvo atlikti eksperimentai, kurių metu, buvo užregistruoti 33 skirtingų pacientų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai. Skirtingų pacientų vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai yra pateikti 9 pav.



9 pav. 33 skirtingų pacientų vėžinių (raudona) ir nevėžinių (mėlyna) šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai

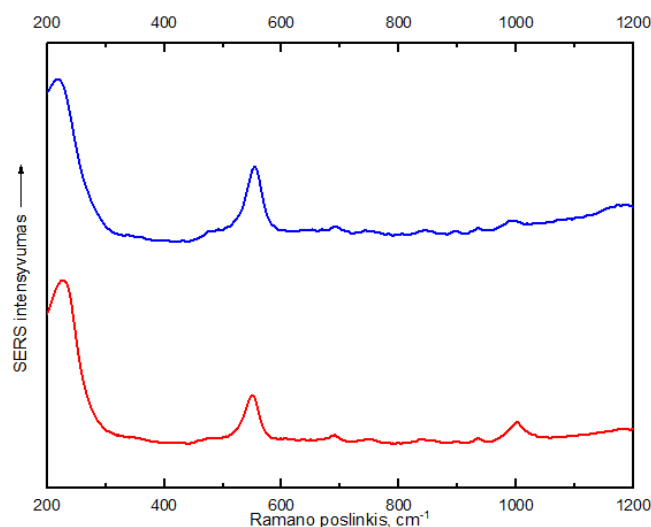
Darbo metu atlikus skirtingų pacientų vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų užregistruotų SERS spektrų analizę buvo pastebėta, kad SERS spektrinės juostos, esančios atitinkamai ties 852 cm<sup>-1</sup>, 919 cm<sup>-1</sup>, 1030 cm<sup>-1</sup> ir 1200 cm<sup>-1</sup> gali būti tinkamos šlapimo pūslės vėžio identifikacijai. Buvo nustatyta, kad atlikus šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų statistinę analizę, duomenis tinkamai suskirsčius į klases, galima pastebėti aiškius skirtumus tarp vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų. Tačiau tikslesnei analizei reikalinga didesnė duomenų apimtis.

Užregistravus visus šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrus ir ieškant vėžiui būdingų žymenų, buvo svarbu įsitikinti, kad matomi atitinkami pasikartojantys virpesiai nebūtų būdingi paties šlapimo ar šlapimo rūgšties spektrams. Buvo atlikti matavimai, kurių metu užregistruoti šlapimo rūgšties ir karbamido SERS spektrai. Jie pateikti 10 pav., kartu su vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrais. Galima pastebėti, kad prieš tai aptarti ir identifikuoti spektriniai vėžio žymenys nėra būdingi nei karbamido, nei šlapimo rūgšties SERS spektrams



10 pav. a) Šlapimo pūslės nuoplovų spektrai: vėžinis (raudonas), nevėžinis (mėlynas) ir šlapimo rūgštis (juodas); b) šlapimo pūslės nuoplovų spektrai: vėžinis (raudonas), nevėžinis (mėlynas) ir karbamidas (juodas)

Atliekant tyrimus, visų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų registravimui buvo naudojamas sidabro nanodalelių koloidas pagamintas pagal *Lee* ir *Meisel* metodiką. Keliems iš bandinių, matavimai buvo pakartoti, panaudojus kitą, sidabro nanodalelių koloidinį tirpalą su magnetinėmis savybės. Tai hibridinės geležies-sidabro nanodalelės, kurios buvo gautos cheminiu būdu ant geležies nanodalelių lazerinio abliavimo metu nusodinus sidabro nanodaleles. Spektus, gautus naudojant šį koloidinį tirpalą, galima matyti 11 pav. Koloidas turi intensyvią savo juostą ties  $550\text{ cm}^{-1}$ , o patys spektriniai skirtumai tarp vėžinio ir nevėžinio šlapimo pūslės nuoplovų spektrų - nedideli.



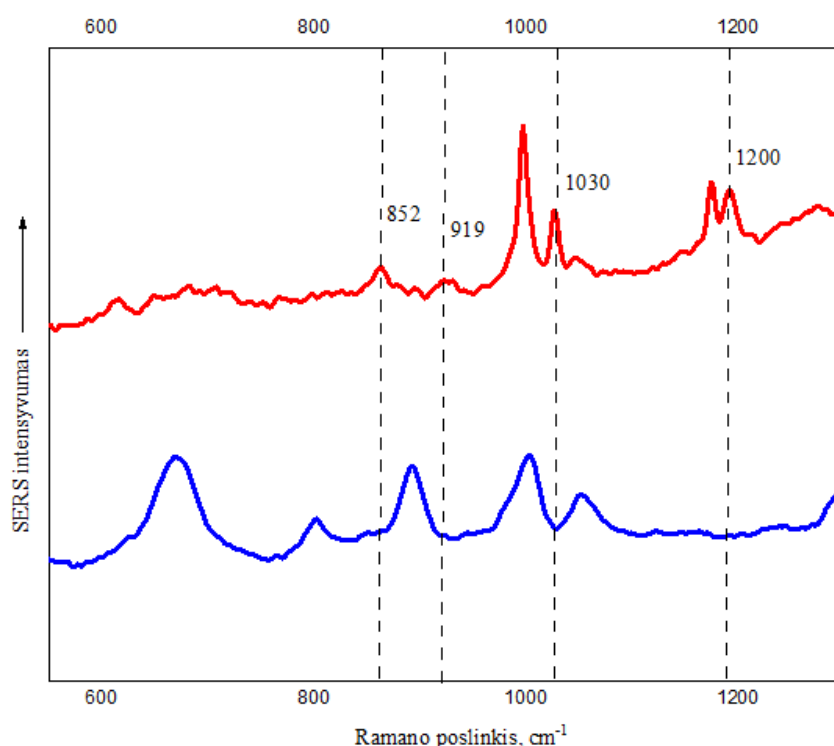
11 pav. Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai naudojant sidabro nanodalelių koloidinį tirpalą su magnetinėmis savybėmis: vėžinis (raudona), nevėžinis (mėlyna)



### 3. SERS spektriniai rezultatai

#### 3.1 Šlapimo pūslės nuoplovų tyrimai

Eksperimento metu, norint įsitikinti, kad spektriniai skirtumai yra neatsitiktiniai ir galima pagal juos identifikuoti šlapimo pūslės vėžį, buvo užregistruoti 48 skirtingų pacientų šlapimo pūslės nuoplovų (12 vėžinių, 36 nevėžinių) SERS spektrai. Darbo metu užregistruotų pacientų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai buvo suvidurkinti, kad būtų galima įsitikinti, jog charakteringų žymenų atsikartojamumas nėra atsitiktinis. Spektrų vidurkinimas taip pat buvo naudojamas padidinti signalo ir triukšmo santykį, nes tada spektrus lengviau analizuoti, išryškėja esminiai spektrų skirtumai ir panašumai, ypač jei spektrinės juostos yra mažo intensyvumo. Suvidurkinti spektrai yra pateikti 12 pav



12 pav. Suvidurkinti vėžinių (raudona) ir nevėžinių (mėlyna) šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai

Remiantis literatūros šaltiniais [30-36] atliktas spektrinių juostų, stebimų SERS priskyrimas, kuris yra pateikiamas 1 lentelėje.

1 lentelė. Virpesinės juostos, stebimos SERS spektruose.

Virpesinė juosta cm <sup>-1</sup>	Normalieji virpesiai	Molekulė	Literatūra
590	Amide IV	Baltymai	[30, 31]
625	δ(C-C)	Fenilalaninas	[30]
669	ν(C-S) δ(C-C)	Cistinas Fenilalaninas /Tirozinas	[31, 32]

675	$\nu(\text{C-S})$	Cistinas	[30, 32]
740	Žiedo virpesys	Timinas	[30, 32, 33]
757	-	Citozinas, baltymai	-
800	$\nu(\text{C-C})$	Kolagenas	[32]
825	Žiedo virpesys	Tirozinas	[32, 33]
<b>852</b>	$\nu(\text{C-C})$	Tirozinas	[32, 33]
888	$\delta(\text{C-O-H})$	D-Galactosamine	-
893	$\delta(\text{C-C}), \delta(\text{C-O})$	Riebalų rūgštys	[31]
<b>919</b>	$\nu(\text{C-C})$	Baltymai, sacharidai	[30, 31]
1000	$\nu(\text{C-C}),$ žiedo kvėpavimas	Fenilalaninas, triptofanas	[33, 36]
<b>1030</b>	$\delta(\text{C-H})$	Fenilalaninas	[31, 32]
1050	$\nu(\text{C-O}), \nu(\text{C-N})$	Baltymai	[30, 31]
1090	$\nu(\text{C-N})$	D-Mannose, fosfolipidai	[34]
1101	-	Polipeptidai	[33]
1165	-	Citozinas, guaninas	[30, 33]
<b>1200</b>	$\nu(\text{C-C6-H5})$	Fenilalaninas	[31, 32]
1253	Amide III	Baltymai	[31]
1293	-	-	-
1326	$\nu(\text{CH})$	Baltymai	[30, 31]
1352	-	Cholesterolis ir jo esteriai CH <sub>3</sub> grupės adozinas	[32]
1370	$\nu(\text{C-N})$	Guaninas, citozinas	[34]
1418	$\nu(\text{C-H})$	-	[34]
1459	$\delta(\text{C-H})$	Kolagenas, lipidai	[30, 31]
1495	$\delta(\text{C=C}), \nu(\text{C-H})$	-	[35]
1589	$\nu$ (žiedo virpesys)	Fenilalaninas	[30]
1688	Amide I	Baltymai	[30, 33]

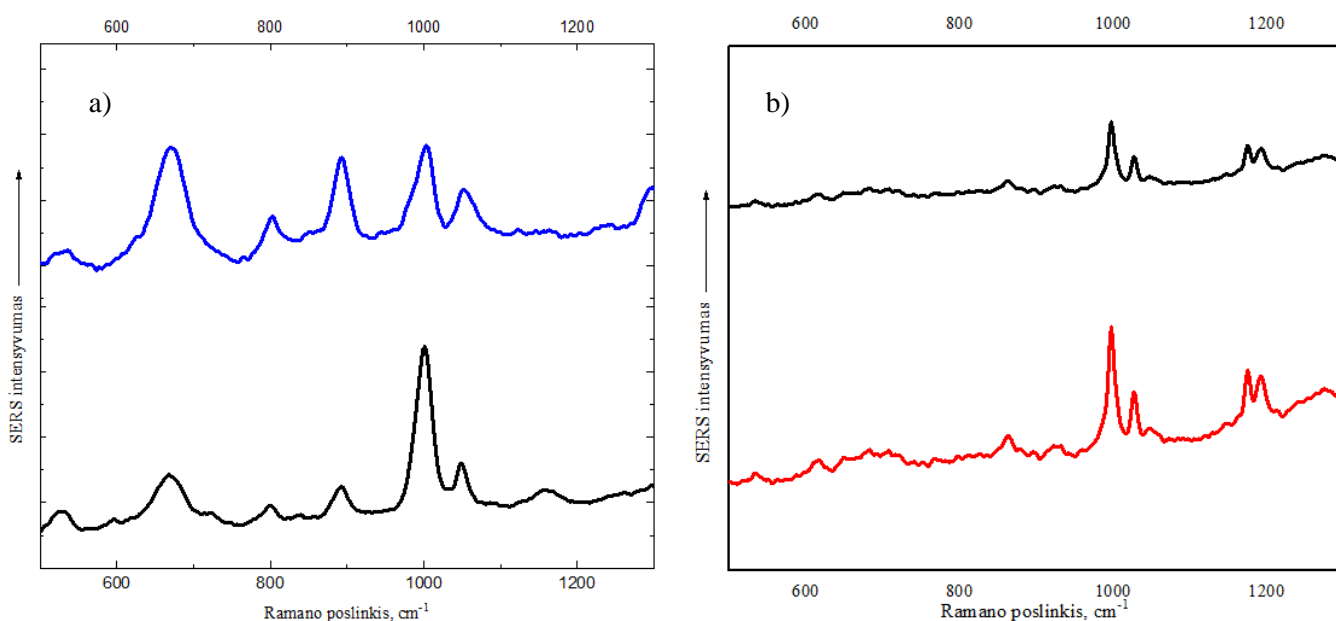
Šio eksperimento metu užregistruotuose pacientų vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose, tarpusavyje juos lyginant, buvo rasti keturi esminiai skirtumai – tai spektrinės juostos nestebimos iš nevėžinių ir stebimos iš vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose. Pagal 1 lentelėje išskirtus žymenis nustatyti skirtumai, matomi visuose bandiniuose, kurie buvo paruošti iš vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų, spektruose. Pastebėta, kad vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose matoma intensyvi spektrinė juosta ties  $852 \text{ cm}^{-1}$ , bet nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose ji nėra stebima. Ši spektrinė juosta gali būti siejama su tirozinu ir jo virpesiais.

Kitas virpesinės juostos intensyvumo skirtumas siejamas su baltymų ir sacharidų spektrine juosta. Vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektruose matomos intensyvios virpesinės juostos, atsirandančios ties

919  $\text{cm}^{-1}$ , tačiau nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektruose, pastarosios juostos nėra arba stebima itin silpno intensyvumo.

Trečiasis ir ketvirtasis pastebėti virpesinių juostų intensyvumų skirtumai ties 1200  $\text{cm}^{-1}$  ir 1030  $\text{cm}^{-1}$  gali būti siejami su fenilalanino virpesiais. Vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektruose matoma nedidelio intensyvumo virpesinė juosta, tačiau nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektruose, šios juostos visai nėra stebimos.

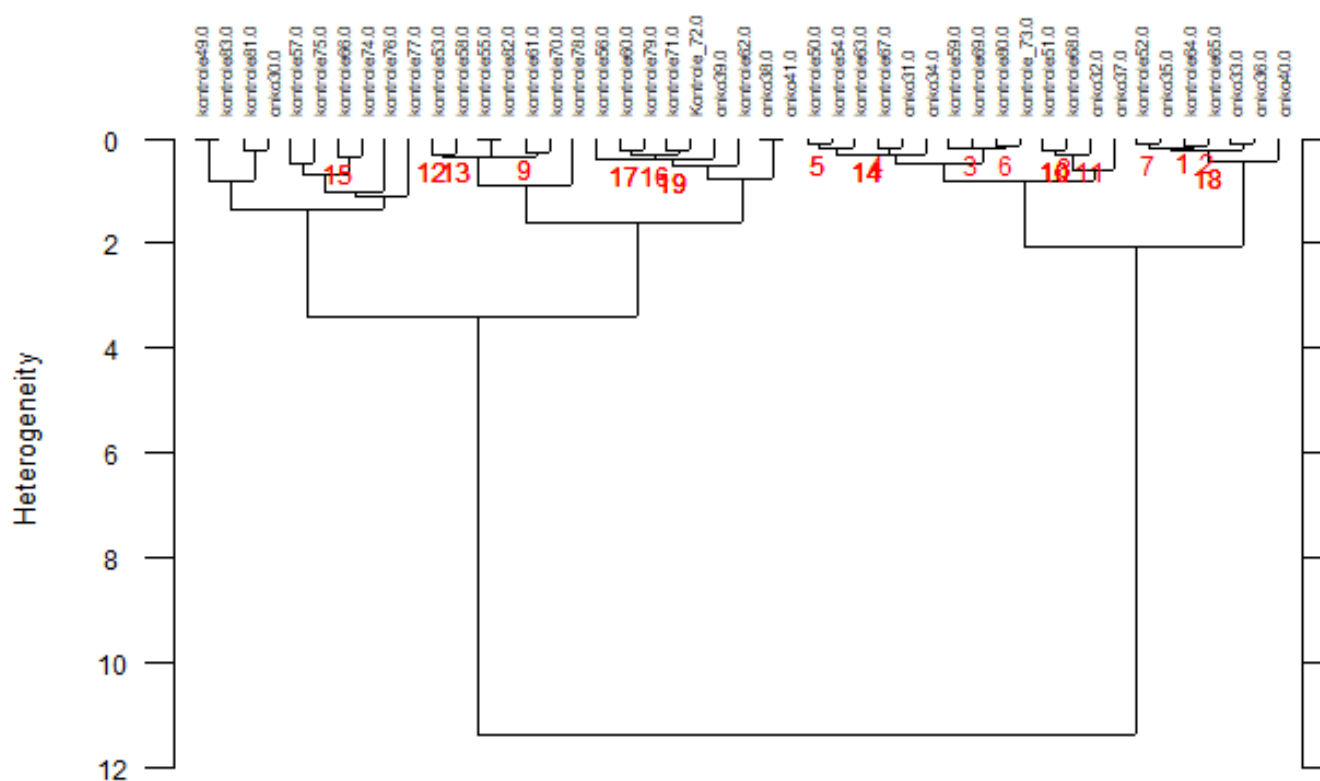
Šio eksperimento metu, buvo užregistruoti 12 skirtingų pacientų vėžinių ir 36 nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai, kurių keletas yra pateikti 13 pav. Pateiktuose analizės rezultatuose pastebima, kad yra nežymių skirtumų tarp tirtų pacientų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų. Tačiau galima matyti, kad vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose stebimi pagrindiniai žymenys, identifikuoti ankstesniame suvidurkintame spektre (12 pav.) ir nestebimi nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektruose. Visuose vėžinių pacientų šlapimo pūslės nuoplovų bandiniuose matoma būdinga spektrinė juosta ties 1030  $\text{cm}^{-1}$ . Nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektruose sumažėja spektrinės juostos 1000  $\text{cm}^{-1}$  intensyvumas, tačiau kelių atskirų pacientų nevėžiniuose bandiniuose ji taip pat išlieka intensyvi ir iš pirmo žvilgsnio spektras atrodo panašus į vėžinį. Ši juosta gali būti priskiriama baltymui fenilalaninui, kurio virpesiai gali būti stebimi ir vėžinių, ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektruose. Gerai išanalizavus – pagrindinės spektrinės juostos, identifikuotos suvidurkintuose spektruose yra stebimos ir atskirų pacientų vėžiniuose ir nevėžiniuose spektruose, todėl tai leidžia daryti išvadą, kad spektriniai vėžio žymenys buvo priskirti tinkamai ir nėra atsitiktiniai.



13 pav. Skirtingų pacientų a) nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai ir b) vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai

### 3.2 Statistinė analizė

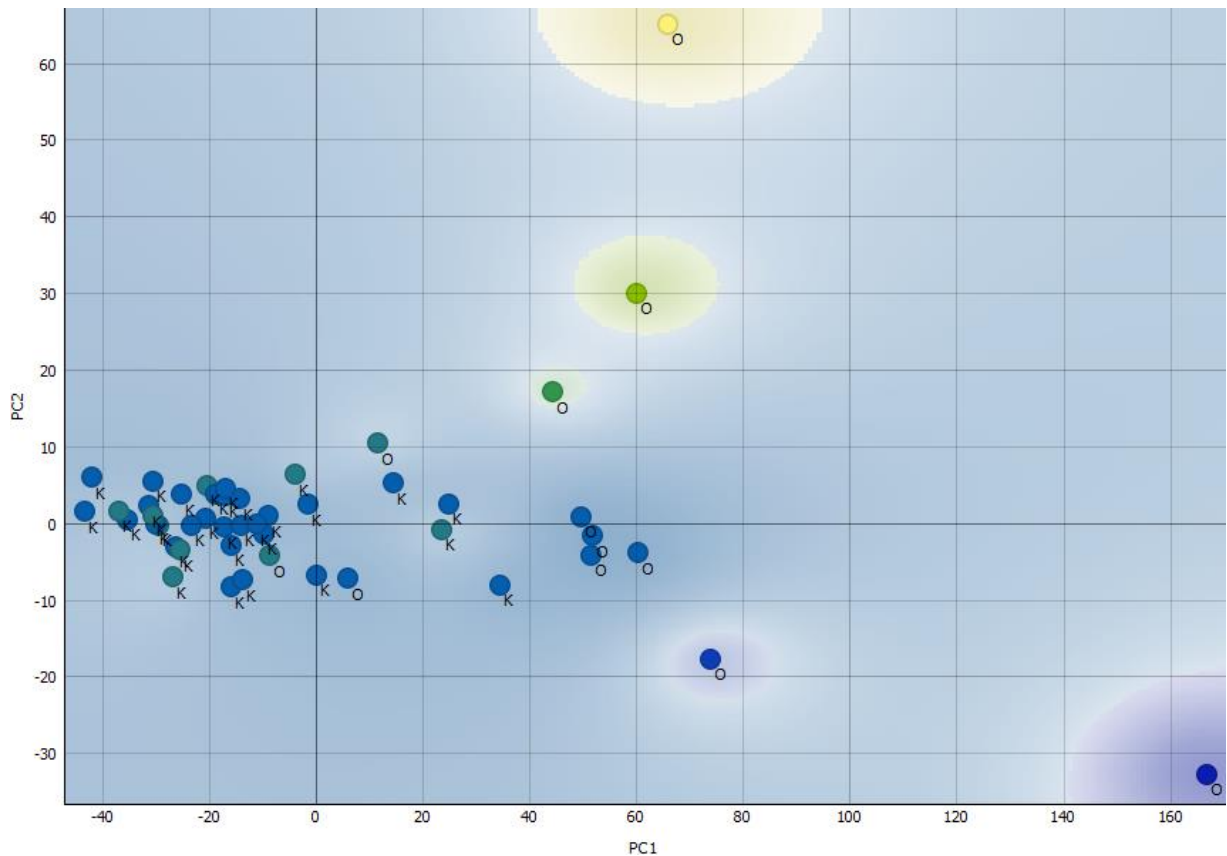
Šio darbo metu, užregistravus visus šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrus, juos lyginant, buvo svarbu patikrinti, ar pasirinktas vėžio diagnostavimo būdas yra tikslus ir spektrinių juostų specifiškumas nėra atsitiktinis. Tam buvo atliekama statistinė užregistruotų spektrų analizė, kuri padėjo duomenis sugrupuoti ir įsitikinti, kad vėžiniai ir nevėžiniai šlapimo pūslės nuoplovų spektrai gali būti naudojami šios ligos diagnostavimui. Pirmasis metodas – hierarchinė klasterių analizė, kurios rezultatai pateikti 14 pav.



14 pav. 48 spektrų hierarchinės klasterių analizės rezultatai, intervale 350 – 1400  $\text{cm}^{-1}$ . (Trumpiniu „onko“ – žymimi vėžinių, o „kontrolė“ – nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai)

Šiuose klasterinės analizės duomenyse galima matyti, kad vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų klasės yra tinkamai išskirtos. Galima pastebėti, kad iš 48 pacientų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų neteisingas priskyrimas atliktas 16 atvejų. Netinkamas spektrų priskyrimas gali būti dėl nuoplovose atsiradusių priemaišų arba dėl pačių pacientų gretutinių ligų.

Kitas metodas – pagrindinių komponentių analizė (PCA). Ši analizė atlikta parinkus 2 komponentes. Šios analizės grafikas yra pateiktas 15 pav.

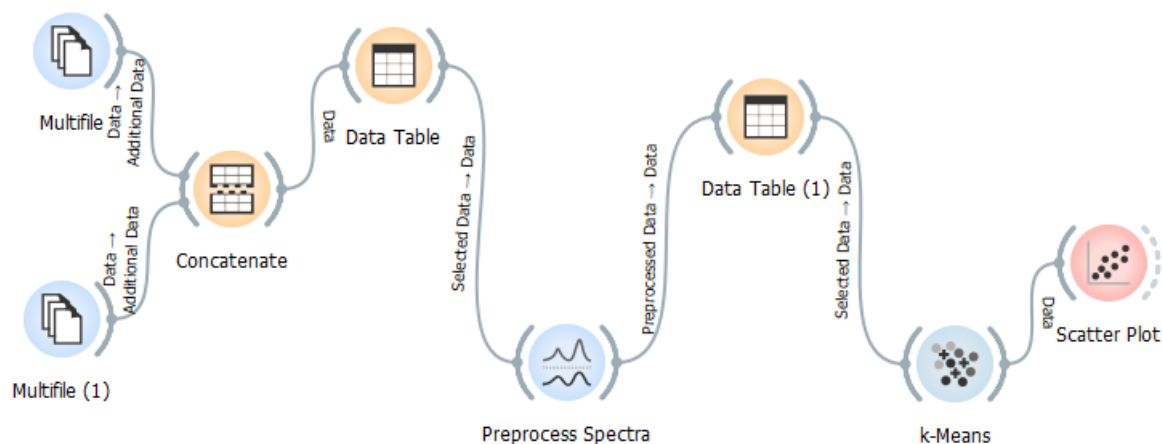


15 pav. PCA analizė. Duomenų apimtis: 48 spektrai (Trumpiniu „O“ – žymimi vėžinių, o „K“ – nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai)

Kaip galima matyti iš pateikto grafiko, yra tik keli specifiniai spektrai, kurie yra sumaišomi ir priskiriami neteisingai, tačiau PCA metodo atveju nematome aiškaus dviejų klasių išskyrimo. Šiuo atveju taip pat reikalingas ir didesnis duomenų kiekis, nes kuo didesnė duomenų apimtis, tuo tikslesnė duomenų analizė

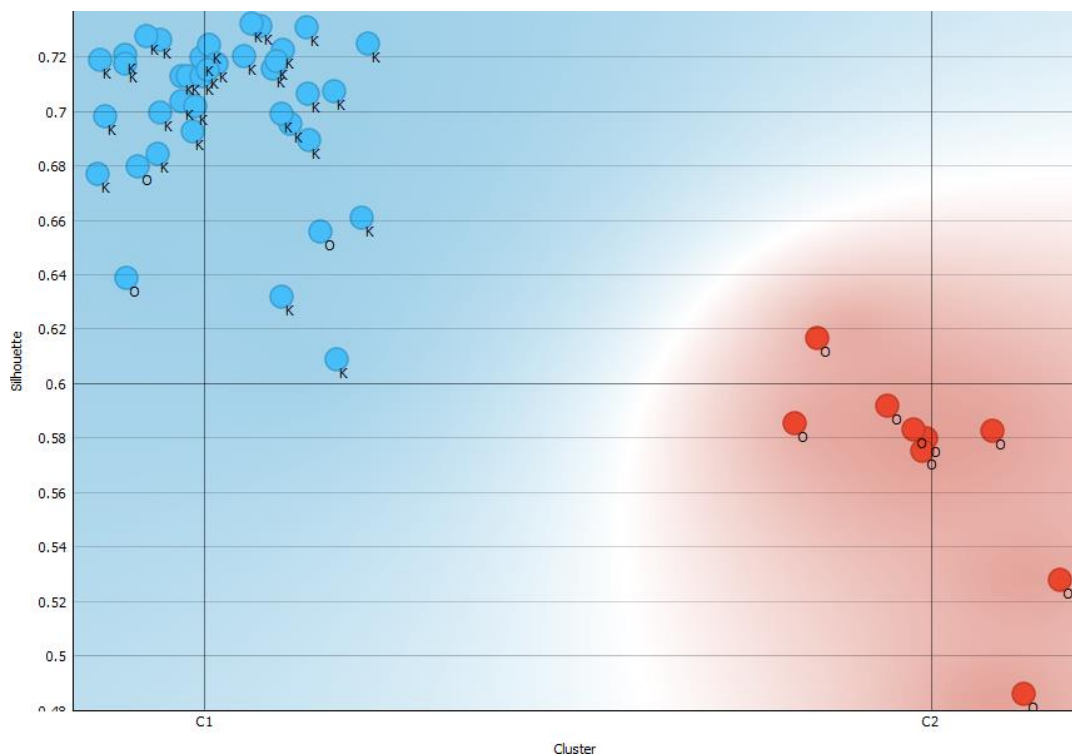
Metodo tikslumas diagnozuoti vėžinius atvejus buvo nustatytas atlikus trečiąją statistinės analizės metodą – K-vidurkių analizę, naudojant kompiuterinę programą Quasar. Jos principinė schema pateikta 16 pav. Pirmiausiai vėžiniai ir nevėžiniai šlapimo pūslės nuoplovų spektrai sukeliama į atskirus failų apdorojimo talpyklas „Multifile“, kur užduodamos reikšmės „O“ – vėžiniams ir „K“ – nevėžiniams bandiniams. Tuomet, funkcijos „Concatenate“ pagalba sujungiami į bendrą talpyklą „Data Table“, iš kurios duomenys gali būti interpretuojami „Preprocess Spectra“ funkcijos. Jos pagalba galime parinkti analizuojamą intervalą, minimaliai pakoreguoti spektrų bazinę liniją ir raišką. Atitinkamai, pagal užduotas vertes, duomenys pateikiami kitoje lentelėje „Data Table (1)“, kurie naudojami sekančioje funkcijoje „K-means“. Čia atliekama K-vidurkių analizė, pagal rankiniu būdu parinktą klasterių skaičių.

Galiausiai, paskutiniame taške „Scatter Plot“ matome K-vidurkių analizės rezultatus, kuriuose atsispindi atitinkamas spektrų pasiskirstymas.



16 pav. K-vidurkių analizei naudota principinė schema Quasar programoje

Ši analizė atliekama klasterių skaičių parenkant iš karto, prieš tai atsizvelgiant į jau naudotų analizės metodų rezultatus. Kaip ir PCA analizės atveju, K-vidurkių analizė atlikta pasirinkus atvejį, kur duomenys yra skirstomi į 2 (vėžinis, nevėžinis) klasterius ir yra pavaizduota 16 pav.



17 pav. K- vidurkių analizės rezultatai, intervale 0 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . (Trumpiniu „O“ – žymimi vėžinių, o „K“ – nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai)

Taip pat iš K-vidurkių analizės galima apskaičiuoti ar SERS metodas šlapimo pūslės vėžio diagnozavimui yra specifiskas ir jautrus. Specifiškumas yra susijęs su testo gebėjimu teisingai atmesti sveikų pacientų diagnozes. Testo specifiškumas parodo dalį pacientų, kurie tikrai neserga ir kurių diagnozė yra neigiama. Šiuo atveju specifiškumas:

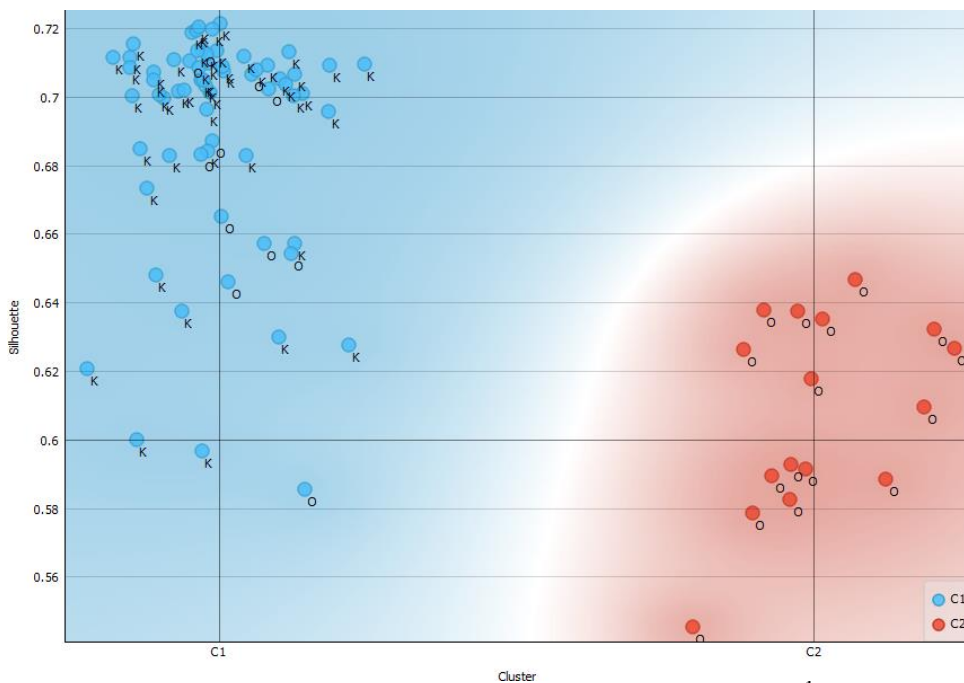
$$\text{Specifiškumas} = \frac{\text{Teisingai priskirtų vėžinių bandinių sk.}}{\text{Teisingai priskirtų vėžinių bandinių sk.} + \text{Neteisingai priskirtų nevėžinių bandinių sk.}} = 1 \quad (12)$$

Jautrumas reiškia testo gebėjimą teisingai aptikti sergančius pacientus, kurie serga šia liga. Apskaičiuotas jautrumas šio eksperimento rezultatų atveju:

$$\text{Jautrumas} = \frac{\text{Teisingai priskirtų nevėžinių bandinių sk.}}{\text{Teisingai priskirtų nevėžinių bandinių sk.} + \text{Neteisingai priskirtų vėžinių bandinių sk.}} = 0,92 \quad (13)$$

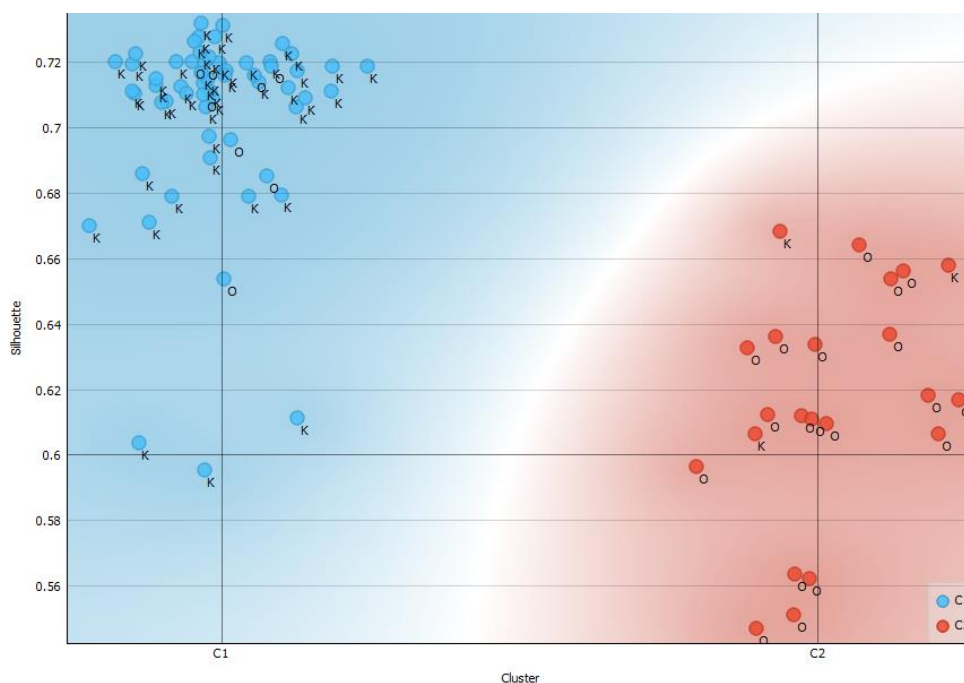
Įvertinus apskaičiuotas reikšmes, galima daryti išvadą, kad metodas yra ir jautrus, ir specifiskas. Dėl šios priežasties detalesnei spektrų analizei buvo pasirinktas būtent šis statistinės analizės metodas.

Kadangi duomenų imtis šiai analizei nėra labai didelė, buvo svarbu patikrinti ar toks metodas tinka ir suteikia tikrai teisingą informaciją apie spektrų panašumą, kai duomenų yra daugiau. Tam buvo panaudoti ir mokslo tiriamojo darbo I – II d. metu užregistruoti šlapimo pūslės nuoplovų vėžiniai ir nevėžiniai spektrai. Duomenų kiekis išaugo iki 81 spektro, kur į netinkamą klasę buvo priskirti tik 9 spektrai. Tai puikiai parodo, kad spektrinės juostos vėžiniuose ir nevėžiniuose SERS spektruose atsikartoja ir leidžia pagal tai spektrus suskirstyti į klases, kas padeda tolimesnei ir atidesnei spektrų analizei ir būdingų spektrinių juostų priskyrimui virpesiams. Tokio analizės metodo specifiškumas, apskaičiuotas pagal formulę (12-13) lygus 1, o jautrumas 0,83. Toks pavyzdys pateiktas 18 pav.



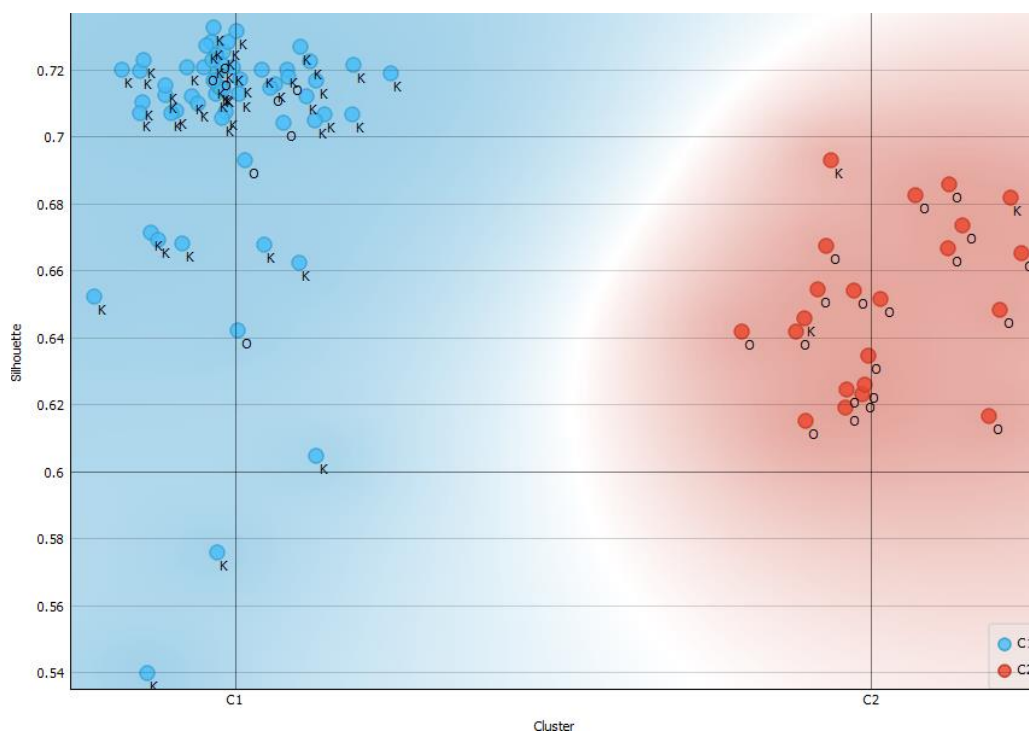
18 pav. 81 spektro K-vidurkių analizės rezultatai, intervale 0 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ . (Trumpiniu „O“ – žymimi vėžinių, o „K“ – nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrai)

Atliekant spektrų analizę, pagal identifikuotus spektrinius skirtumus, K-vidurkių analizė buvo atlikta parinkus skirtingus spektrų intervalus. K-vidurkių analizė atitinkamuose intervaluose pateikta 19 - 20 paveiksluose.



19 pav. K-vidurkių analizės rezultatai, intervale 450 – 1300  $\text{cm}^{-1}$

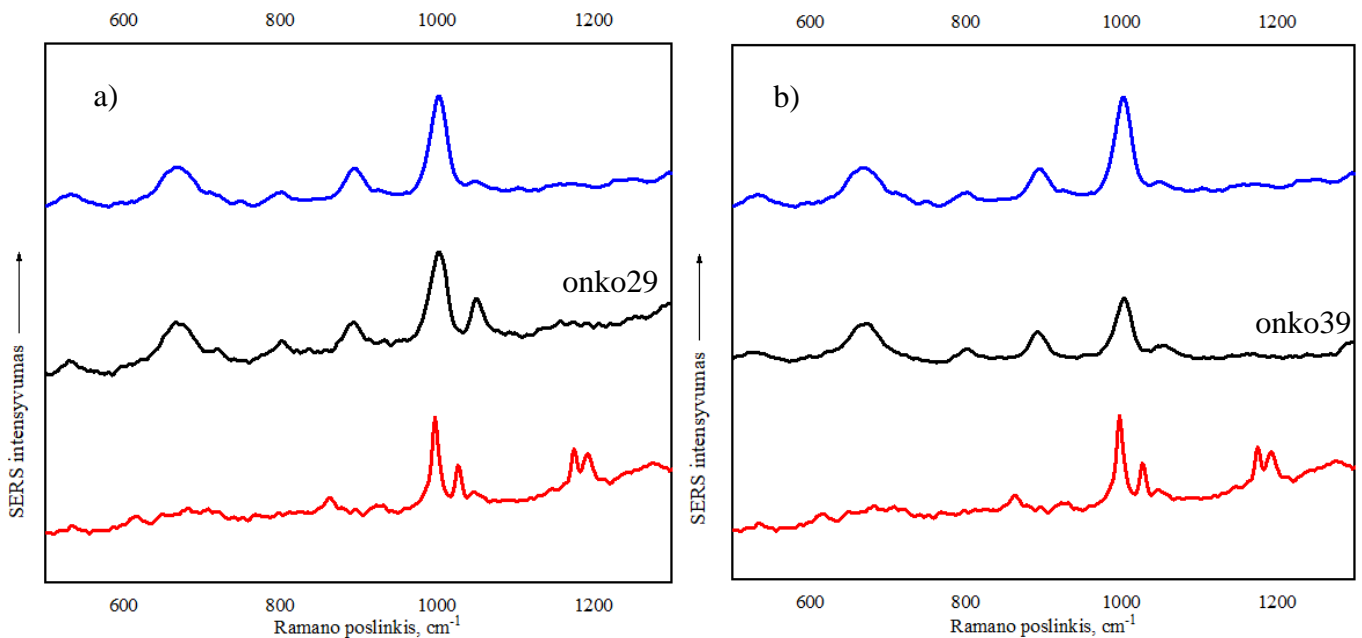




20 pav. K-vidurkių analizės rezultatai, intervale 900 – 1200  $\text{cm}^{-1}$

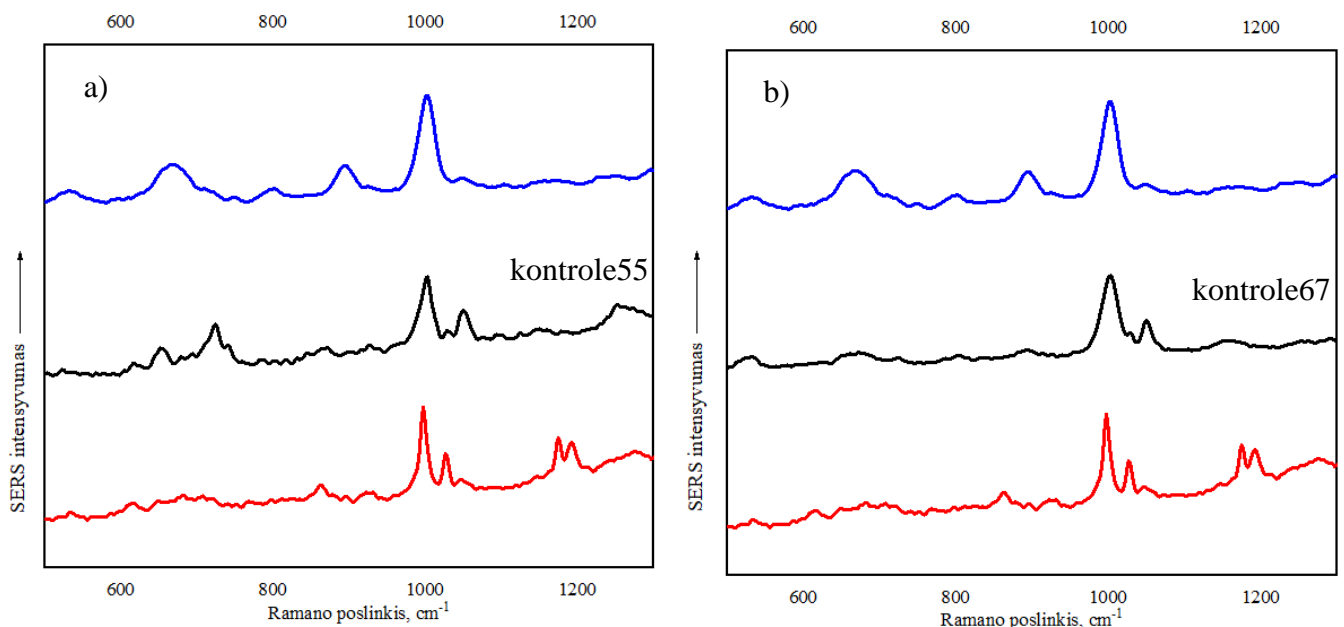
Sumažinus intervalą iki 350 – 1400  $\text{cm}^{-1}$  neteisingai priskirti 11 spektrų (3 nevėžiniai, 8 vėžiniai), o 900 – 1200  $\text{cm}^{-1}$  – 10 spektrų (3 nevėžiniai, 7 vėžiniai). Skirtingų intervalų atvejais buvo apskaičiuotas analizės metodo specifiškumas ir jautrumas, kad būtų galima palyginti, kaip skiriasi duomenų skirstymas į klases parinkus specifinį duomenų diapazoną. Sumažinus intervalą, abejais atvejais, specifiškumas sumažėjo iki 0,86, tačiau jautrumas padidėjo iki 0,86. Pateiktuose paveiksluose galima matyti, kad siaurinant intervalą, pasiskirstymas gerėja, atsiranda daugiau gerai priskirtų vėžinių spektrų, tačiau atsiranda ir keli netinkamai priskirti nevėžiniai, ko analizuojant per visą spektro dalį nebuvo. Taip yra dėl to, kad pagrindiniai spektriniai skirtumai identifikuoti anksčiau, stebimi gana siaurame spektrų intervale, todėl atliekant statistinę analizę būtent toje srityje – pasiskirstymas į vėžinius klasterius gerėja, tačiau į nevėžinius šiek tiek pablogėja.

Atlikus užregistruotų spektrų analizę, dėmesį atkreipia netinkamoms klasėms priskirti spektrai, kurie reikalauja atskiro nagrinėjimo. Tam buvo išskirti keli spektrai, kurie buvo priskirti nevėžinei grupei, kai tuo tarpu, pats bandinys buvo ruoštas iš vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų ir atvirkščiai. Neteisingai priskirti spektrai, palyginti su vidurkintais spektrais pateikti 21 – 22 pav.



21 pav. . Šlapimo pūslės nuoplovų spektrai: vidurkintas vėžinis (raudona), vidurkintas nevėžinis (mėlyna) a) vėžiniai „onko29” bandinys (juoda) ir b) vėžinis „onko39” bandinys (juoda)

Analizuojant „onko29” ir „onko39” spektrus, labai aiškiai matoma, kad nėra pagrindinių identifikuotų spektrinių juostų, būdingų spektrams užregistruotiems iš vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų. Patys spektrai turi daugiau panašumų į vidurkintą nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektrą. Toks neatitikimas gali būti nulemtas daugybės faktorių: bandinio paėmimo tikslumas, paciento ligos stadija, gretutinių ligų tikimybė ir daug kitų.



22 pav. Šlapimo pūslės nuoplovų spektrai: vidurkintas nevėžinis (mėlyna), vidurkintas vėžinis (raudona) a) nevėžinis „kontrolė55” bandinys (juoda) ir b) nevėžinis „kontrolė67” bandinys (juoda)

Analogiškai, palyginus vidurkintą nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų spektrą su netinkamai priskirtais „kontrolė55” ir “kontrolė67”, galima išvelgti kelis vėžio žymenis. Nors ir nedidelio intensyvumo, bet matoma išraiškinga spektrinė juosta ties  $1030\text{ cm}^{-1}$ . Taip pat geriau išsižiūrėjus, galima matyti ir silpno intensyvumo  $919\text{ cm}^{-1}$ , kuri taip pat stebima didžiojoje dalyje vėžinių spektrų. Kadangi bandiniai, pagaminti iš vėžinių šlapimo pūslės nuoplovų, savo sudėtyje gali turėti priemaišų, kitų biologinių skysčių, patekusių į bandinį mėginio paėmimo metu, toks netinkamas priskyrimas yra įmanomas. Didelę įtaką gali turėti ir paciento bendra sveikatos būklė, kiti šalutiniai susirgimai. Tačiau neatmetama galimybė, kad bandinio paėmimo metu diagnozė buvo įvertinta netiksliai.

Išanalizavus duomenis galima pastebėti, kad pasinaudojus statistinės analizės metodais, duomenys yra atskiriami ir sugrupuojami iš esmės teisingai. Matoma, kad kuo didesnė duomenų apimtis, tuo grupavimas tikslesnis, todėl į statistinės analizės duomenų apimtį įtraukus jau anksčiau užregistruotus spektrus, gauname dar tikslesnį šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų grupavimą, kuris leidžia įsitikinti, kad toks vėžio diagnostavimo metodas yra tikslus ir perspektyvus. Nagrinėjant neteisingai priskirtus spektrus, galime pastebėti, kad toks netinkamas grupavimas atsiranda ne atsitiktinai, o dėl įvertintos diagnozės galimo netikslumo ar paciento gretutinių ligų, dėl kurių bandinyje atsiranda papildomų biologinių pakitimų.

## Pagrindiniai rezultatai ir išvados

1. Atlikus šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų statistinę analizę, duomenis tinkamai suskirsčius į klases, nustatyta, kad galima identifikuoti aiškius skirtumus tarp vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų.
2. Tyrimo metu užregistravus skirtingų pacientų vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrus ir atlikus jų analizę pastebėta, kad su tirozinu susijusi SERS spektrinė juosta, esanti atitinkamai ties  $852\text{ cm}^{-1}$ , su baltymais ir sacharidais, esanti ties  $919\text{ cm}^{-1}$ , su fenilalaninu, esanti ties  $1030\text{ cm}^{-1}$  bei  $1200\text{ cm}^{-1}$ , gali būti tinkamos šlapimo pūslės vėžio identifikacijai.
3. Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų statistinei analizei tinkamiausias metodas, kuris padėjo sugrupuoti duomenis, yra K-vidurkių analizė. Išanalizavus spektrus, buvo įsitikinta, kad šis analizės metodas veikia tiek visame duomenų intervale (jautrumas 0,83, specifiškumas 1), tiek specifiniuose siauriuose intervaluose (jautrumas 0,86, specifiškumas 0,86).
4. Padidinus duomenų imtį, spektrų priskyrimo į klases tikslumas pagerėjo. Galima daryti išvadą, kad kuo didesnė duomenų apimtis, tuo tikslesnė ir pačių spektrų analizė.
5. Išnagrinėjus neteisingai suskirstytus šlapimo pūslės nuoplovų spektrus, buvo pastebėta ir įsitikinta, kad toks netinkamas klasifikavimas nėra atsitiktinis. Taip gali nutikti dėl netikslios ligos diagnozės arba papildomų priemaišų atsiradimo, pacientui sergant gretutinėmis ligomis.

## Santrauka

Magistro baigiamojo darbo tema: „ŠLAPIMO PŪSLĖS NUOPLOVŲ TYRIMAS SERS METODU, NAVIKŲ DIAGNOSTIKAI“

Studentė: Dominyka Grašytė

Šlapimo pūslės vėžio diagnozavimui yra sukurta daugybė tyrimų įskaitant hematauriją, kompiuterinės tomografijos urografiją, intraveninę urografiją, multiparametrinį magnetinį rezonansą bei citoskopiją. Visiems šiems išvardintiems diagnostikos metodams reikalinga brangi ir profesionali įranga, o galutinis rezultatas ne visada gaunamas teisingas. Geras šlapimo ar šlapimo pūslės nuoplovų tyrimas klinikinėje praktikoje yra suprantamas, kaip tyrimas, galintis padėti išvengti invazinių diagnostinių metodų bei aptikti tuos piktybinius pakitimus, kurie nebuvo užfiksuoti vaizdiniais ar invaziniais tyrimais. Klinikinėje praktikoje yra taikoma keletas šlapimo ir šlapimo pūslės nuoplovų tyrimų, tačiau kol kas idealaus tyrimo nėra. Jų pritaikomumą apriboja prastas jautrumas ir specifiškumas, ypač žemose naviko stadijose. Todėl siekiant efektyvaus pacientų gydymo, reikia sukurti nebrangų, neinvazinį, greitą ir automatizuotą didelio jautrumo diagnostikos metodą. Virpesinė spektroskopija ir jos metodikos gali būti naudojamos produktyviam ir didelių išlaidų nereikalaujančiam biologinių audinių žymenų identifikavimui. Yra žinoma, jog šios metodikos tinkamos ir naudojamos sveikų ir vėžinių skydliaukės, plaučių, prostatos bei odos audinių žymenų aptikimui. Sveikų ir vėžinių audinių ląstelių biologiniai skirtumai nedideli, tačiau gali nulemti labai skirtingus ląstelių metabolizmus. Vėžio diagnozavimas būtent ir yra paremtas vėžinių ląstelių metabolizmo pokyčiu. Šlapimo pūslės nuoplovų cheminė sudėtis vėžiniuose ir sveikuose audiniuose yra skirtinga, todėl atlikus fizikinę, cheminę ir biologinę šlapimo pūslės nuoplovų analizę galima nustatyti ar pacientas, kurio šlapimo pūslės nuoplovos tiriamos serga vėžiu ar ne. Bandinių, kuriuose tiriamos medžiagos koncentracija maža, Ramano sklaidos spektrą galima užregistruoti panaudojant paviršiaus sustiprintą Ramano spektroskopiją. SERS metodas yra realizuojamas, naudojant koloidinius nanodalelių tirpalus.

Magistro baigiamojo darbo tikslas – pritaikyti paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos metodą šlapimo pūslės vėžio tyrimams.

Tikslui pasiekti iškeltos užduotys:

1. Užregistruoti pacientų vėžinių ir sveikų šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrus.
2. Atlikti užregistruotų spektrų statistinę analizę, juos sugrupuoti į grupes vėžinis/nevėžinis.
3. Atlikti spektrinių juostų priskyrimą molekuliniais dariniais ir nustatyti spektrinius vėžio žymenis.

Nustatyta, kad atlikus šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų statistinę analizę, duomenis tinkamai suskirsčius į klases, galima pastebėti aiškius skirtumus tarp vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų. Tačiau tikslesnei analizei reikalinga didesnė duomenų apimtis. Eksperimento metu atlikus skirtingų pacientų vėžinių ir nevėžinių šlapimo pūslės nuoplovų užregistruotų SERS spektrų analizę pastebėta, kad su tirozinu susijusi SERS spektrinė juosta, esanti atitinkamai ties  $852\text{ cm}^{-1}$  su baltymais ir sacharidais ties  $919\text{ cm}^{-1}$ , su fenilalaninu, esanti ties  $1030\text{ cm}^{-1}$  bei  $1200\text{ cm}^{-1}$ , gali būti tinkamos šlapimo pūslės vėžio identifikacijai. Šlapimo pūslės nuoplovų SERS spektrų statistinei analizei tinkamiausias metodas, kuris padėjo sugrupuoti duomenis yra K-vidurkių analizė. Atlikus eksperimentą ir išanalizavus duomenis, galima daryti išvadą, kad SERS metodas diagnozuoti navikinius darinius šlapimo pūslės nuoplovoje yra perspektyvus ir tinkamas. Galima daryti išvadą, kad kuo didesnė duomenų apimtis, tuo tikslesnė ir pačių spektrų analizė, nes padidinus duomenų imtį – spektrų klasifikavimas į vėžinius ir nevėžinius pagerėjo. Išnagrinėjus neteisingai suskirstytus šlapimo pūslės nuoplovų spektrus, galima teigti, kad toks netinkamas klasifikavimas nėra atsitiktinis. Taip gali nutikti dėl netikslios ligos diagnozės arba papildomų priemaišų atsiradimo, kuomet pacientas serga gretutinėmis ligomis.



## Summary

The topic of the master work: "STUDY OF BLADDER WASHOUTS BY THE MEANS OF SERS, FOR THE TUMOUR DETECTION"

Student: Dominyka Grašytė

Many studies have been developed to diagnose bladder cancer, including hematuria, computed tomography, intravenous urography, multiparametric magnetic resonance imaging, and cystoscopy. All of these diagnostic methods require expensive and professional equipment, and the end result itself is not always correct. A good test for urinary or bladder washouts in clinical practice is understood as a test that can help prevent invasive diagnostic methods and detect those malignancies that have not been detected by imaging or invasive tests. Several studies of urinary and bladder washouts have been applied in clinical practice but no ideal study is available yet. Their applicability is limited by poor sensitivity and specificity, especially in the low stages of the tumor. Therefore, an inexpensive, non-invasive, rapid, and automated method for high-sensitivity diagnostics needs to be developed to effectively treat patients. Vibrational spectroscopy and its methodologies can be used for rapid and additional identification of biological materials that do not require labeling. These techniques have been found to be suitable for the detection of healthy and cancerous markers of the thyroid, lung, prostate, skin, and other tissues. Although the biochemical differences between normal and cancer cells are small, they lead to very different cell metabolisms. Therefore, chemical analysis of the intercellular fluid can determine if the tissue is cancerous. The Raman scattering spectrum of samples with low concentrations of the test substance can be recorded using surface-enhanced Raman spectroscopy. The SERS method is realized using colloidal nanoparticle solutions.

The aim of the research work is to apply surface enhanced Raman scattering methods for bladder cancer research.

The tasks of this work were set as follows:

1. To record SERS spectra of patients with cancer and healthy bladder washouts.
2. Make a statistical analysis of the recorded spectra, group them into cancer / non-cancer groups.
3. Make an assignment of spectral bands to molecular derivatives and identify spectra of cancer markers.

Statistical analysis of the SERS spectra of bladder lavage, with the appropriate classification of the data, reveals clear differences between the SERS spectra of cancerous and non-cancerous bladder washouts. Analysis of the recorded SERS spectra of cancerous and non-cancerous bladder washouts in different patients during the experiment revealed that the SERS spectral band associated with tyrosine oscillations at the  $852\text{ cm}^{-1}$ , band associated with proteins and saccharides at  $919\text{ cm}^{-1}$ , and the SERS



spectral bands associated with phenylalanine oscillations at  $1030\text{ cm}^{-1}$  and  $1200\text{ cm}^{-1}$  may be suitable for bladder cancer identification. The most appropriate method for the statistical analysis of the SERS spectra of bladder washouts, which helped to divide the data into three groups, is the analysis of K-means. This method not only groups the data into key classes, but also helps to distinguish those spectra that require additional analysis. After the experiment and the analysis of the data, it can be concluded that the SERS method for diagnosing tumors in bladder washouts is a promising and eligible method. It can be concluded that the larger the volume of data, the more accurate the analysis of the spectra because by increasing the data sample amount, the classification of spectra into cancerous and non-cancerous has been improved. Examining the misclassified bladder washout spectra suggests that such misclassification is not accidental. This can happen due to an inaccurate diagnosis of the disease or the appearance of additional impurities when the patient has concomitant diseases.

## Literatūra

1. Goessl, C., Is routine excretory urography necessary at first diagnosis of bladder cancer? 157-180 (1997).
2. Palou, J., et al. Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumor. *J Urol*, 174 (2005).
3. Holmang, S., Long-term followup of a bladder carcinoma cohort: routine follow up urography is not necessary. *J Urol*, 160-165 (1998). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9628602>
4. Panebianco V., Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Bladder Cancer: Development of VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data System). *Eur Urol*, 74-104 (2016).
5. Babjuk M, Bohle A, Burger M, Comperat E, Kaasinen E, Palou J, Guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and CIS). Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology (2016).
6. Chang SS, Boorjian SA, Chou R, Clark PE, Daneshmand S, Konety BR, et al. Diagnosis and treatment of non-muscle invasive bladder cancer. AUA/SUO guideline; (2016). Available from: <http://www.auanet.org/education/guidelines/non-muscleinvasive-bladder-cancer.cfm>
7. Chou R, Gore JL, Buckley D, Fu R, Gustafson K, Griffin JC, et al. Urinary biomarkers for diagnosis of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis, 163-166, 919-922 (2015).
8. Yafi, F.A., Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer, *Urol Oncol*, 33-66, (2015).
9. O. J. Old, L. M. Fullwood, Vibrational spectroscopy for cancer diagnostics, *Analytical Methods*, 6(12), 3901-3917, (2014)
10. National Comprehensive Cancer Network. Urothelial cancer practice guidelines, Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/bladder\\_blocks](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder_blocks)
11. Herlevsen M, Oxford G, Ptak C A novel model to identify interaction partners of the PTEN tumor suppressor gene in human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*; 352(2), 549-555 (2007)
12. Cheng X, Liu X, Liu X, Metabolomics of Non-muscle Invasive Bladder Cancer: Biomarkers for Early Detection of Bladder Cancer. *Front Oncol*, 494(8), 143-155 (2018)
13. Korneev, KV “TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis”. *Cytokine*. 89(2) 127–135, (2017)
14. Joyce J, “T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment”. *Science Magazine*, 34(8), 74–80 (2015)
15. Burger, M., Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer, 63:234. (2013)
16. Chavan, S., International variations in bladder cancer incidence and mortality, 66: 59. (2014)
17. Freedman, N.D., Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women, 306: 737. (2011)

18. van Osch, F.H., Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies, 45: 857. (2016)
19. Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J., Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, Chem. Phys. Lett. **26**(1), 163–166 (1974)
20. Stephen M. Barnett, Nadine Harris, Jeremy J. Baumberg, Molecules in the mirror: how SERS backgrounds arise from the Quantum method of images, Phys. Chem. Chem. Phys., **16**(14), 6544-6549, (2014)
21. Sebastian Schlücker, Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical Biophysical and Life Science Applications, Wiley-VCH, Vokietija, (2011)
22. Anna Rita Bizzarri, SERS detection of thrombin by protein recognition using functionalised gold nanoparticles, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. **3**(4), 306-310 (2007)
23. Eric Lee Ru, Pablo Etchegoin, Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects, Elsevier, Amsterdams, Olandija, (2009)
24. Gobind Das, Manohar Chirumamilla, Plasmon based biosensor for distinguishing different peptides mutation states, Scientific Reports (Nature), **3**(1), 1-6 (2014)
25. S. Z. Malynych, Estimation of Size and Concentration of Silver Nanoparticles in Aqueous Suspensions from Extinction Spectra, J. Nano-Electron Phys, **2**(4), 5-11 (2010)
26. Rycenga, M., Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. Chemical Reviews, **111**(6), 3669-3712 (2011)
27. Synthesis of Silver Nanostructures with Controlled Shapes and Properties. Accounts of Chemical Research, **40**(10), 1067-1076 (2007)
28. P. C. Lee and D. Meisel, Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols, J. Phys. Chem., **86**(17), 3391-3395, (1982).
29. Jolliffe, I. T. Principal Component Analysis, Springer-Verlag, 487-489 (1989)
30. Sevda Mert, Kidney tumor staging using surface-enhanced Raman scattering, Journal of Biomedical Optics, **20**(4), 1-9 (2015)
31. Sevda Mert, Mustafa Culha, Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Detection of Cancerous Renal Cells, Applied Spectroscopy, **68**(6), 617-624 (2014)
32. Shaoxin Li, Characterization and noninvasive diagnosis of bladder cancer with serum surface enhanced Raman spectroscopy and genetic algorithms, Scientific Reports, **5**(1), 1-7 (2015)
33. Duo Lin, Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis, Optics Express, **19**(14), 13565-13577 (2011)
34. Bing Yan, Label-free blood serum detection by using surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine for the preoperative diagnosis of parotid gland tumors, BMC Cancer, **5**(1), 1-9 (2015)

35. Stone N, Kendell C, Shepherd N, Crow P, Barr H. Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers. *Journal of Raman Spectroscopy*, 564-573 (2002)
36. Dukor RK. Vibrational spectroscopy in the detection of cancer. *Biomedical Applications*, 3335-3359 (2002)
37. M. Toplak, et al. Quasar: Easy Machine Learning for Biospectroscopy. *Cells* 10, 2300 (2021)
38. M. Toplak, et al. Infrared Orange: Connecting Hyperspectral Data with Machine Learning. *Synchrotron Rad. News* 30, 40–45 (2017)