

Vilniaus universitetas
Fizikos fakultetas
Bendrosios fizikos ir spektroskopijos katedra

Martynas Velička

**INKSTŲ VĖŽIO DIAGNOSTIKA PAVIRŠIAUS SUSTIPRINTOS RAMANO SKLAIDOS
SPEKTRINIŲ METODŲ**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Studijų programa – APLINKOS IR CHEMINĖ FIZIKA

Studentas	Martynas Velička
Darbo vadovas	Prof. Dr. (HP) Valdas Šablinskas
Recenzentas	Dr. Kęstutis Aidis
Katedros vedėjas	Prof. Dr. (HP) Valdas Šablinskas

Vilnius 2016

Turinys

Įvadas.....	3
I. Literatūros apžvalga	5
1. Biologiniai skysčiai	5
2. Šlapimo rūgštis.....	5
3. Inkstų audinio vėžys	7
4. Ramano sklaida.....	9
5. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektroskopija.....	10
5.1. Krūvio pernašos modelis	11
5.2. Elektromagnetinis modelis	12
5.3. Optinės nanodalelių savybės	17
6. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos registravimo metodai.....	18
II. Eksperimentinė dalis	22
1. Sidabro nanodalelių koloidiniai tirpalai.....	22
1.1. Tirpalų paruošimui naudotos medžiagos ir prietaisai.....	23
1.2. Sferinių sidabro nanodalelių tirpalo paruošimas.....	23
1.3. Prizmės formos sidabro nanodalelių tirpalo paruošimas.....	23
1.4. Koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų centrifugavimas	24
1.5. Koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų sugerties spektrai.....	25
2. Bandinių paruošimas.....	25
3. Spektrų registravimo aparatūra	27
III. Rezultatai.....	29
1. Koloidiniai sidabro nanodalelių tirpalai	29
2. <i>SERS</i> spektriniai rezultatai.....	32
2.1. Šlapimo rūgšties tyrimai.....	32
2.2. Inkstų audinių tyrimai.....	36
Pagrindiniai rezultatai ir išvados	44
Santrauka	48
Summary	49

Ivadas

Inkstų vėžys (piktybinis auglys) sudaro beveik du procentus visų diagnozuojamų vėžių pasaulyje [1]. Mirtingumas susirgus šia liga per pastarąjį dešimtmetį padidėjo 2 – 3 %, ir todėl šio tipo vėžio gydymui bei tyrimams yra skiriama daug resursų.

Kol auglys dar nėra apėmęs viso inksto, chirurginiu dalinės nefrektomijos metodu jį galima pašalinti, paliekant sveiką inksto audinį ir tokiu būdu dalinai išsaugant jo gyvybines funkcijas. Tokios procedūros sėkmę lemia naviko ribų nustatymo chirurginės operacijos metu tikslumas. Šiuolaikinėje medicinoje vėžinių audinių nustatymui yra naudojami histopatologiniai tyrimai, kurie atliekami ne operaciniame, o specialiose laboratorijose. Dėl šios priežasties histopatologinių tyrimų metodai nėra operatyvūs ir negali būti efektyviai panaudoti vėžinių audinių pašalinimo operacijų metu, kuomet chirurgui reikia greitai ir tiksliai nustatyti vėžinio audinio ribas. Vėžio diagnostikos tyrimuose intensyviai ieškoma naujų neinvazinių metodų, kurie chirurginių operacijų metu įgalintų tiksliai ir operatyviai nustatyti vėžinio audinio sritis.

Gerai žinoma, kad audinių ląstelės yra sudarytos iš įvairių molekulinį darinių, tarp kurių dominuoja baltymai, lipidai, nukleino rūgštys. Visos šios molekulinės struktūros turi charakteringus virpesinius (infraraudonosios (IR) sugerties ir Ramano sklaidos) spektrus, kurie gali būti traktuojami kaip molekulių „pirštų antspaudai“ [2]. Pastaraisiais dešimtmečiais atlikti moksliniai tyrimai parodė, kad virpesinės spektroskopijos metodikos gali būti panaudotos greitam ir papildomų žymenų nereikalaujančiam biologinių medžiagų charakterizavimui. Įrodyta, kad įprastos virpesinės spektroskopijos metodikos gali būti panaudotos sveikų ir vėžinių krūties, odos, skydliaukės, prostatos plaučių, audinių sričių nustatymui [3].

Žvelgiant iš cheminės perspektyvos, audiniai yra sudėtingos cheminės sistemos, kurios yra sudarytos iš dviejų pagrindinių komponentų – audinio ląstelių bei tarpląstelinio skysčio. Biocheminiai vėžinių ir normalių ląstelių skirtumai yra maži, tačiau jie nulemia labai skirtingus ląstelių metabolizmus. Kadangi tarpląstelinis skystis yra susijęs su maisto medžiagų transportu į ląsteles ir metabolizmo produktų pašalinimu iš ląstelių, cheminė tarpląstelinio skysčio sudėtis sveikuose audiniuose ir piktybiniuose navikuose yra skirtinga.

Taigi, tarpląstelinio skysčio Ramano sklaidos spektrai turėtų būti informatyvūs nustatant tų audinio sričių, iš kurių paimtas skystis, ląstelių tipą. Tarpląstelinio skysčio bandiniai spektriniais tyrimams yra ruošiami šlampavimo būdu - prispaudžiant biopsinį audinį prie bandinio laikiklio. Atitraukus audinį ant laikiklio lieka tik 0,1 μm - 1 μm storio tarpląstelinio skysčio plėvelė, kurios virpesinį spektrą ir reikia užregistruoti. Dėl mažo tarpląstelinio skysčio sluoksnio storio Ramano sklaidos spektrai yra labai silpni ir negali būti panaudojami audinio diagnostikai. Tokios plonos

plėvelės Ramano sklaidos spektrą galima užregistruoti tik panaudojant paviršiaus sustiprintą Ramano sklaidą (angl. *SERS*).

SERS metodas dažniausiai yra realizuojamas, naudojant koloidinius sidabro arba aukso nanodalelių tirpalus. Naudojant šiuos tirpalus gaunamas didelis Ramano sklaidos signalo stiprinimas, o juos paruošti galima greitai ir nebrangiai. Pagrindinis metodo trūkumas yra tas, kad sluoksniai, suformuoti iš koloidinių nanodalelių tirpalų, pasižymi nehomogeniškumu, o tuo pačiu ir skirtingais Ramano signalo stiprinimo faktoriais skirtinguose sluoksnio vietose. Ši problema yra aktuali, nes dirbant su nehomogeniškais sluoksniais nėra galima patikima kiekybinė analizė.

Magistrinio darbo tikslas – suformuoti biologinių skysčių *SERS* spektriniais tyrimams efektyvius sidabro nanodalelių sluoksnius ir pritaikyti juos inkstų piktybinių navikų aptikimui, analizuojant inkstų audinio tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrus.

Tikslui pasiekti iškeltos tokios užduotys:

1. Patobulinti *SERS* spektroskopijai skirtų sidabro nanodalelių sluoksnių paruošimo metodiką, testiniu *SERS* bandiniu panaudojant šlapimo rūgšties vandenyje ir kraujyje tirpalus.
2. Naudojantis paruoštais nanodalelių sluoksniais, užregistruoti onkologinių pacientų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis inkstų audinio ląstelėmis *SERS* spektrus ir nustatyti spektrinius vėžinių ląstelių žymenis.
3. Įvertinti metodikos tinkamumą vėžinių inkstų audinio sričių nustatymui.

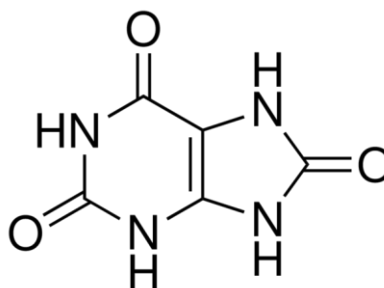
I. Literatūros apžvalga

1. Biologiniai skysčiai

Terminas „biologiniai skysčiai“ apima įvairius žmogaus organizme esančius ar jame susiformuojančius skysčius. Žmogaus biologinių skysčių grupei priklauso tokie skysčiai kaip prakaitas, ašaros, kraujo serumas, šlapimas, seilės, skrandžio sultys, tarpląstelinis skystis ir dar daugelis kitų [4]. Šių skysčių svarba žmogaus organizmui yra didelė, nes jų dėka yra pernešamos įvairios cheminės ar maisto medžiagos, šalinamos kenksmingos medžiagos ir medžiagų apykaitos produktai. Dėl šios priežasties biologinių skysčių sudėtis yra labai įvairi, juose gausu įvairių baltymų ir kitų biologinių molekulių. Yra nustatyta, kad sveikame žmogaus organizme procentinė biologinių skysčių sandara yra pastovi, o sergant tam tikromis ligomis ji pakinta – padidėja arba sumažėja tam tikrų biologinių molekulių koncentracija. Stebint šių molekulių koncentracijų pokyčius, galima iš anksto diagnozuoti įvairias ligas [5].

2. Šlapimo rūgštis

Šlapimo rūgštis yra heterociklinė molekulė, kuri yra sudaryta iš anglies, vandenilio, deguonies ir azoto atomų. Ji yra galutinis augalinėse ir gyvūninėse ląstelėse esančių purinų skilimo produktas. Žmonių organizmuose šlapimo rūgšties molekulės susidaro purinų metabolizmo metu virškinimo trakte skylant baltymų molekulėms. Žmogaus organizme purinai, kurie gali būti pasisavinti iš maisto arba natūraliai susiformuoti pačiame organizme, patenka į kepenis. Jose skaidant purinus pagaminama šlapimo rūgštis. Iš kepenų šlapimo rūgštis patenka į kraujotaką ir pasiekia inkstus, kol, galiausiai, yra pašalinama kartu su šlapimu. Tokiu būdu yra pašalinama apie septyniasdešimt procentų šlapimo rūgšties. Taip pat dalis šlapimo rūgšties molekulių patenka į žarnyną, kuriame jas suskaido žarnyno bakterijos. Žmogaus organizme šlapimo rūgštis yra būtina, nes yra naudojama keliuose metabolizmo procesuose. Stiprios antioksidacinės jos savybės yra svarbios organizmo apsaugai, tačiau, tuo pačiu, šlapimo rūgštis turi ir neigiamų oksidacinių savybių [6]. Bendroji cheminė šlapimo rūgšties molekulės struktūra yra pateikta 1 pav.



1 pav. Cheminė šlapimo rūgšties molekulės struktūra.

Šlapimo rūgštis yra netirpi vandenyje. Jos didžiausia galima koncentracija distiliuotame 20 °C temperatūros vandenyje yra 35 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Viršijus šią koncentraciją tirpale pradeda formotis šlapimo rūgšties kristalai. Dėl šios priežasties, atsiradus žmogaus metabolizmo pokyčiams (genetiniams ar kitiems), kurie nulemia šlapimo rūgšties koncentracijos biologiniuose skysčiuose padidėjimą, pastaroji pradeda kauptis sąnarių srityse, ties išorine ausimi ar inkstais. Šios sankaupos yra skausmingos ir galiausiai lemia tokias ligas kaip artritas ar podagra [7]. Taip pat nesugebant iš organizmo pašalinti šlapimo rūgšties gali pradėti formotis inkstų akmenys. Padidėjęs šlapimo rūgšties kiekis kraujyje (hiperuricemija) yra siejamas su tokiais ligomis kaip acidozė, diabetas, podagra, inkstų nepakankamumas ir kitomis [8-9]. Sumažėjęs šlapimo rūgšties kraujyje kiekis indikuoja, kad asmuo serga Vilsono liga ar Fankonio sindromu [9]. Todėl registruojant šlapimo rūgšties koncentraciją biologiniuose skysčiuose yra iš anksto diagnozuojamos šios ligos.

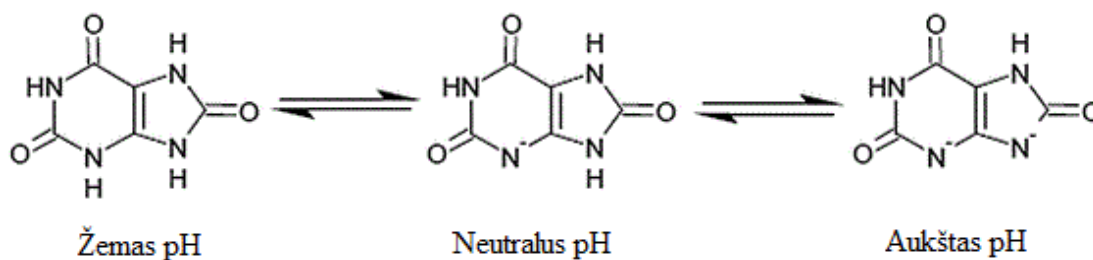
Šlapimo rūgšties koncentracija kraujyje priklauso nuo žmogaus mitybos įpročių, lyties ir amžiaus. Taip pat šlapimo rūgšties koncentracija gali būti didesnė arba mažesnė dėl skirtingos žmogaus metabolizmo spartos. Dėl šių priežasčių normaliomis (leistinomis) šlapimo rūgšties koncentracijomis kraujyje yra gydytojų laikomi koncentracijų intervalai, o ne apibrėžtos vertės (1 lentelė).

1 lentelė. Šlapimo rūgšties normalios koncentracijos žmogaus kraujyje.

Grupė	Koncentracija, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Vyrai	202 – 416
Moterys	143 – 357
Vaikai	119 – 327

Didesnį šlapimo rūgšties tirpumą galima pasiekti šarminiuose (aukšto pH) tirpaluose. Tokiuose tirpaluose šlapimo rūgštis tirpsta, nes pereina į kitas tautomerines formas arba yra deprotonuojama – azoto atomai atiduoda „savo“ vandenilio atomus. Reikia paminėti, kad neutraliuose tirpaluose šlapimo rūgštis taip pat egzistuoja keliose tautomerinėse formose deprotonuota, nes jos

disociacijos konstantos vertė $pK_{a1} = 5,4$. Cheminės deprotonuotos šlapimo rūgšties struktūros įvairiuose pH tirpaluose yra pateiktos 2 pav.



2 pav. Šlapimo rūgšties molekulės struktūros skirtingo pH terpėse.

Šlapimo rūgšties tautomerizacija bei deprotonavimas lemia itin gerą jos adsorbciją ant sidabro paviršiaus. Likę laisvi ir neigiamą krūvį turintys azoto atomai yra linkę adsorbuotis prie sidabro paviršiaus. Ši savybė yra naudojama kuriant sidabro jonų jutiklius [10]. Taip pat, sugebėjimas adsorbuotis ant metalo paviršiaus yra vienas iš faktorių, nulemiančių intensyvų šlapimo rūgšties molekulės *SERS* signalą. Dėl galimybės iš anksto diagnozuoti įvairias ligas registruojant šlapimo rūgšties koncentraciją biologiniuose skysčiuose bei geros šlapimo rūgšties adsorbcijos, ši molekulė buvo pasirinkta kaip testinis bandinys nustatyti darbo metu suformuotų sidabro nanodalelių sluoksnių tinkamumą biologinių skysčių Ramano sklaidos spektrinių juostų intensyvumų stiprinimui.

3. Inkstų audinio vėžys

Inkstų vėžys, kaip kitos vėžio rūšys, išsivysto dėl greito „nenormalių“ ląstelių augimo. Vėžinės ląstelės susiformuoja pakitus tam tikriems genams, reguliuojantiems ląstelių augimą. Šiuolaikinėje medicinoje inkstų audinio vėžiai yra skirstomi į kelis tipus, kurie nustatomi pagal vėžio lokalizaciją organizme, kilmę bei fiziologines savybes. Šviesiųjų ląstelių karcinoma yra dažniausiai diagnozuojamas žmonių inkstų vėžio tipas. Jis diagnozuojamas apie 90 % inkstų vėžiu sergančių pacientų [11]. Šis inkstų audinio karcinomos pavadinimas yra kilęs dėl šviesios vėžinių ląstelių išvaizdos, kuri stebima panaudojus standartines histopatologines ląstelių dažymo metodikas. Optiniu mikroskopu suformuotuose atvaizduose vėžinės ląstelės atrodo šviesios, nes dėl padidėjusios lipidų bei kitų su dažais nereaguojančių molekulių koncentracijos šios ląstelės nėra nudažomos.

Yra žinoma, kad vėžinės inkstų audinių ląstelės savo cheminę sandara skiriasi nuo sveikų. Vėžinėms ląstelėms yra būdingas padidėjęs fosfolipidų kiekis jų membranose [12]. Be to, padidėja ir daugelio kitų biologinių molekulių, aptinkamų vėžinėse ląstelėse koncentracijos, pavyzdžiui, cholesterolio [13], riebiųjų rūgščių [14] ir kitų.

Vėžinėms ląstelėms būdingas paspartėjęs metabolizmas. Kad vėžinės ląstelės galėtų greitai augti bei daugintis, joms reikia daug energijos. Sveiko žmogaus organizme didelė dalis reikalingos energijos yra pagaminama ląstelinio kvėpavimo metu, naudojant deguonį bei gliukozę. Ląstelių mitochondrijose oksiduojant piruvatą (gliukozės skaidymo produktą) yra pagaminamos energinės ATP (adenozintrifosfato) molekulės, kurių cheminė energija, išsiskyrusi joms skylant į ADP (adenozindifosfatą), vėliau naudojama ląstelės viduje vykstančiuose bei energijos reikalaujančiuose procesuose. Deguonis, kuris yra reikalingas ląstelėms, yra tiekiamas iš kraujo kapiliarų, tačiau nustatyta, kad tostant nuo jų, deguonies koncentracija sparčiai mažėja, ir pakankamu jo kiekiu yra aprūpinamos tik ląstelės, esančios ne toliau nei 150 μm nuo kraujagyslių. Todėl dėl greito vėžinių ląstelių dauginimosi, didelė vėžinio audinio sritis negali būti aprūpinama pakankamu deguonies kiekiu, būtinu ląstelinio kvėpavimo vykdymui [15]. Hipoksinėse (deguonies stingančiose) audinio srityse, vėžinio audinio ląstelės „išgyvena“ prisitaikydamos ir energiją gaudamos ne vykdydamos aerobinį (deguonies reikalaujantį) kvėpavimą, o deguonies nereikalaujantį anaerobinį kvėpavimą (rūgimą).

Anaerobinio kvėpavimo metu ląstelių citoplazmoje (nebe mitochondrijose) iš piruvato molekulių yra gaminamos ATP molekulės bei šalutinis produktas - pieno rūgštis, kuri transportuojama už ląstelės ribų. Rūgimo procesas energijos kaupimo prasme nėra našus. Šio proceso ATP molekulių sintezės išeiga yra ženkliai mažesnė nei proceso, vykdomo mitochondrijose. Iš vienos gliukozės molekulės rūgimo proceso metu yra pagaminamos tik 2 ATP molekulės, o tuo tarpu ląstelinio kvėpavimo proceso metu pagaminamos 38 ATP molekulės. Kitas anaerobinio kvėpavimo produktas – didelis kiekis vandenilio jonų. Šie jonai išskiriami į tarpląstelinį skystį. Dėl padidėjusios vandenilio jonų ir pieno rūgšties koncentracijų ląstelės išorėje, tarpląstelinio skysčio rūgštingumas padidėja - jo pH vertė ženkliai sumažėja [16]. Tarpląstelinio skysčio rūgštėjimas yra siejamas su vėžio augimu ir vėžinių ląstelių plitimu į kitus organus.

Kadangi anaerobinio kvėpavimo metu ATP molekulių išeiga yra maža, vėžinės inkstų audinio ląstelės privalo šį procesą atlikti sparčiai, kad pasigamintų pakankamą kiekį ATP molekulių. Dėl to vėžinėse ląstelėse stebimas intensyvus gliukozės srautas į ląstelės vidų. Be to, nustatyta, kad daugumos vėžio tipų ląstelėse yra kaupiamas glikogenas – šakotas gliukozės polimeras, kuris yra naudojamas gliukozės saugojimui ląstelės viduje [17]. Prireikus energijos glikogenas yra suskaidomas į gliukozę, kuri panaudojama ATP sintezei. Glikogeno kaupimas užtikrina, kad vėžinės ląstelės visuomet turės pakankamą kiekį gliukozės, o tuo pačiu ir energijos, reikalingos augimui bei kitoms funkcijoms atlikti. Itin dideli glikogeno kiekiai nustatyti krūties, inkstų, odos, smegenų, gimdos, šlapimo pūslės vėžinėse ląstelėse.

Pakitusi vėžinių ląstelių sandara ir metabolizmas įgalina vėžinių ir sveikų ląstelių atpažinimą spektriniais metodais. Analizuojant įvairių biologinių molekulių koncentracijas ląstelėse, galima nustatyti ląstelių „vėžiškumą“, o taip pat ir metastazavusių vėžinių ląstelių kilmę. Panašiu principu šio darbo metu nagrinėjant vėžinio ir sveiko inkstų audinių tarpląstelinių skysčių virpesinių spektrų skirtumus buvo bandoma nustatyti vėžines audinio sritis.

4. Ramano sklaida

Ramano sklaida – tai netampri fotonų sklaida medžiagoje. Šį sklaidos vyksmą išsamiai aprašo kvantinė mechaninė sklaidos teorija, bet pagrindinius dėsnius galima nusakyti naudojantis ir klasikinės mechanikos teorija. Jei į nagrinėjamą daugiaatomę molekulę krinta monochromatinė elektromagnetinė banga, kurios elektrinio lauko svyravimai erdvės taške aprašomi lygtimi

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

tai molekulėje yra indukuojamas dipolinis momentas, aprašomas lygtimi

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

čia α yra molekulės poliarizuojamumas. Bendru atveju, dviatomių molekulių poliarizuojamumas yra diagonalus tenzorius, o daugiaatomės molekulės poliarizuojamumas yra nediagonalus simetrinis tenzorius. Kadangi poliarizuojamumas yra tenzorinis dydis molekulių indukuoto dipolinio momento kryptis, dėl molekulės orientacijos lauko atžvilgiu, dažniausiai nesutampa su elektromagnetinės bangos elektrinio lauko stiprio vektoriaus kryptimi.

Daugiaatomė molekulė virpa 3N-6 normaliųjų virpesių (tiesinės molekulės virpa 3N-5 normaliųjų virpesių). Šie virpesiai gali būti aprašyti harmoniniu artiniu pagal formulę

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

čia m – normalio virpesio numeris. Tokiu atveju molekulės poliarizuojamumas priklauso nuo visų 3N-6 virpesinių koordinačių. Jei poliarizuojamumą α išskleistume Teiloro eilute normaliųjų virpesių pusiausvirųjų atstumų aplinkoje, gautume:

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

Taigi, galima pastebėti, kad molekulėje indukuotas dipolinis momentas kinta ne tik ω_0 dažniu, bet ir $\omega_0 \pm \omega_m$ dažniais. Indukuoto dipolinio momento išraiška tuomet gali būti užrašyta:

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

Šioje išraiškoje pirmas narys yra susijęs su nepakitusio dažnio antriniu dipoliniu spinduliavimu, vadinamu Reilio (*Rayleigh*) sklaida. Antrasis ir trečiasis nariai susiję su neelastine sumažėjusio ir padidėjusio dažnio sklaida, atitinkamai vadinamomis Ramano Stokso bei Ramano anti-Stokso sklaidomis. Svarbu paminėti, kad spektriniuose Ramano sklaidos eksperimentuose dažniausiai yra registruojama Ramano Stokso sklaida, nes ji yra intensyvesnė už Ramano anti-Stokso sklaidą. Taip yra todėl, kad anti-Stokso sklaida vyksta iš sužadintų virpesinių lygmenų, o jų užpilda natūraliai yra mažesnė. Kadangi Ramano sklaidos intensyvumas yra $10^7 - 10^8$ kartų mažesnis nei žadinančios spinduliuotės intensyvumas, žadinimui reikia galingo monochromatinio šaltinio. Šį reikalavimą atitinka lazeriai, todėl dažniausiai jie yra naudojami Ramano sklaidos eksperimentuose.

Reilio, Ramano Stokso bei Ramano anti-Stokso sklaidos intensyvumai yra atvirkščiai proporcingi krintančios spinduliuotės bangos ilgio ketvirtajam laipsniui. Proporcingumai aprašomi lygtimis:

$$I_{\text{Reil}} \propto \alpha_0^2 E_0^2 \nu_0^4, \quad (6)$$

$$I_{\text{St}_m} \propto \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right)_0 Q_m^2 E_0^2 (\nu_0 - \nu_m)^4, \quad (7)$$

$$I_{\text{anti-St}_m} \propto \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right)_0 Q_m^2 E_0^2 (\nu_0 + \nu_m)^4. \quad (8)$$

Indeksas m nusako, kad juostos intensyvumas yra sąlygotas m -tojo normaliojo virpesio. Iš šių lygčių nesunku pastebėti, kad Reilio sklaidos intensyvumas yra didesnis nei Ramano Stokso sklaidos intensyvumas apie tūkstantį kartų. Dėl mažo Ramano sklaidos intensyvumo šia metodika galima registruoti spektrus medžiagų, kurių koncentracijos yra ne mažesnės nei 10 mM.

5. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektroskopija

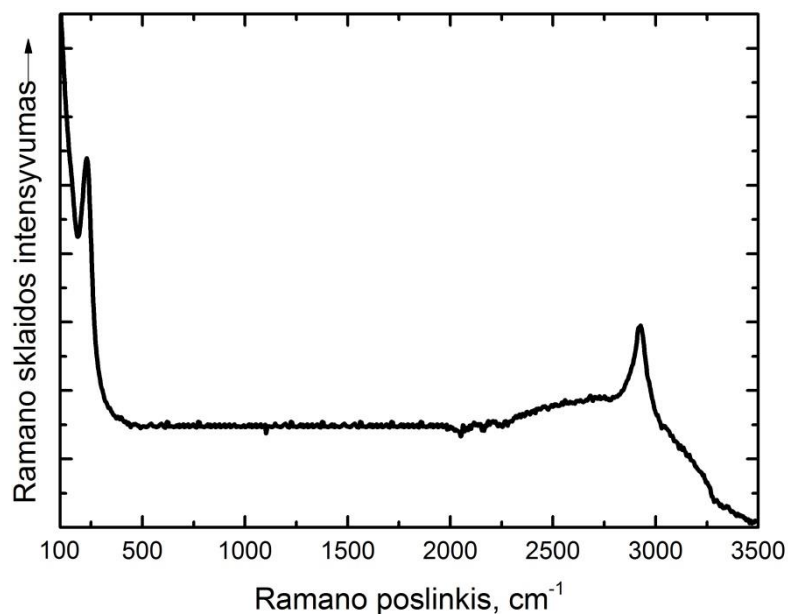
Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (*SERS*) reiškinį 1973 metais kartu su savo kolegomis atrado britų chemikas *Martin Fleischman* [18]. Tiriant piridino molekulės adsorbciją ant elektrocheminiu būdu šiurkštinto elektrodo buvo pastebėta, kad piridino molekulės Ramano sklaidos intensyvumas yra sustiprinamas keliomis eilėmis. Stiprinimo prigimties *Martin Fleischman* grupė negalėjo paaiškinti, todėl buvo teigiama, kad signalo intensyvumo padidėjimą lemia padidėjusi adsorbuotų ant aktyvuoto elektrodo paviršiaus piridino molekulių koncentracija. Išsamus paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos aiškinimas literatūroje pasirodė tik 1977 metais. Dvi nepriklausomos

mokslininkų grupės pateikė skirtingus modelius, paaiškinančius stiprinimo prigimtį. Šie modeliai yra vadinami (I) krūvio pernašos ir (II) elektromagnetiniu modeliu. Abu modeliai yra teisingi ir realiuose *SERS* eksperimentuose šie stiprinimo mechanizmai gali būti svarbūs. Todėl stiprinimo efektas negali būti paaiškintas tik elektromagnetiniu ar tik krūvio pernašos modeliais, ir reikia atsižvelgti į abu.

5.1. Krūvio pernašos modelis

Pagal šį modelį paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos reiškinys stebimas dėl krūvio pernašos komplekso tarp tiriamos molekulės ir metalo paviršiaus susidarymo [19]. Toks kompleksas susidaro ne visada, nes reikalinga stipri tiriamos molekulės chemisorbcija ant metalo paviršiaus. Kadangi ne visos molekulės gali sudaryti cheminius ryšius su metalo paviršiumi, krūvio pernašos indėlis į Ramano sklaidos signalo stiprinimą yra ženklus tik išskirtiniais atvejais. Be to, šiuo modeliu galima paaiškinti tik nedidelę Ramano sklaidos signalo stiprinimo dalį. Maksimali signalo stiprinimo faktorius, kurį nulemia krūvio pernašos kompleksų susidarymas, vertė gali būti iki 100 kartų. Dėl šių priežasčių, dažniausiai, į krūvio pernašos modelį nėra atsižvelgiama ir todėl detalai jis nėra aptariamas.

Kitas svarbus efektas kurio priežastimi yra krūvio pernaša yra taip vadinamas paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos kontinuumo susidarymas. *SERS* kontinuumas - tai pastovus emisijos fonas, stebimas *SERS* spektruose. Šis fonas, pateiktas 3 pav., blogina spektrų kokybę sumažindamas spektrinių juostų signalo ir triukšmo santykį. Fono susidarymas yra aiškinamas molekulės ir paviršiaus plazmonų sąveika [20], tačiau iki šiol dar nerasta būdu kaip jį eliminuoti.



3 pav. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektruose registruojamas fonas.

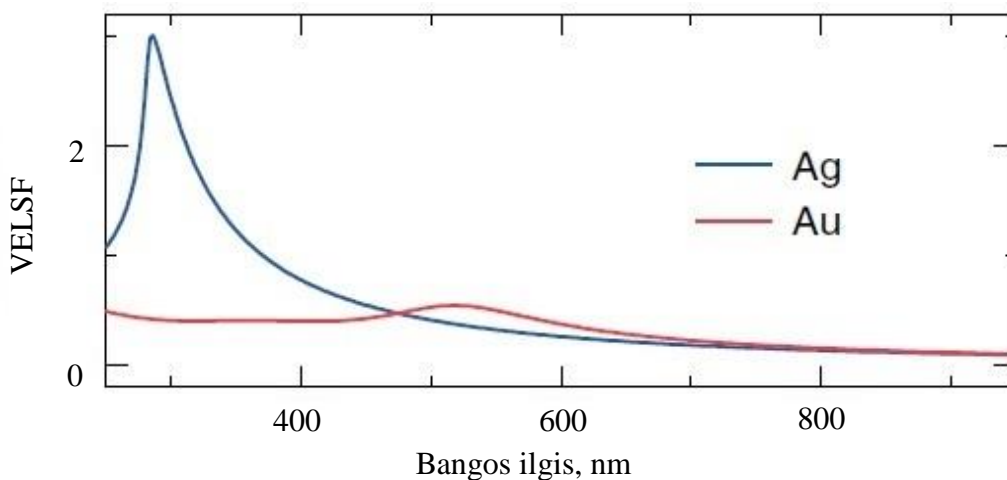
5.2. Elektromagnetinis modelis

Elektromagnetinis modelis, kuriame nagrinėjamas šviesos bangos elektrinio lauko poveikis metalo paviršiui, paaiškina pagrindinį Ramano sklaidos stiprinimo faktoriaus sandą. Šis modelis yra bendresnis, nes juo aiškinamas spektrinių signalų stiprinimas, kuris yra stebimas net ir tada, kai nėra cheminio ryšio tarp tiriamos molekulės ir metalo paviršiaus. Dėl to, nagrinėjant paviršiaus sustiprintą Ramano sklaidą elektromagnetinis modelis būtinai turi būti panaudotas.

Elektromagnetinis modelis paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos efektą aiškina žadinančios spinduliuotės ir metalo nanodalelės paviršiuje esančių elektronų sąveika – taip vadinamu, paviršiaus plazmonų rezonansu [21]. Dėl paprastumo nagrinėjant šį modelį yra įvedamas naujas dydis, vadinamas vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriumi (VELSF). Šis dydis nusako, kiek kartų nagrinėjamame erdvės taške dėl metalo nanodalelių padidėja elektromagnetinio lauko stipris. VELSF yra apskaičiuojamas pagal (9) formulę nustatant intensyvumą, kai nagrinėjamas erdvės taškas yra šalia metalo paviršiaus ir kai metalo paviršiaus nėra šalia nagrinėjamo taško, santyki.

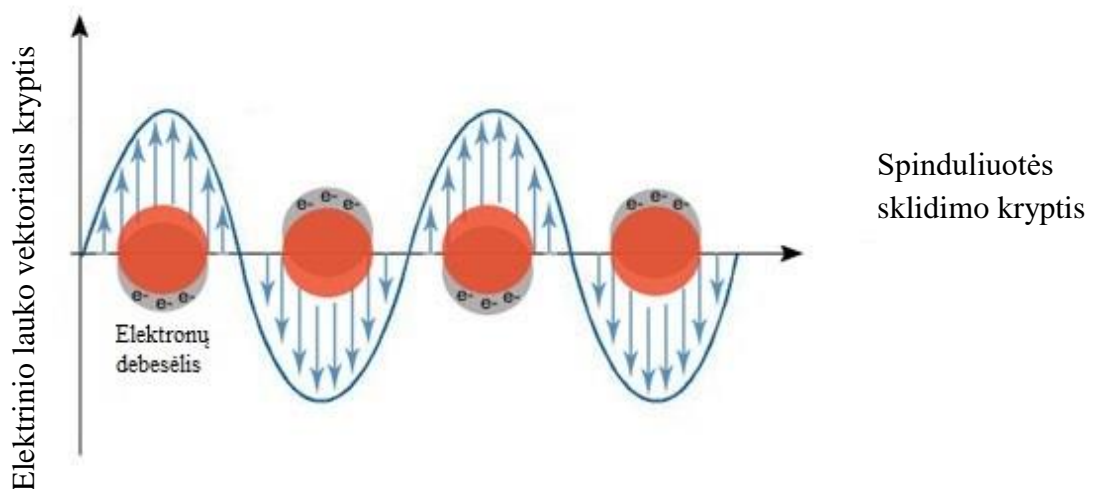
$$\text{VELSF}(r, \omega) = \frac{|E(r, \omega)|^2}{|E_0(r, \omega)|^2}, \quad (9)$$

čia $E(r, \omega)$ – elektrinio lauko stipris erdvės vietoje, kur yra lokalizuota tiriamoji molekulė, kai šalia yra metalo paviršius, $E_0(r, \omega)$ - elektrinio lauko stipris toje pačioje vietoje, kai šalia nėra metalo paviršiaus. Bendru atveju, vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktorius priklauso ir nuo lokalizacijos vektoriaus r , ir nuo spinduliuotės dažnio ω , o jo vertės yra mažos ir dažnai nesiekia net vieneto. Vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus priklausomybės nuo bangos ilgio (aukso ir sidabro metalams) yra pateiktos 4 pav.



4 pav. Sidabro ir aukso vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktorių priklausomybės nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio [21].

Vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus vertė dėl elektromagnetinės spinduliuotės sąveikos su metalo paviršiumi gali padidėti keliomis eilėmis. Šį efektą galima paaiškinti nagrinėjant supaprastintą sistemą – vienos metalinės nanodalelės sąveiką su į ją krintančia spinduliuote. Nanodalelės matmenys yra daug mažesni už Ramano sklaidą žadinančios spinduliuotės bangos ilgį $r \ll \lambda$ (r – nanodalelės spindulys, λ – spinduliuotės bangos ilgis). Todėl nanodalelės atžvilgiu šios spinduliuotės elektrinis laukas kiekvienu bangos pusperiodžiu gali būti laikomas vienalyčiu. Vienalytis elektrinis laukas sąveikaudamas su nanodalele jos paviršiuje perskirsto laidumo elektronus. Persiskirsčius paviršiniams nanodalelės elektronams yra sukuriamas nanodalelės elektrinis dipolinis momentas. Tokios sistemos schema pateikiama 5 pav.



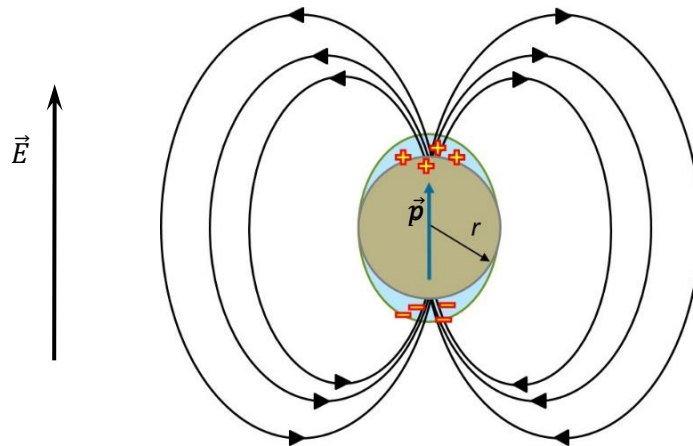
5 pav. Elektromagnetinės spinduliuotės ir metalinės nanodalelės sąveikos schema.

Sklindant bangai jos elektrinis laukas nanodalelės atžvilgiu osciliuoja (kiekvienu pusperiodžiu keičiasi elektrinio lauko kryptis), todėl yra sukuriamos metalo nanodalelės paviršinių laidumo elektronų tankio osciliacijos. Šios osciliacijos ir yra vadinamos plazmonais. Tuo metu, išvedus elektronų debesėlį iš pusiausvyros, yra sukuriamas ir krūvio skirtumas skirtinguose nanodalelės pusėse. Šie efektai yra apibūdinami osciliuojančiu vietiniu elektriniu dipoliu, kuris taip pat yra vadinamas indukuotuoju dipoliu. Sferinės formos metalinėje nanodalelėje indukuoto elektrinio dipolio momento skaitinė vertė apytiksliai yra išreiškiama (10) formule.

$$p \propto \left(\frac{\varepsilon(\lambda) - \varepsilon_M}{\varepsilon(\lambda) + 2\varepsilon_M} \right), \quad (10)$$

čia p – indukuotasis dipolinis momentas, $\varepsilon(\lambda)$ – metalo nanodalelės dielektrinė skvarba, ε_M – aplinkos, kurioje yra patalpinta nanodalelė, dielektrinė skvarba. Indukuotasis elektrinis dipolis sukuria elektrinį lauką aplink nanodalelę. Sukurtas elektrinis laukas yra vadinamas lokaliuoju elektriniu lauku. Nanodalelės sąveikos su išoriniu vienalyčiu elektriniu lauku rezultatai - krūvio

persiskirstymas nanodalelėje, indukuotas dipolinis momentas (\vec{p}) ir dipolio kuriamo elektrinio lauko linijos yra grafiškai atvaizduoti 6 pav. Išorinio elektrinio lauko (\vec{E}) kryptis žymima juoda rodykle. Simboliu r žymimas nanodalelės spindulys.



6 pav. Grafinis nanodalelėje indukuoto dipolio ir jo kuriamo elektrinio lauko atvaizdavimas.

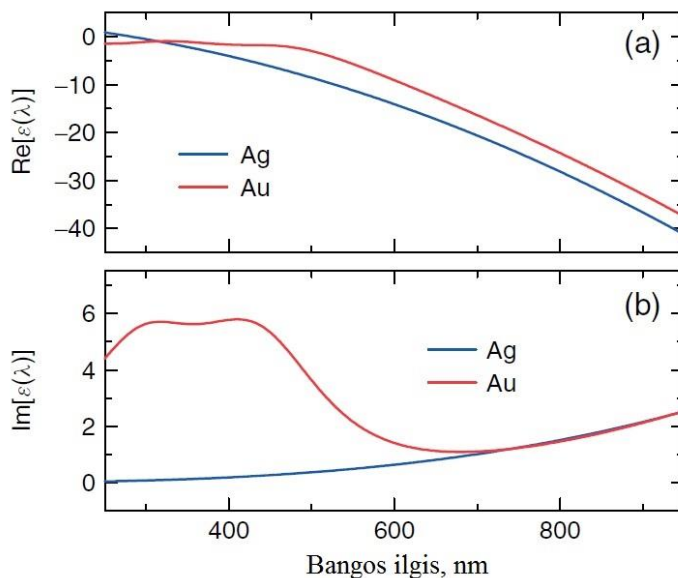
Dėl mažų nanodalelės matmenų dipolio kuriamo elektrinio lauko linijos sutankėja ties indukuotojo dipolio galais. Šiuose taškuose lokalojo elektrinio lauko ir krintančios spinduliuotės kuriamo elektrinio lauko suminis elektrinis laukas yra stipresnis negu krintančios spinduliuotės kuriamas elektrinis laukas. Todėl, jei tiriama molekulė bus šalia nanodalelės, ją veiks stipresnis elektrinis laukas ir Ramano sklaidos signalas bus stipresnis nei molekulės atitolusios nuo nanodalelės (arba tirpale be metalo nanodalelių) atveju.

Dar stipresnį suminį elektrinį lauką, o tuo pačiu ir vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktorių, galima gauti, jei yra tenkinama rezonanso sąlyga. Šią sąlygą galima išvelgti metalo nanodalelėje indukuoto dipolio momentą išreiškiančioje formulėje (10). Iš šios formulės seka, kad, jei metalo, iš kurio padaryta nanodalelė, dielektrinė skvarba bus priešingo ženklo ir dvigubai didesnė už aplinkos, į kurią yra patalpinta nanodalelė, dielektrinę skvarbą, bus tenkinama rezonanso sąlyga ir indukuotas dipolinis momentas ženkliai išaugs. Tuo pačiu, padidės ir lokalojo elektrinio lauko stipris bei suminio elektrinio lauko stipris. Tačiau būtina paminėti, kad tenkinant rezonanso sąlygą, rezonanso dažnis taip pat priklauso nuo elektronų efektyviosios masės, bendrojo krūvio, krūvio tankio bei nanodalelės dydžio.

Tenkinant rezonanso sąlygą vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus vertės gali siekti net $10^6 - 10^9$. Tačiau tenkinti rezonanso sąlygą nėra lengva, nes reikalingas metalas, kurio dielektrinė skvarba yra neigiama. Rezonanso sąlygą tenkina kai kurie metalai, pavyzdžiui, auksas, sidabras, varis.

Bendru atveju, spinduliuotės nepraleidžiančių medžiagų dielektrinė skvarba yra kompleksinis dydis, kurio realioji dalis apibūdina dispersiją, o menamoji dalis siejama su sugertimi. Dviejų metalų (aukso ir sidabro), dažniausiai naudojamų paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektroskopijoje,

dielektrinių skvarbų priklausomybės nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio yra pateiktos literatūroje [21] (7 pav.).



7 pav. Sidabro ir aukso realios ir menamos dielektrinės skvarbos dedamųjų priklausomybė nuo bangos ilgio [21].

Kaip matyti 7 pav., sidabro ir aukso dielektrinės skvarbos realiosios dalys yra neigiamos 300 nm - 1000 nm bangų ilgių srityje. Dėl to, šie metalai beveik idealiai gali tenkinti nanodalelėje indukuoto elektrino dipolio momento rezonanso sąlygą. Vienintelis sąlygos tenkinimą ribojantis veiksnys yra menamoji dielektrinės skvarbos dalis. Vis dėlto, jos pastarosios vertės nėra didelės ir nukrypimai nuo rezonanso sąlygos yra nedideli.

Norint pilnai suprasti elektromagnetinį modelį, reikia panagrinėti ir metalų dielektrinę skvarbą bei jos vertę lemiančius veiksnius. Nagrinėjant metalų ar puslaidininkių dielektrinę skvarbą yra naudojamas Drudės modelis [22], pagal kurį laisvieji elektronai metalė juda laisvai tarp visų atomų. Dėl paprastumo elektronai yra nagrinėjami kaip plazma, kurios osciliacijų dažnis nusakomas tokia formule

$$\omega_P^2 = \frac{n_e e^2}{m_{ef} \epsilon_0}, \quad (11)$$

čia n_e – laisvųjų elektronų tankis, e – elektrono krūvis, m_{ef} – efektinė elektrono masė. Efektinė elektrono masė yra lygi elektrono masei, jei sistema pasižymi parabolės formos potencialu. Kitu atveju efektinė masė skiriasi nuo elektrono masės. Pavyzdžiui, nustatyta efektinė masė sidabru $m_{ef}(Ag) = 0,96$ elektrono masės, auksui $m_{ef}(Au) = 0,99$ elektrono masės. Laisvųjų elektronų tankis sidabru $n_e(Ag) = 5,76 \cdot 10^{28} m^{-3}$, o auksui $n_e(Au) = 5,90 \cdot 10^{28} m^{-3}$.

Išskaičius laisvųjų elektronų indėlių, dielektrinės funkcijos išraiška tuomet užrašoma tokia lygtimi

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\gamma_{le}} + \sum_j \frac{\omega_{pj}^2}{\omega_j^2 - \omega^2 - i\omega\gamma_j}, \quad (12)$$

čia ω_j – tikrinis surištų elektronų dažnis, γ_j – harmoninio osciliatoriaus slopinimo koeficientas, γ_{le} – laisvųjų elektronų slopinimo koeficientas. Paskutinis (12) lygties narys apibūdina surištųjų elektronų indėlį. Jis yra gaunamas sprendžiant harmoninio osciliatoriaus lygtį, užrašytą nagrinėjant krūvininkus osciluojančiame elektriniame lauke. Antrasis lygties narys apibrėžia dielektrinės skvarbos indėlį, nulemtą laisvųjų elektronų.

Laisvųjų elektronų slopinimo koeficientas yra susietas su relaksacijos laiku τ . Jis apibūdina laiką, po kurio laisvųjų elektronų judėjimas nuslopsta dėl sąveikų su kitais krūvininkais ir gardelės defektais. Bendriausiu atveju slopinimo koeficientas gali būti išreikštas tokia lygtimi

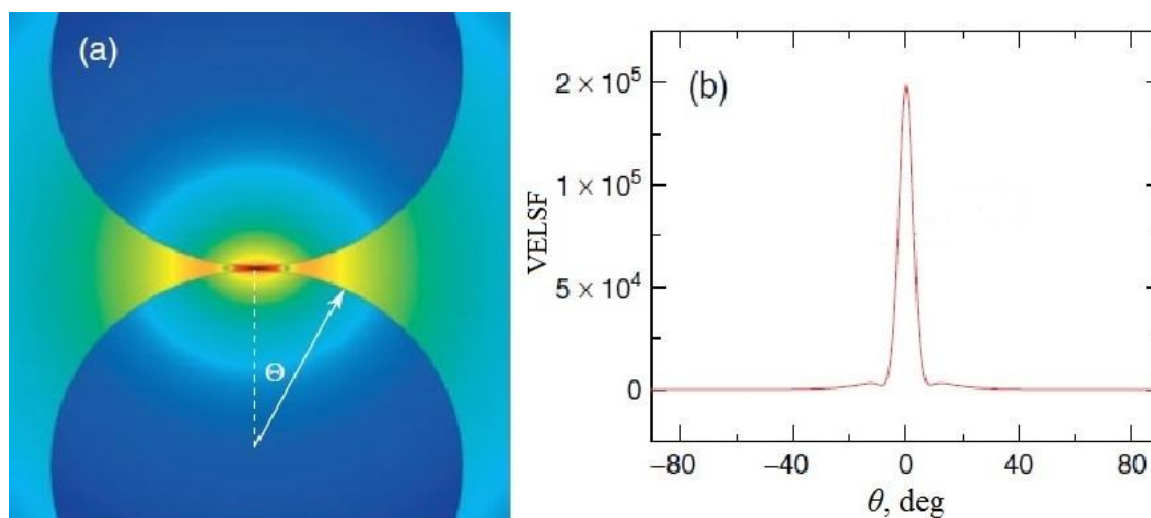
$$\gamma_{le} = \tau^{-1} = \sum_i \tau_i^{-1} = \tau_{\text{taškiniai defektai}}^{-1} + \tau_{\text{dislokacijos}}^{-1} + \tau_{\text{kristalo riba}}^{-1} + \tau_{\text{paviršius/sandūra}}^{-1} + \tau_{\text{el-fononas}}^{-1} + \tau_{\text{el-el}}^{-1}. \quad (13)$$

Relaksacijos laikas sidabru $\tau(\text{Ag}) = 3,7 \cdot 10^{-14}$ s, auksui $\tau(\text{Au}) = 0,9 \cdot 10^{-14}$ s.

Taigi, galima pastebėti, kad realiosios dielektrinės skvarbos komponentės skaitinė vertė labiausiai priklauso nuo plazmonų dažnio, o pastarasis priklauso nuo laisvųjų elektronų tankio ir efektinės elektrono masės. Kadangi minėtieji parametrai aukso ir sidabro metalams yra panašūs, tai šių metalų realiosios dielektrinės skvarbos komponentės priklausomybės nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio grafikai yra panašūs. Menamosios dielektrinės skvarbos komponentės priklausomybės nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio grafikai sidabro ir aukso metalams skiriasi dėl skirtingų relaksacijos laikų, kuriuos nulemia efektai, paminėti nagrinėjant (13) lygtį. Be to, menamosios dalies skirtumus lemia ir tarpjuostiniai elektronų šuoliai bei laidumo juostos energijos grafiko nukrypimai nuo parabolės formos. Detaliau šie aspektai nebus nagrinėjami.

Realiomis sąlygomis tiriama molekulė sąveikauja ne su viena nanodalele, o su jų sandauba, todėl reikia atsižvelgti ir į efektus, kurie vyksta, kai šaltinio elektromagnetinė spinduliuotė krinta į metalinių nanodalelių sandauba. Vienas tokių efektų, tai stiprinimo faktoriaus priklausomybė nuo atstumo tarp nanodalelių. Norint pasiekti optimalų stiprinimą, šis atstumas negali būti nei per didelis, nei per mažas. Jei atstumas tarp nanodalelių yra per didelis (~20 nm), stiprinimo efektas sumažėja, nes lokalusis elektrinis laukas, sukurtas indukuotojo dipolio, silpsta tolstant nuo nanodalelės. Tačiau jei atstumas tarp nanodalelių yra per mažas (< 1 nm), dalelės „perdengia“ viena kitą (suformuoja vientisą struktūrą) ir stiprinimo efektas visai išnyksta. Didžiausia stiprinimo vertė yra registruojama tuomet, kai atstumas tarp nanodalelių yra šiek tiek daugiau nei vienas nanometras. Tokiu atveju, kai

atstumas yra optimalus, galima stebėti dar vieną efektą, vykstantį nagrinėjant nanodalelių sandarą. Šalia viena kitos esančių nanodalelių indukuotieji elektriniai dipoliai sąveikauja tarpusavyje ir vienas kitą sustiprina. Dėl sąveikos jų vietiniai elektriniai laukai taip pat sustiprėja ir tarp nanodalelių suminio elektrinio lauko vertė dar labiau išauga. Šis efektas yra vadinamas suporuotųjų plazmonų rezonansu, o erdvės sritis, kurioje elektrinio lauko vertė yra didžiausia, yra vadinama karštoju tašku (angl. *hot-spot*). Tačiau suporuotųjų plazmonų rezonanso poveikio lemiamą vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus vertė labai priklauso nuo tiriamos molekulės padėties atžvilgiu tiesės, jungiančios nanodalelių centrus. Pavyzdžiui, jei kampo, kurį sudaro molekulės padėtį su vienos iš sąveikoje dalyvaujančių nanodalelių centru jungianti tiesė ir abiejų sąveikaujančių nanodalelių centrus jungianti tiesė, vertė padidės 2,6 laipsnio, vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus vertė sumažės dvigubai. Tokia stipri priklausomybė yra aiškinama skirtingomis rezonanso sąlygomis erdvės taškuose tarp dviejų nanodalelių. Karštojo taško grafinis atvaizdavimas ir vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus priklausomybė nuo kampo, kurį sudaro tiesė, jungianti nanodalelių centrus ir tiesė, jungianti vienos iš sąveikaujančių nanodalelių centrą su molekulės padėtimi, yra pateikti 8 pav.



8 pav. Grafinis karštojo taško atvaizdavimas (a); Vietinio elektrinio lauko stiprinimo faktoriaus (VELSF) priklausomybė nuo kampo, nusakančio molekulės padėtį atžvilgiu tiesės, jungiančios nanodalelių centrus (b) [21].

5.3. Optinės nanodalelių savybės

Koloidiniai nanodalelių tirpalai dažnai charakterizuojami pagal jų spalvą, o aprašant koloidinių tirpalų sintezę yra nurodomos tirpalų spalvos ir jų pokyčiai paruošimo metu. Todėl nagrinėjant koloidinius nanodalelių tirpalus yra svarbu suprasti kaip nanodalelių dydis siejasi su jų optinėmis savybėmis.

Optinės nanodalelių savybės yra nagrinėjamos naudojantis *Mie* sklaidos teorija. Bendru atveju, tai plokščiosios bangos sklaida sferinės formos dalelėmis. Tačiau yra ir išplėstų matematinių modelių, kurie nagrinėja ne sferinių dalelių sklaidą. Nanodalelių optinės savybės priklauso nuo daugelio veiksnių kaip nanodalelių medžiagos savybės, nanodalelių dydis, forma, aplinkos parametrai ir kitų. Taip pat optines savybes nulemia ir nanodalelių ansamblio parametrai – tankis, atstumas tarp dalelių ir kiti.

Paprasčiausiai nanodalelių optinių savybių priklausomybė nuo jų dydžio yra paaiškinama remiantis nanodalelių sugerties skerspjūvio (σ) lygtimi, kuri yra išvedama nagrinėjant nanodalelių, esančių skaidrioje dielektrinėje terpėje, sklaidą pagal *Mie* teoriją:

$$\sigma(\omega) = 12\pi R^3 \frac{\omega}{c} \varepsilon_M^{3/2} \frac{\varepsilon''(\omega)}{(\varepsilon'(\omega) + 2\varepsilon_M)^2 + \varepsilon''(\omega)^2}, \quad (14)$$

čia R – nanodalelės spindulys, ε_M – aplinkos dielektrinė skvarba, $\varepsilon'(\omega)$, $\varepsilon''(\omega)$ – reali ir menama metalo, iš kurio pagaminta nanodalelė, dielektrinės skvarbos komponentės. Ankstesniame skyriuje aptarta kaip dielektrinė skvarba priklauso nuo bangos ilgio, todėl pasinaudojus dielektrinės skvarbos išraiška - (12) lygtis, galima susieti dalelės dydį su sklaidomos spinduliuotės dažniu (arba bangos ilgiu). Galima pastebėti, kad (14) lygtyje taip pat yra rezonanso sąlyga, kuri, žinoma, sutampa su nagrinėta ankstesniame skyriuje. Dėl tenkinamos rezonanso sąlygos gaunama plazmonų sugerties juosta.

6. Paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos registravimo metodai

Jau praėjo daugiau nei keturiasdešimt metų nuo paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos atradimo ir yra sukurta daug šios metodikos realizavimo būdų. Šiuo metu naudojamos įvairios metodikos, ne tik pritaikytos specialiesiems tyrimams, bet ir specializuotos atskiroms molekulėms [23]. Viena netradicinių metodikų yra metalo adatos paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida. Šiai metodikai yra būdinga aukšta skyra ir ją naudojant galima registruoti pavienes molekules ar atlikti ląstelės vidinės sandaros vaizdinimą [24]. Vis dėlto, yra išskiriamos trys pagrindinės paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos eksperimento realizavimo metodikos [25]. Jos yra klasifikuojamos pagal substratus, naudojamus taikant kiekvieną šių metodikų. Substratai yra:

- Elektrodo paviršius,
- Nanostruktūrizuoti metaliniai paviršiai,
- Koloidiniai nanodalelių tirpalai.

Elektrodo paviršius, kaip substratas, yra naudojamas elektrocheminiame paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos metodikos taikyme. Ši metodika (angl. *E-SERS*) apibūdinama gera tiriamų molekulių adsorbcija, kuri yra valdoma keičiant potencialą, paduodamą į darbinį elektrodą. Molekulių adsorbcijos kontrolė suteikia stabilumo - didesnio eksperimento rezultatų atsikartojamumo. Deja, metodikos pritaikymas yra sudėtingas, nes reikia tikslų ir brangių elektronikos prietaisų, o taip pat elektrocheminių procesų išmanymo. Taikant šią metodiką nėra galimas greitas registravimas, nes substrato paruošimo (elektrodo šiurkštinimo) procesas yra lėtas, kadangi reikia taikyti elektrocheminius procesus. Taip pat užtrunka ir bandinio nusodinimo ant elektrodo procedūra, o po kiekvieno matavimo elektrodas turi būti ruošiamas iš naujo (jį reikia mechaniškai nupoliruoti ir vėl šiurkštinti). Be to, susiduriama su bandinio kaitimo problema, o norint ją pašalinti yra reikalinga papildoma įranga [26]. Taipogi, stiprinimo faktorius, pasiekiamas naudojant šią metodiką, dažniausiai yra mažesnis nei pasiekiamas kitomis metodikomis. Dėl sudėtingumo ir ilgo pasiruošimo laiko *E-SERS* metodika yra naudojama rečiau nei kitos.

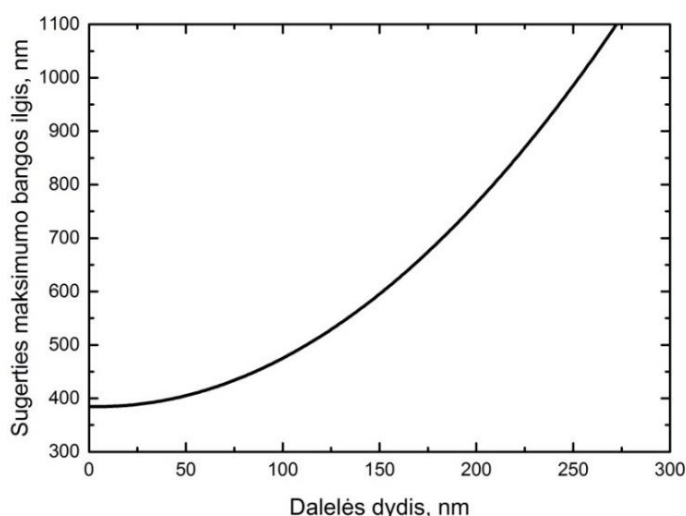
Nanostruktūrizuotų metalinių paviršių substratai – tai substratai, kurie yra gaminami metalų garinimo, litografijos, lazerinės abliacijos, savitvarkių sluoksnių ar kitomis metodikomis. Tokius substratus dažniausiai dideliais kiekiais gamina įvairios firmos (*Renishaw (Klarite)*, *Silmeco* ir kt.) ir užsiima komerciniu jų tiekimu. Kadangi šie substratai sukuriama iš tvarkingų atsikartojančių struktūrų, naudojantis jais eksperimento rezultatai atkartojami dažniau nei kitose metodikose. Taip pat dėl išvystytų gamybinių technologijų substratų paviršius gali būti padengiamas įvairių formų ir dydžių nanodariniams, kurie gali būti funkcionalizuojami (prijungiamos įvairios funkcinės grupės). Todėl nanostruktūrizuotų metalinių paviršių substratų stiprinimo faktoriaus vertės yra didelės bei jie gali būti specializuojami tam tikrai molekulių grupei (naudojami kaip biojutikliai) [27]. Tačiau tokio tipo substratai yra brangūs, nes gamybos technologijos yra sudėtingos, o patys gamybos procesai ilgai trunkantys. Taip pat nanostruktūrizuotų metalinių paviršių substratai yra vienkartiniai, nors didžioji dalis juos gaminančių ir parduodančių įmonių teigia atvirkščiai. Substratai turėtų būti laikomi vienkartiniais, nes, juos panaudojus, dėl geros molekulių cheminės ar fizinės adsorbcijos, nėra paprastų būdų, leidžiančių pašalinti tiriamas molekules nuo paviršiaus nepažeidžiant paties substrato. Nepaisant to, dalis komercinių substratų nėra stabilūs. Dėl žadinančios lazerinės spinduliuotės poveikio substratai patiria struktūrinius pokyčius, kurių pasekmė - keletą kartų sumažėjęs signalas ar visiškas signalo išnykimas. Dėl pastarosios priežasties, didelės kainos ir vienkartinio panaudojimo tokie substratai nėra tinkami rutininiam matavimams.

Trečioji substratų, gaminamų iš koloidinių nanodalelių tirpalų, grupė yra pati plačiausia, kadangi literatūroje aprašytų koloidinių tirpalų paruošimo būdų skaičius yra itin didelis. Taip pat substrato gamybos būdų iš koloidinių tirpalų yra ne vienas. Reikia paminėti, kad sausi substratai yra naudojami tada, kai Ramano sklaidos spektrai yra registruojami *NIR* srityje. Su kitos srities

spinduliuotėmis dažniausiai naudojami bandinio ir koloidinio tirpalo mišinys. Taigi, substratų paruošimas iš koloidinių nanodalelių tirpalų yra lengvas ir, lyginant su jau aptartų substratų ruošimu, greitas. Substratų paruošimo procedūra yra daug lengvesnė ir pigesnė nei nanostruktūrizuotų metalinių paviršių substratų ruošimo procedūra bei trunka daug trumpiau nei elektrodo paviršiaus paruošimas. Naudojant šiuos substratus galima pasiekti ir net viršyti stiprinimo faktorių vertes, gaunamas naudojant nanostruktūrizuotų metalinių paviršių substratus. Be to, yra galimybė lengvai paruošti įvairių formų, sudėties (vieno ar kelių metalų) ir dydžių nanodaleles. Tai leidžia optimaliai pritaikyti šiuos substratus kiekvienai naudojamai spektrų registravimo sistemai. Pavyzdžiui, keičiant nanodalelių dydį, galima keisti plazmonų rezonansą tenkinantį bangos ilgį ir taip pastarojo vertę sutapatinti su eksperimentų metu naudojamos monochromatinės lazerinės spinduliuotės bangos ilgio verte. Sferinės formos nanodalelių dydis su plazmonų rezonanso bangos ilgiu siejamas (15) formule

$$d = \sqrt{24,01 + 100(\lambda_{\max} - 385)} + 4,9, \quad (15)$$

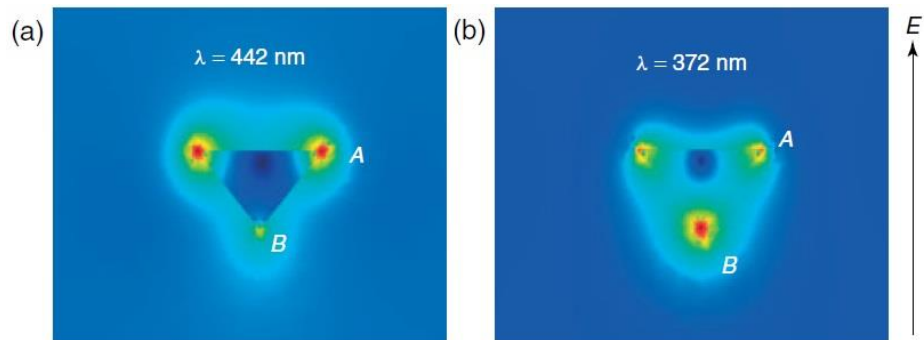
čia d (nm) – nanodalelės skersmuo, λ_{\max} (nm) – koloidinio tirpalo sugerties spektro maksimumo padėtį nusakantis bangos ilgis. Ši lygtis yra išvesta iš *Mie* sklaidos teorijos [28]. Teorinė kalibracijos kreivė, gauta nubraižius priklausomybę, išreikštą (15) lygtimi, yra pateikta 9 pav.



9 pav. Sferinių nanodalelių šviesos sugerties maksimumo padėties priklausomybė nuo vyraujančio dalelių dydžio.

Yra žinoma, kad keičiant nanodalelių formą, galima pasiekti didesnę stiprinimo faktoriaus vertę. Šis efektas aiškinamas panašiai kaip ir žaibolaidžio efektas elektrostatikos teorijoje ir yra susijęs su mažesniais nei krintančios spinduliuotės bangos ilgis nanodalelės matmenimis bei indukuoto dipolio elektrinio lauko jėgų linijų tankiu. Panašiai kaip ir laidininkų paviršiaus vietose, kurios charakterizuojamos mažu kreivumo spinduliu, kaupiasi krūvis, apšvietus nanodalelę, ties smailiais jos galais yra „stebima“ didžiausia elektrinio lauko stiprio vertė. Šio poveikio grafinė

ilustracija yra pateikta 10 pav. Raudona spalva pažymėtos sritys, kuriose elektrinis laukas yra stipriausias, o mėlyna spalva pažymėtos sritys, kuriose elektrinis laukas yra silpnas. Svarbu paminėti, kad lauko stipris prie nanodalelių smailių priklauso ir nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio.



10 pav. Nanodalelių formos įtaka stiprinimo faktoriaus vertei, kai nanodalelė apšviečiama $\lambda = 442$ nm (a); $\lambda = 372$ nm (b) bangos ilgio spinduliuote [21].

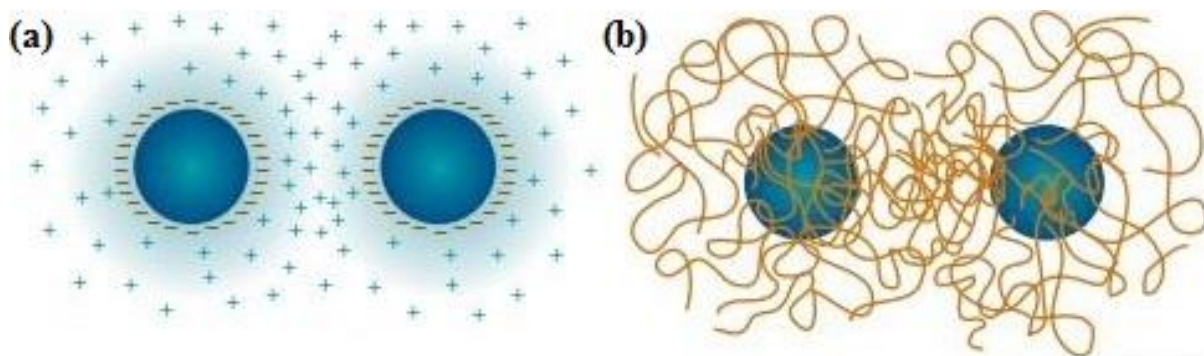
Naudojant iš koloidinių nanodalelių tirpalų paruoštus sluoksnius yra daug sunkiau pasiekti gerą eksperimento rezultatų atsikartojamumą. Kadangi džiovinant koloidinius nanodalelių tirpalus, nanodalelių pasiskirstymas labai priklauso nuo įvairių aplinkos sąlygų, tokių kaip atmosferos slėgis, temperatūra, drėgmė ir kiti, nėra lengva pagaminti sluoksnius, turinčius tokį patį nanodalelių išsidėstymą. Šiek tiek pagerinti sluoksnių paruošimą galima panaudojus savitvarkių struktūrų savybes. Taip pat yra bandoma, kontroliuojant aplinkos sąlygas, iš koloidinių tirpalų sukurti kuo stabilesnius sluoksnius [29].

II. Eksperimentinė dalis

1. Sidabro nanodalelių koloidiniai tirpalai

Šio darbo metu buvo naudojami dviejų rūšių sidabro nanodalelių koloidiniai tirpalai. Įvairiais cheminiais metodais pagaminti tirpalai skyrėsi dalelių dydžiais, formomis bei dalelių koncentracija. Tirpalai buvo gaminami pritaikius dvi literatūroje aprašytas nanodalelių sintezės metodikas, kurios yra aptartos šiame skyriuje.

Visas nanodalelių sintezės procedūras galima suskirstyti į dvi grupes: (I) vadinamosios „iš apačios aukštyn“ (angl. *bottom-up*) ir (II) - „iš viršaus žemyn“ (angl. *top-down*). Jos skiriasi tuo, kad pirmosios procedūrų grupės atveju iš paprastesnių ir smulkesnių cheminių darinių cheminių reakcijų metu yra suformuojamos nanodalelės, o antrosios procedūrų grupės atveju - iš stambių cheminių darinių yra išpjaustomos ar kitokiu būdu suformuojamos *SERS* metodikai tinkamo dydžio nanodalelės. Šiame darbe buvo naudojama pirmoji procedūrų grupė. Tai reiškia, kad nanodalelės formuojamos iš smulkesnių cheminių darinių (jonų, esančių vandeniniame tirpale) į stambesnius darinius tam panaudojant oksidacijos - redukcijos reakcijas. Tokiu būdu yra suformuojamos norimos formos bei dydžio metalo nanodalelės. Koloidinių tirpalų stabilumą lemia nanodalelių stabilumas, nes jos gali arba vėl skilti į smulkesnes dalis, arba agreguotis ir sudaryti didelius spiečius. To išvengiama stabilizuojant nanodaleles elektrostatinės arba sterinės stabilizacijos metodais. Elektrostatiškai dalelės stabilizuojamos prie jų paviršių „prikabinant“ įvairius jonus. Šie jonai apsupa daleles, o tą patį krūvį turintys jų apvalkalėliai dėl elektrostatinės stūmos jėgų neleidžia dalelėms priartėti vienai iki kitos. Sterinė stabilizacija pasiekama prie nanodalelių paviršiaus prijungus ilgagrاندžius polimerus, vadinamus surfaktantais. Tokia stabilizacija yra mechaninis izoliavimas. Iš surfaktantų sudaryti nanodalelių apvalkalėliai nereaguoja vienas su kitu, todėl tirpale nanodalelės nesąveikauja tarpusavyje. Abiejų nanodalelių stabilizacijos metodų iliustracija yra pateikta 11 pav.



11 pav. Elektrostatinė (a) ir sterinė (b) nanodalelių stabilizacijos metodai koloidiniuose tirpaluose.

1.1. Tirpalų paruošimui naudotos medžiagos ir prietaisai

Tirpalų ruošimo metu naudojami šie prietaisai: laboratorinės elektroninės svarstyklės (*Ohaus*, „*Pioneer*“), magnetinė maišyklė su kaitinamu pagrindu (*Thermo scientific*, „*Cimaerac*“), vandens distiliavimo ir jonų pašalinimo aparatas (*Thermo scientific*, „*Easy Pure Rodi*“), pipetės (*Eppendorf*), stikliniai indai, ledo vonelė.

Cheminių medžiagų tirpalai, naudoti sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų ruošimui, buvo sumaišyti iš anksto, ištirpinus atitinkamus cheminių medžiagų kiekius distiliuotame vandenyje. Naudotos cheminės medžiagos: trinatrio citratas ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), (*Merck-chemicals*, 99 %, Vokietija), poli(natrio 4-stireno sulfonatas) (PNSS), (*Sigma-Aldrich*, $M_w=70000$, JAV), natrio borohidridas (NaBH_4), (*Sigma-Aldrich*, 99 %, Vokietija), sidabro nitratas (AgNO_3), (*Merck-chemicals*, 99 % Vokietija), askorbo rūgštis ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$).

1.2. Sferinių sidabro nanodalelių tirpalo paruošimas

Sferinių nanodalelių koloidinis tirpalas darbe buvo ruošiamas pagal metodiką, aprašytą *Lee* ir *Meisel* [30]. Pirmiausia į stiklinį indą įpilama 50 ml distiliuoto vandens ir jame ištirpinama 9 mg sidabro nitrato. Po to stiklinis indas su sidabro nitrato tirpalu pastatomas ant magnetinės maišyklės su kaitinamu pagrindu ir greitai maišant kaitinamas iki virimo temperatūros. Kaitinimo metu stiklinis indas yra uždaromas, kad mažiau garuotų vanduo. Tirpalui užvirus, į jį pipete įpilama 1 ml iš anksto paruošto 1 % trinatrio citrato tirpalo. Trinatrio citratas šioje nanodalelių ruošimo metodikoje naudojamas elektrostatiškai stabilizuoti metalo nanodaleles. Gaunamas tirpalas paliekamas virti vienai valandai. Galiausiai, stiklinis indas su sidabro nanodalelių koloidiniu tirpalu yra įstatomas į ledo vonelę ir atšaldomas iki kambario temperatūros. Paruoštas tirpalas yra žalsvai pilkšvos spalvos. Kol tirpalas nenaudojamas, jis laikomas šaldytuve, 5 °C temperatūroje, tokiu būdu sulėtinant sidabro nanodalelių struktūrinius pokyčius ir tuo pačiu prailginant dalelių tinkamumo Ramano sklaidos signalo stiprinimui trukmę.

1.3. Prizmės formos sidabro nanodalelių tirpalo paruošimas

Prizmės formos nanodalelės buvo ruošiamos panaudojant literatūroje aprašyta *Damian Aherne* ir *Deirdre M. Ledwith* metodika [31]. Ši metodika nuo sferinės formos nanodalelių ruošimo metodikos skiriasi tuo, kad susideda iš dviejų etapų. Pirmasis etapas – tai agregacijos centrų sintezė, o antrasis – nanodalelių auginimas. Pirmame tirpalo ruošimo etape sidabro nitratas yra veikiamas stipriu reduktoriumi (natrio borohidridu). Dėka skirtingų trinatrio citrato ir poli(natrio 4-stireno sulfonato) adsorbcijos greičių, yra suformuojama ir stabilizuojama specifinė agregacijos centrų nanodalelių forma. Po to silpnu reduktoriumi (askorbo rūgštimi) paveikus agregacijos centrus, iš jų, įvedant papildomą sidabro nitrato kiekį, formuojasi prizmės formos nanodalelės. Pastarosios buvo

stabilizuojamos elektrostatinės stabilizacijos metodu sumaišius gautą tirpalą su didelės koncentracijos trinatrio citrato tirpalu.

Agregacijos centrų tirpalas buvo ruošiamas kambario temperatūroje pagal tokią tvarką: pirmiausia, visą laiką aktyviai maišant magnetine maišykle, į stiklinį indą pipete yra įpilama 5 ml 2,5 mM citrato tirpalo, 0,25 ml 500 mg/l PNSS tirpalo ir 0,3 ml 10 mM natrio borohidrido tirpalo. Po to, pipete 2 ml/min greičiu į tirpalą yra įlašinama 5 ml 0,5 mM sidabro nitrato tirpalo. Lašinant sidabro nitrata tirpalo spalva pradeda keistis iš bespalvės į šviesiai geltoną. Spalvos kitimas parodo, kad formuojasi nanodalelės. Baigus lašinti sidabro nitrata, sustabdomas maišymas ir stiklinis indas nukeliamas nuo magnetinės maišyklės.

Dalelių ruošimo procedūra pradinama į stiklinį indą įpilant 5 ml distiliuoto vandens. Stiklinis indas padedamas ant magnetinės maišyklės. Įjungus intensyvaus maišymo režimą pipete įpilama 75 μ l 10 mM iš anksto paruošto askorbo rūgšties tirpalo. Tuomet, į tirpalą pipete įpilamas tam tikras kiekis (25 μ l) agregacijos centrų nanodalelių tirpalo. Agregacijos centrų nanodalelių kiekis galutiniame tirpale yra tiesiogiai susijęs su paruoštų nanodalelių dydžiu. Kitame etape į tirpalą 1 ml/min greičiu yra įlašinama 3 ml 0,5 mM sidabro nitrato tirpalo. Nuo pačios lašinimo pradžios tirpalo spalva pradeda tolygiai keistis iš bespalvės į rožinę ar oranžinę spalvą. Galutinė spalva priklauso nuo dalelių dydžio (agregacijos centrų tirpalo kiekio). Spalvų diapazonas keičiasi intervale nuo tamsiai violetinės iki šviesiai oranžinės spalvos. Nanodalelių stabilizavimui į tirpalą nedelsiant yra įpilama 0,5 ml 25 mM trinatrio citrato tirpalo. Nanodalelių stabilizavimas įvyksta per kelias minutes ir tirpalas jau gali būti naudojamas *SERS* spektriniams tyrimams. Šiuo metodu paruoštas tirpalas neturi jokių specialių laikymo sąlygų, tačiau, kai jis nenaudojamas, kaip ir sferinės formos sidabro nanodalelių koloidinis tirpalas, buvo saugomas šaldytuve, 5 °C temperatūroje.

1.4. Koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų centrifugavimas

Pagal anksčiau aprašytas metodikas ruošiant koloidinius tirpalus reikia naudoti mažos koncentracijos vandeninius tirpalus ir dėl to suformuotų sidabro nanodalelių koncentracija juose yra nedidelė. Tai įtakoja *SERS* signalo stiprinimo faktorių, nes tik nanodalelių sankaupoms būdingi specifiniai efektai, pavyzdžiui, suporuotų plazmonų rezonansas, pasireiškia daug rečiau. Dėl to, paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos efektas yra silpnesnis naudojant substratus, paruoštus iš šių tirpalų. Norint pasiekti didesnę *SERS* signalo stiprinimą, reikia didinti sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų koncentraciją. Šiame darbe tai buvo atliekama naudojant centrifugą *Centrifuge 5804 (Eppendorf)*. Atitinkami kiekiai (nuo 40 ml iki 80 ml) paruoštų nanodalelių tirpalų buvo centrifuguojami 30 minučių, sukant juos 9000 apsisukimų per minutę greičiu (toku būdu veikiant daleles 10400 xg santykinė išcentrinė jėga (angl. *RCF*)). Centrifuguojant dėl išcentrinės jėgos

nanodalelės kaupiasi indo dugne. Po to, skaidrus paviršiuje likęs mažos koncentracijos tirpalas atsargiai nupilamas, o likęs sukoncentruotas tirpalas naudojamas substratų paruošimui, *SERS* eksperimentų metu.

1.5. Koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų sugerties spektrai

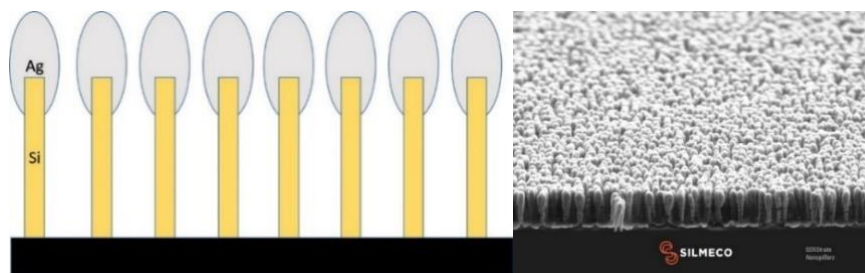
Darbo metu paruoštų sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų sugerties spektrų charakterizavimui buvo analizuojami šių tirpalų sugerties 250 nm – 800 nm srityje spektrai. Bandiniai tirpalų sugerties matavimams buvo ruošiami iš ką tik pagamintų koloidinių nanodalelių tirpalų. Koloidiniai tirpalai skiedžiami distiliuotu vandeniu santykiu 2:1 (vanduo : koloidinis tirpalas). Registruojant koncentruotų koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų sugerties spektrus, skiedimo santykis keičiamas priklausomai nuo tirpalo koncentracijos, kad nebūtų sotinama sugertis.

2. Bandinių paruošimas

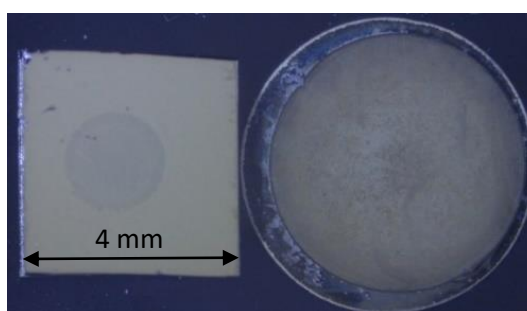
Sidabro nanodalelių sluoksniai *SERS* spektriniais tyrimams buvo ruošiami iš koncentruotų koloidinių sidabro nanodalelių tirpalų. Sluoksniai buvo formuojami ant stiklinio padėklo padengto šimto nanometrų storio aliuminio sluoksniu. Pirmiausia, stiklinės plokštelės buvo plaunamos kelių alkoholių tirpale, ultragarsinėje vonelėje. Ant nuplautų plokštelių vakuuminio metalų garinimo metodu buvo suformuotas plonas aliuminio sluoksnis. Ši padėklų gamybos metodika nėra greitesnė, nei įprastinė metodika (stiklines plokšteles dengiant aliuminio folija), tačiau užgarintas aliuminio sluoksnis pasižymi lygesniu paviršiumi. Kaip ir anksčiau, toks padėklo paviršius buvo ruošiamas dėl to, kad aliuminis gerai atspindi krintančią į ją infraraudonąją spinduliuotę. Be to, aliuminio paviršius yra hidrofobinis, todėl koloidinio tirpalo lašelis neišsiplečia. Prieš ruošiant nanodalelių sluoksnius ant aliuminiu padengto stiklo paviršiaus pagrindas buvo nuvalomas metanolio, kad būtų pašalintos dulkės ar kiti nešvarumai, nusėdę ant aliuminio paviršiaus. Tuomet, pipete, ant substrato pagrindo (nuvalyto aliuminio paviršiaus) užlašinami 6 - 10 koloidinio nanodalelių tirpalo lašų. Koloidinio tirpalo vieno lašo tūris neviršijo 23 μ l. Užlašinus tirpalą substratas paliekamas išdžiūti kambario temperatūroje. Džiovinimas buvo vykdomas uždaroje aplinkoje (sandarioje 1,6 l tūrio dėžutėje), tokiu būdu sumažinant džiūvimo greitį, nes džiūvimas vyksta padidintos aplinkos drėgmės sąlygomis. Džiovinant lašą tokiu būdu nesusidaro nanodalelių sankaupos ties lašo kraštais (*coffee-ring*).

Darbo metu naudoti komerciniai substratai, pagaminti Danijoje, firmoje *Silmeco*. Šių substratų gamybos technologija paremta silicio cilindrų auginimo vakuuminio garų nusodinimo metodu. Gaminant substratus ant padėklo buvo sukuriamas tam tikrą tankį turintis silicio cilindrų „miškas“. Po to ant viršaus užgarinamas aukso arba sidabro sluoksnis. Substrato grafinis atvaizdas bei substrato SEM nuotrauka pateikti 12 pav.

Komercinio ir darbo metu paruošto padėklo, su išdžiovintu bandinio lašu, nuotraukos yra pateiktos 13 pav.



12 pav. Grafinis komercinio substrato struktūros atvaizdavimas (kairėje) ir skenuojančiu elektroniniu mikroskopu padaryta substrato nuotrauka (dešinėje).



13 pav. *SERS* spektriniam tyrimams darbe naudotų komercinio (kairėje) ir laboratorijoje paruošto (dešinėje) substratų nuotraukos.

Ruošiant bandinius šlapimo rūgšties *SERS* spektriniam tyrimams ant substratų buvo užlašinami 23 μl tūrio vandeniniai tiriamos medžiagos - šlapimo rūgšties ar žmogaus kraujo tirpalų lašai ir paliekami išdžiūti, uždaroje dėžutėje kambario temperatūroje. Paruoštas bandinys buvo nuplaunamas vandeniu. Tai daroma, nes plaunant nuo bandinio paviršiaus yra pašalinamos molekulės, kurios nėra adsorbuotos ant substrato. Nuplovus substratus paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos intensyvumas padidėja kelis kartus.

Vandeniniai šlapimo rūgšties tirpalai, naudoti bandinių paruošimui, buvo ruošiami pasvėrus atitinkamą kiekį šlapimo rūgšties miltelių (*Sigma-Aldrich*, 99 %, Vokietija) bei juos ištirpinus atitinkamame kiekyje distiliuoto vandens. Dėl mažo šlapimo rūgšties tirpumo vandenyje maksimali šios medžiagos koncentracija distiliuotame vandenyje gali būti pasiekta tik iki $3,57 \cdot 10^{-4}$ M. Todėl, norint pasiekti didesnes ($1 \cdot 10^{-3}$ M) nei pastaroji koncentracijas, be distiliuoto vandens dar papildomai įpilama dviejų procentų natrio šarmo (NaOH) tirpalo. Natrio šarmo tirpalo kiekis parenkamas toks, kad galutiniame tirpale būtų ištirpusi visa šlapimo rūgštis.

Kraujyje esančios šlapimo rūgšties *SERS* spektriniam tyrimams buvo paruoštas žmogaus kraujo vandeninis tirpalas. Kraujas buvo maišomas su vandeniu taip, kad galutinė šlapimo rūgšties

koncentracija tirpale būtų mažesnė nei normali žmogaus organizme (10^{-6} M). Vandens ir žmogaus kraujo kiekiai apskaičiuoti naudojant standartines sveiko žmogaus šlapimo rūgšties koncentracijų kraujyje skaitines vertes (žr. 1 lentelę). Kraujo skiedimas vandeniui taip pat užtikrino, kad kraujas nesukrešės bandinių paruošimo ir spektrų registravimo metu.

Bandiniai inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis *SERS* spektriniais tyrimams ruošti iš inkstų audinių, kurie buvo gauti iš karto juos išoperavus. Visi inkstų audiniai, naudoti darbo metu, gauti iš Vilniaus universiteto Santariškių klinikose atliekamų inkstų rezekcijos ar nefrektomijos operacijų. Spektriniais inkstų audinių tyrimais yra patvirtinti Vilniaus regiono bioetikos komiteto (dokumento nr. 158200-15-803-312).

Bandinio paruošimo procedūra yra tokia. Švari skalpeliu nuo ką tik išoperuoto inkstų audinio atpjaunamas nedidelis audinio gabalėlis. Tuomet, naudojantis pincetu, nestipriai prispaudžiant ir atleidžiant (štapavimo metodu) inkstų audinio gabalėlį pjūvio vietoje ant iš anksto suformuotų sidabro nanodalelių sluoksnių uždedamas plonas tarpląstelinio skysčio sluoksnis, kuriame yra pavienių inkstų audinio ląstelių. Po šios procedūros, bandiniai buvo paliekami išdžiūti uždaroje 100 ml dėžutėje. Sidabro nanodalelių sluoksniai ruošiami tokiu pat metodu kaip ir šlapimo rūgšties tyrimų metu.

Štapavimo metodu ruošiant bandinius susiduriama su viena problema – suformuojamas nevienodo storio bandinio sluoksnis, kuris apriboja kiekybinės analizės tikslumą. Tačiau šiame darbe buvo atliekama tik kokybinė vėžinių ir sveikų inkstų audinių analizė, todėl bandinio sluoksnio storio netolygumai nepakenkia darbo metu gautiems rezultatams.

3. Spektrų registravimo aparatūra

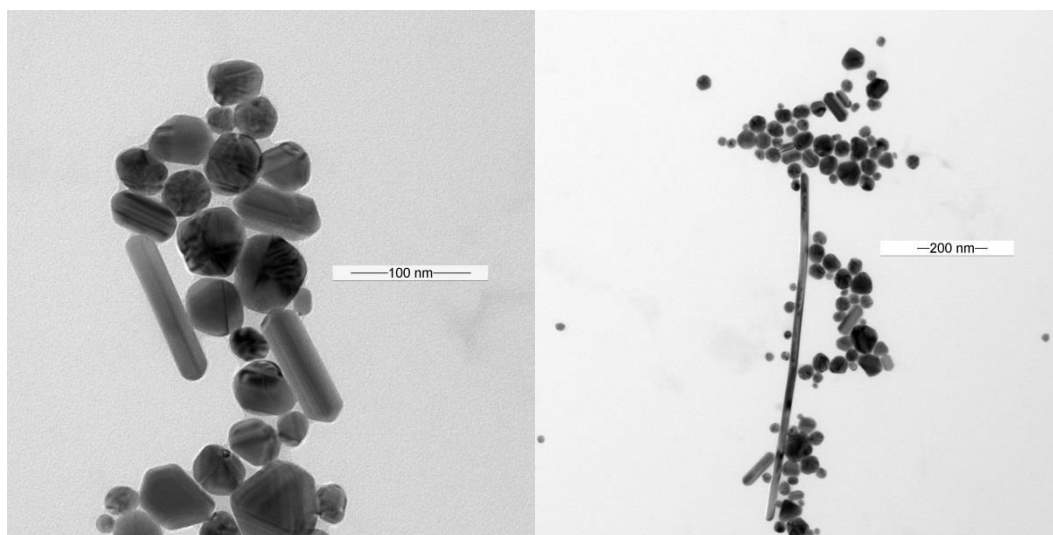
Pagamintų sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų sugerties spektrai (plazmonų rezonanso dažnio bei atitinkamo bangos ilgio nustatymui) buvo registruojami spektrofotometru *Lambda 1050* (*Perkin Elmer*, JAV). Spektrofotometre naudojami spinduliuotės šaltiniai: deuterio ir halogeninė lempos, o signalas registruojamas *PMT* (*photomultiplier* – fotodaugintuvas) jutikliu, kurio jautrumo spektrinė sritis yra 175 nm – 860 nm. Registravimo metu koloidiniai tirpalai buvo patalpinami į 5 mm storio kvarcinio stiklo kiuvetes. Koloidinių tirpalų spektrai buvo lyginami su tirpaluose naudoto tirpiklio - distiliuoto vandens sugerties spektrais. Tokiu būdu galutiniame spektre buvo eliminuojamos tirpiklio spektrinės juostos. Spektrai registruoti 250 nm – 800 nm spektrinėje srityje (5 nm spektrine skyra).

Tiek spontaninės (t.y. įprastinės), tiek paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos spektrai buvo registruojami Furjė vaizdavimo (angl. *Fourier Transform – FT*) Ramano spektrometru *MultiRAM* (*Bruker*, Vokietija). Spektrometre naudojamas modernus „*RockSolid*“ interferometras, kuriam būdingas didelis stabilumas aplinkos poveikiams. Todėl šiuo interferometru galima realizuoti itin kokybišką infraraudonosios spinduliuotės interferenciją. Ramano sklaidos signalo žadinimui bandinio paviršiaus vieta buvo parenkama naudojantis motorizuotu bandinio laikikliu, kurio judėjimą x ir y kryptimis galima kontroliuoti programiškai, o judėjimą z kryptimi - reguliuoti mechaniškai. Eksperimentų metu naudojama 1064 nm (neodimio itrio granato lazeris Nd:YAG) bangos ilgio lazerinė spinduliuotė. Lazerinė spinduliuotės pluoštelis į bandinį fokusuojamas 90° kampo veidrodiniu objektyvu (tuo pačiu objektyvu surenkama ir išsklaidyta spinduliuotė). Objektyvo priedėlyje įtaisyta kamera (*CCD* jutiklis) stebimas bandinys ir pasirenkama bandinio paviršiaus sritis kurioje bus žadinama Ramano sklaida. Sufokusuotos lazerinės spinduliuotės pluoštelio skersmuo yra apie 100 μm. Ramano sklaidos registravimui spektrometre panaudotas skystu azotu šaldomas puslaidininkinis Ge jutiklis (skirtas darbui 100 cm⁻¹ - 3600 cm⁻¹ Ramano poslinkių srityje). Registravimo metu buvo nustatyta parinkta 5 mm apertūra. Toks apertūros skersmuo įgalina spektrogramose realizuoti 4 cm⁻¹ spektrinę skyrą. Siekiant padidinti signalo/triukšmo santykį spektrai buvo kaupinami ir vidurkinami. Kiekvienas spektras buvo registruojamas 100 kartų (angl. 100 *scans*) ir rezultatai vidurkinami.

III. Rezultatai

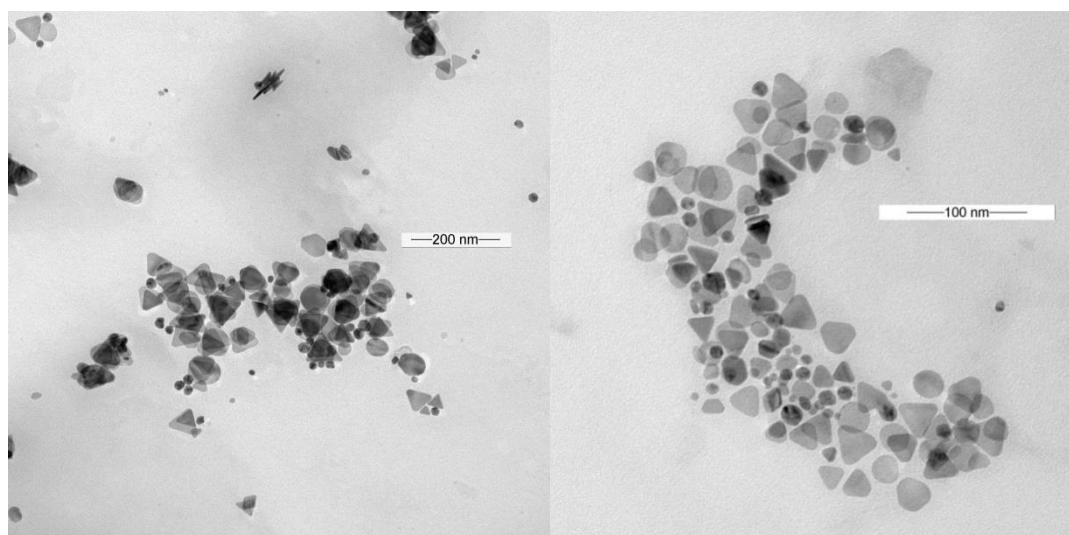
1. Koloidiniai sidabro nanodalelių tirpalai

Yra žinoma, kad *SERS* signalo intensyvumas labai priklauso nuo koloidinio tirpalo sidabro nanodalelių formos ir dydžio. Darbo pradžioje, ruošiant koloidinius nanodalelių tirpalus, ypatingas dėmesys buvo skiriamas nanodalelių formos ir dydžio optimizavimui jų sintetinimo metu. Šiuo tikslu nanodalelių formavimosi kontrolei panaudota elektroninė mikroskopija. Šių tirpalų sferinės ir prizmės formos sidabro nanodalelių atvaizdai, užregistruoti transmisiniu elektroniniu mikroskopu (*TEM*), yra pateikti atitinkamai 14 pav. ir 15 pav. Atvaizdai užregistruoti *TEM* mikroskopu *Libra 200* (*Zeiss*, Vokietija). Registravimo metu didinimas buvo keičiamas nuo 20000 iki 63000 kartų.



14 pav. Sferinės formos sidabro nanodalelių nuotraukos, užregistruotos elektroniniu mikroskopu *LIBRA 200* (*Zeiss*, Vokietija).

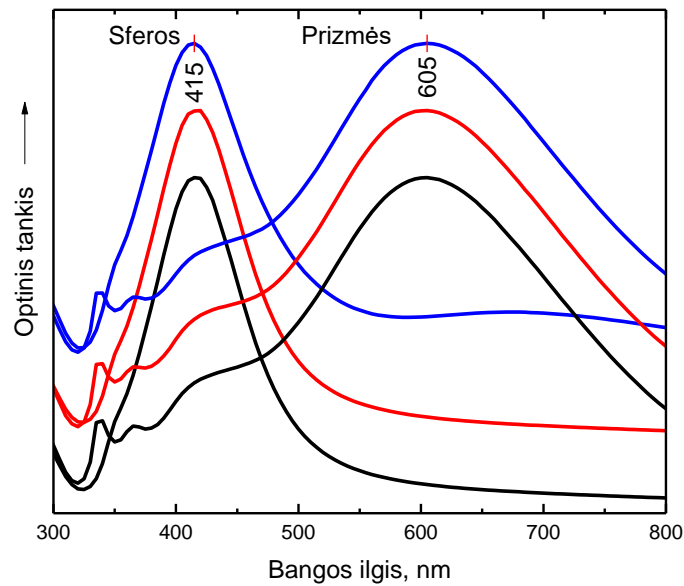
Atvaizduose, pateiktuose 14 pav., matyti, jog koloidiniuose tirpaluose, paruoštuose pagal literatūroje aprašytą *Lee* ir *Meisel*, metodiką, dominuoja sferinės formos nanodalelės. Tačiau atvaizduose taip pat galima pastebėti susiformavusias strypo (angl. *rod*) ar net laido (angl. *nanowire*) formos nanodaleles. Dvi pastarosios nanodalelių formos nėra būdingos šio tipo koloidiniam tirpalui. Strypo ar laido formos nanodalelių susiformavimas gali būti aiškinamas koncentracijos netolygumais, atsirandantiems dalelių sintezės metu. Ruošiant šį tirpalą dalelių dydis bei jo pasiskirstymas ženkliai priklauso nuo tirpalo maišymo greičio, tirpalo temperatūros bei kaitinimo trukmės. Žvelgiant į nanodalelių nuotraukas, pateiktas 14 pav., galima pastebėti, kad koloidinis tirpalas nėra vienalytis. Vidutinis sferinių dalelių dydis jame yra apie 60 nm, ir jis kinta nuo 25 nm iki 70 nm.



15 pav. Prizmės formos sidabro nanodalelių nuotraukos, užregistruotos elektroniniu mikroskopu *LIBRA 200* (Zeiss, Vokietija).

Prizmės formos nanodalelių, paruoštų pagal *Damian Aherneir Deirdre M. Ledwith* metodiką atvaizdai yra pateikti 15 pav. Kaip ir pagal *Lee* ir *Meisel* metodiką ruošame koloidiniame tirpale, šiame tirpale esančios nanodalelės nėra vienodo dydžio - dydžiai kinta nuo 20 nm iki 60 nm, o vidutinis dalelių dydis yra apie 40 nm. Tirpale yra likę ir agregacijos centrų, kurie nebuvo suformuoti į prizmes. Tokių dalelių pavyzdys – kairiojoje 15 pav. atvaizde stebimos 10 nm dydžio, sferinės formos dalelės. Taigi, prizmės formos nanodalelių ruošimo išeiga nėra šimtaprocentinė. Jos metu susiformuoja ir disko formos nanodalelės. Pastarosios formos nanodalelių susiformavimą lemia ruošimo metu padidėjusi redukuojančios medžiagos koncentracija. Dėl didesnės redukuojančios medžiagos kiekio smailiosios nanodalelių dalys negali susiformuoti ir būti stabilizuotos, nes nuolat yra nuėsdinamos reduktoriaus. Tam tikros medžiagos koncentracijos padidėjimas tirpale gali būti nulemtas fliktuacijų ar nepilno koloidinio tirpalo išsimaišymo gamybos metu, kadangi visas medžiagos vandeninio tirpalo tūris į bendrą tirpalą yra įpilamas iš karto.

Pagamintų sferinės ir prizmės formų sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų sugerties spektrai, užregistruoti *UV-VIS* srityse, yra pateikti 16 pav. Koloidinio sidabro tirpalo su sferinės formos nanodalelėmis *UV-VIS* sugerties spektrinės juostos maksimumo padėtis yra ties $\lambda = 415$ nm, o prizmės formos nanodalelių tirpalo - ties $\lambda = 600$ nm. Pagal sąryšį (15) apskaičiuotas sferinės formos nanodalelių skersmuo $d = 59,9$ nm. Kadangi sąryšis (15) tinka tik sferinės formos nanodalelių dydžio įvertinimui iš jų sugerties spektrų, prizmės formos nanodalelių dydis negali būti įvertintas panaudojant šį sąryšį. Platesnės koloidinių prizmės formos nanodalelių tirpalo spektrinės sugerties juostos reiškia, kad šiame tirpale dalelių dydis yra pasiskirstęs platesniame intervale, negu sferinės formos nanodalelių koloidiniame tirpale.



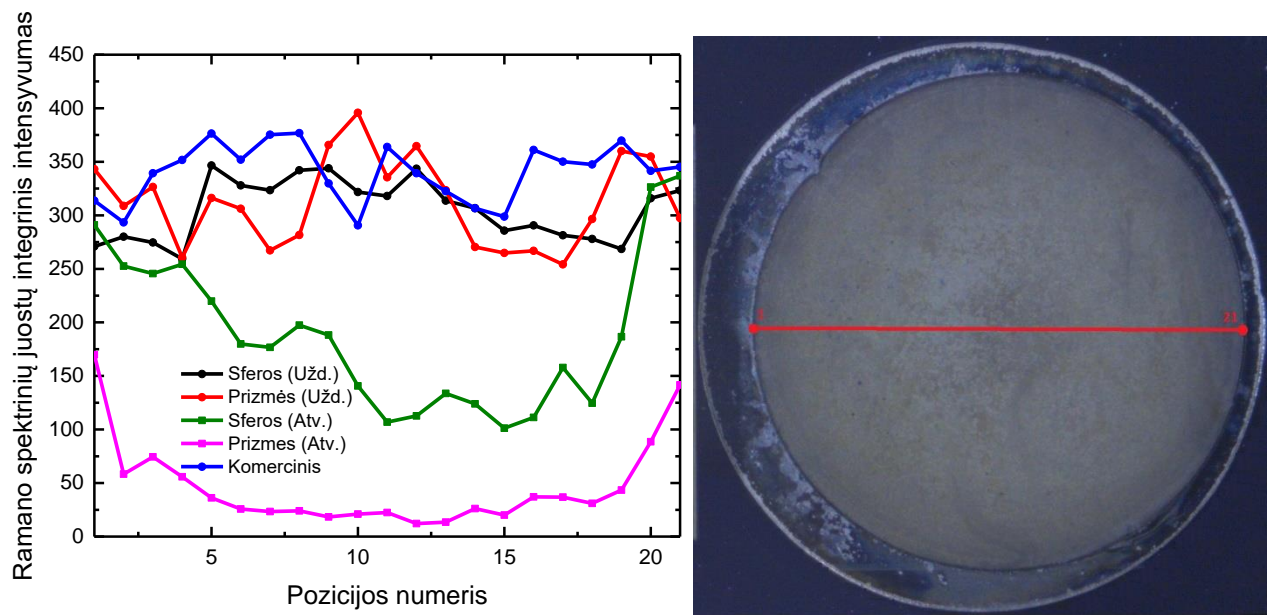
16 pav. Sferinių ir prizmės formų sidabro nanodalelių koloidinių tirpalų sugerties spektrai UV-VIS srityje. Spektrai registruoti po paruošimo (juoda spalva), praėjus 18 dienų (raudona spalva), po centrifugavimo (mėlyna spalva). Kad būtų galima atskirti skirtingų matavimų spektrus, jie buvo paslinkti.

Be ką tik pagamintų koloidinių sferinės bei prizmės formų sidabro nanodalelių tirpalų sugerties spektrų, 16 pav. yra pateikti šių tirpalų sugerties spektrai, užregistruoti praėjus aštuoniolikai dienų nuo jų paruošimo bei užregistruoti po jų centrifugavimo. Spektrai buvo užregistruoti tam, kad būtų įvertinta tirpalų centrifugavimo įtaką dalelių dydžiui ir jo pasiskirstymui bei ar, senstant koloidiniams tirpalams, neatsiranda struktūrinių sidabro nanodalelių pokyčių. Pateikti spektrai yra sunormuoti, nes ruošiant necentrifuguotų ir centrifuguotų koloidinių nanodalelių tirpalų bandinius elektroninės sugerties spektrų registravimui, tirpalai buvo skiedžiami skirtingu distiliuoto vandens kiekiu. Dėl normavimo optinio tankio vertės praranda savo prasmę ir dalelių koncentracijos skirtumų įvairių koloidinių tirpalų atveju nusakyti negalima. Kadangi skirtingu laiku užregistruotuose sugerties spektruose spektrinių juostų poslinkiai nėra stebimi, galima teigti, kad nei koloidinių tirpalų koncentravimas, nei jų senėjimas neturi įtakos nanodalelių dydžiui bei jo pasiskirstymui.

2. SERS spektriniai rezultatai

2.1. Šlapimo rūgšties tyrimai

Ankstesniame mūsų grupės darbe nustatyta, kad atviroje patalpoje džiovinami koloidinio tirpalo lašeliai suformuoja žiedinę struktūrą, angliškai vadinamą *coffee-ring*. Šiame darbe buvo bandoma išvengti *coffee-ring* efekto, todėl koloidinio tirpalo lašeliai buvo džiovinami uždaroje aplinkoje - 1,6 l tūrio tam tikslui specialiai sukonstruotoje sandarioje dėžutėje. Džiūnant lašui uždaroje aplinkoje joje kaupiasi vandens garai ir lašo džiūvimo procesas yra lėtesnis, todėl susiformuoja homogeniškesnės sidabro nanodalelių struktūros. Substratų, gamintų atviroje aplinkoje, uždaroje aplinkoje bei komercinių substratų, homogeniškumo palyginimui, buvo įvertinti laboratorijoje gamintų ir komercinio substratų integrinio intensyvumo profiliai. Buvo skaičiuojamas integrinis intensyvumas šlapimo rūgšties vandeninio tirpalo (10^{-3} M) SERS spektro, užregistruoto tam tikroje bandinio pozicijoje, spektrinės juostos 1430 cm^{-1} iki 1750 cm^{-1} Ramano poslinkių intervale. Substratų integrinio intensyvumo profilių palyginimas bei bandinio nuotrauka yra pateikti 17 pav.



17 pav. Uždaroje ir atviroje aplinkoje ruoštų substratų integrinio intensyvumo profiliai ir bandinio, su pažymėtomis pirma ir paskutine matavimo pozicijomis, nuotrauka.

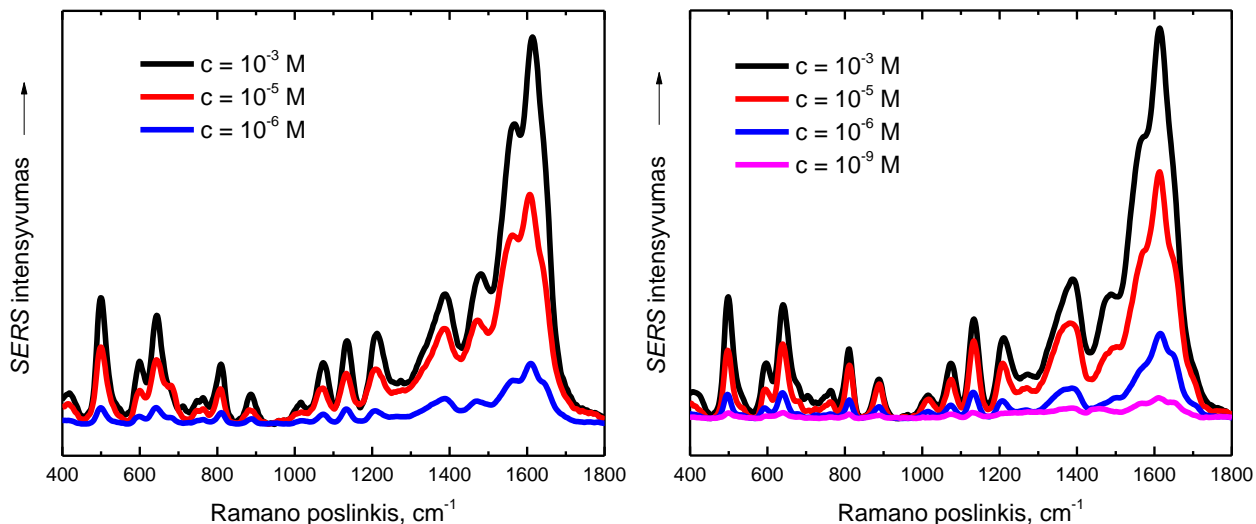
Pateiktuose integrinio intensyvumo profiliuose galima pastebėti, kad substratai, paruošti uždaroje aplinkoje, yra homogeniškesni už substratus, paruoštus atviroje aplinkoje. Skirtumas tarp maksimalios ir minimalios integrinio intensyvumo vertės sumažėjo kelis kartus. Taip pat integrinio intensyvumo vertės bandinio kraštuose ir centre yra panašios, o to nebuvo galima pasiekti substratus džiovinant atviroje aplinkoje. Pastebėta, kad substratų gamybai naudojant sferinės formos daleles substratas yra homogeniškesnis, o registruojamos integrinio intensyvumo vertės šiek tiek didesnės substratų, kurių paruošime naudojamos prizmės formos nanodaleles. Didžiausios Ramano spektrinių

juostų integrinio intensyvumo vertės gautos naudojant komercinį substratą. Taip pat pastarojo substrato integrinio intensyvumo profilis yra homogeniškiausias, tačiau nedaug skiriasi nei substrato, pagaminto naudojant sferinės formos nanodaleles. Atsižvelgiant į komercinio ir laboratorijoje paruošto substrato savybių panašumą bei didelę komercinių substratų kainą buvo nuspręsta, kad laboratorijoje paruošti substratai yra tinkamesni rutiniams tyrimams - šlapimo rūgšties biologiniuose tirpaluose kokybinei ir kiekybinei analizei. Darbo metu paruoštų substratų ir komercinio substrato parametrų palyginimas pateiktas 2 lentelėje.

2 lentelė. Darbo metu paruoštų ir komercinio substrato palyginimas.

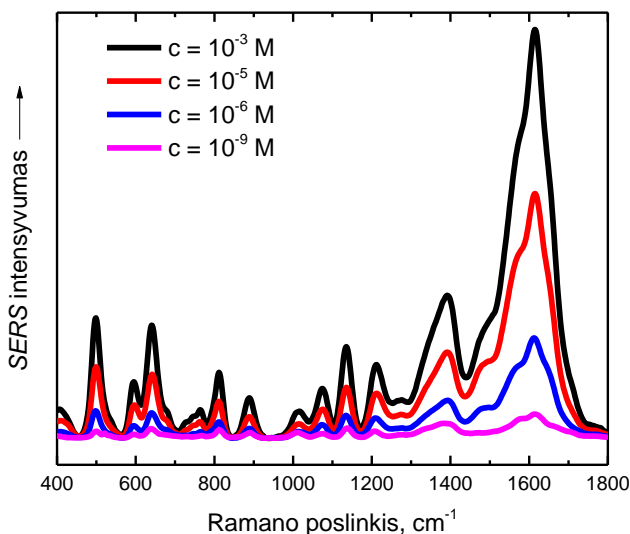
Substratas	Vidutinė integrinio intensyvumo vertė - I	Didžiausias nuokrypis nuo I vertės, %	Vidutinis nuokrypis nuo I vertės, %
Sferos formos dalelės	305,5	15,1	8,1
Prizmės formos dalelės	312,4	18,6	11,0
Komercinis	340,2	14,6	6,4

Išbandant laboratorijoje paruoštus substratus buvo registruojami įvairių koncentracijų (10^{-3} M - 10^{-9} M) šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų spektrai. Pastebėta, kad šiais substratais daug sunkiau registruoti spektrus tirpalų, kurių koncentracija yra lygi ar mažesnė 10^{-7} M, nei su substratais paruoštais atviromis sąlygomis. Tokios koncentracijų ribos priežastis galėtų būti homogeniškos struktūros atsiradimas, nes esant nehomogeniškumui yra galimas didesnis sidabro nanodalelių sankaupų konfigūracijų skaičius (galimai didesnis karštųjų taškų skaičius). Kelių koncentracijų šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų spektrai, užregistruoti substratais, paruoštais naudojant sferinės ir prizmės formos nanodaleles, pateikti 18 pav. Tirpalo, kurio koncentracija 10^{-9} M spektrą užregistruoti pavyko tik su substratu, paruoštu naudojant prizmės formos nanodaleles. Šis rezultatas nėra įprastas, nes pažvelgus į abiejų substratų profilius matyti, kad didesnis *SERS* stiprinimas turėtų būti stebimas naudojant sferinės formos nanodaleles. Gautas eksperimentinis rezultatas gali būti aiškinimas tuo, kad substrato, paruošto naudojant prizmės formos nanodaleles, integrinio intensyvumo profilyje yra sričių, kuriose intensyvumas ženkliai didesnis nei substrato, pagaminto iš sferinių nanodalelių integrinio intensyvumo profilyje. Todėl jei *SERS* eksperimento metu žadinama Ramano sklaida tokioje bandinio srityje, tai galima tikėtis didesnio stiprinimo, o tuo pačiu galimybės registruoti mažesnių koncentracijų tirpalų *SERS* spektrus.



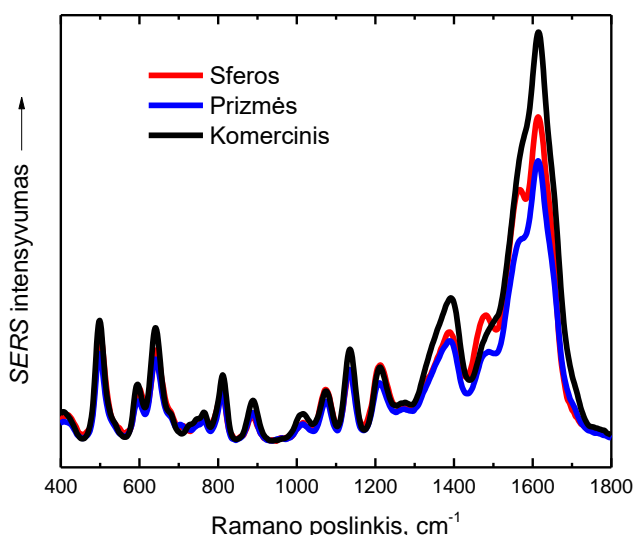
18 pav. Įvairių koncentracijų šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų *SERS* spektrai, užregistruoti Ramano sklaidos stiprinimui naudojant sferos(kairėje)ar prizmės (dešinėje) formų sidabro nanodaleles.

Siekiant palyginti darbo metu laboratorijoje gamintus substratus su komerciniu substratu tie patys įvairių koncentracijų šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų spektrai buvo registruojami naudojant komercinį substratą. Sunkumai registruojant žemesnių nei 10^{-7} M koncentracijos tirpalų spektrus buvo pastebėti ir naudojant komercinį substratą. Tai iš dalies patvirtina hipotezę, kad tvarkingomis struktūromis yra sunkiau užregistruoti itin mažų koncentracijų medžiagų *SERS* spektrus. Gamintojų pateiktoje substrato specifikacijoje nurodyta, kad žemiausia detekcijos riba yra milijardinės dalys – *ppb*. Šlapimo rūgšties molekulei tokio dydžio molinis koncentracijos atitikmuo būtų apie $6 \cdot 10^{-9}$ M.



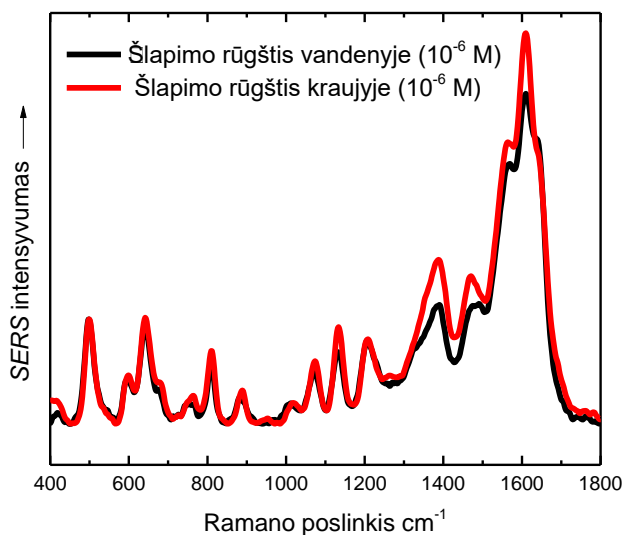
19 pav. Kelių koncentracijų šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų *SERS* spektrai, užregistruoti naudojant komercinį substratą.

Darbo metu, naudojant komercinį substratą, pavyko užregistruoti ir 10^{-9} M koncentracijos tirpalo *SERS* spektrą. Skirtingų koncentracijų tirpalų *SERS* spektrai, užregistruoti naudojant komercinį substratą, yra pateikti 19 pav. Šių spektrų intensyvumas yra šiek tiek didesnis nei spektrų, registruotų naudojant laboratorijoje paruoštus substratus. Intensyvumo skirtumus galima nesunkiai suprasti atsižvelgus į 2 lentelėje pateiktus šių substratų parametrus. Vidutinė komercinio substrato integrinio profilio intensyvumo vertė yra didžiausia, o taip pat mažiausias nukrypimas nuo vidutinės integrinio intensyvumo vertės. Sferinės formos dalelių pagrindu paruošto substrato sąlygota vidutinė *SERS* signalo integrinio intensyvumo skaitinė vertė yra mažesnė nei prizmės formos nanodalelių pagrindu paruošto substrato atveju, tačiau pastarajam integrinio intensyvumo nuokrypis nuo vidutinės vertės daug didesnis. Intensyvumo pasiskirstymas yra pateiktas 20 pav., kuriame yra lyginami šlapimo rūgšties vandeninio 10^{-3} M koncentracijos tirpalo spektrai, užregistruoti naudojant skirtingus substratus.



20 pav. Šlapimo rūgšties vandeninių tirpalų (10^{-3} M) *SERS* spektrų, užregistruotų naudojant skirtingus substratus, palyginimas.

Norint patikrinti ar darbo metu paruoštus substratus galima panaudoti šlapimo rūgšties biologiniuose skysčiuose aptikimui, buvo užregistruotas šlapimo rūgšties kraujyje, *SERS* spektras. Šlapimo rūgšties koncentracija kraujo ir vandens tirpale parinkta mažesnė nei leistina (1 lentelė) žmogaus organizme (10^{-6} M), kad būtų galima įsitikinti, jog paruoštais substratais įmanoma registruoti ir itin mažas šlapimo rūgšties biologiniuose skysčiuose koncentracijas. Sintetinio šlapimo rūgšties tirpalo (10^{-6} M) vandenyje ir šlapimo rūgšties tirpalo kraujyje *SERS* spektrai, užregistruoti naudojant substratus, paruoštus su sferos formos nanodalelėmis, yra pateikti 21 pav. Akivaizdu, kad substratu, paruoštu darbo metu, galima užregistruoti kokybiškus mažų koncentracijų šlapimo rūgšties tirpalų *SERS* spektrus.



21 pav. Šlapimo rūgšties vandeninio tirpalo (10^{-6} M) ir šlapimo rūgšties kraujyje *SERS* spektrai.

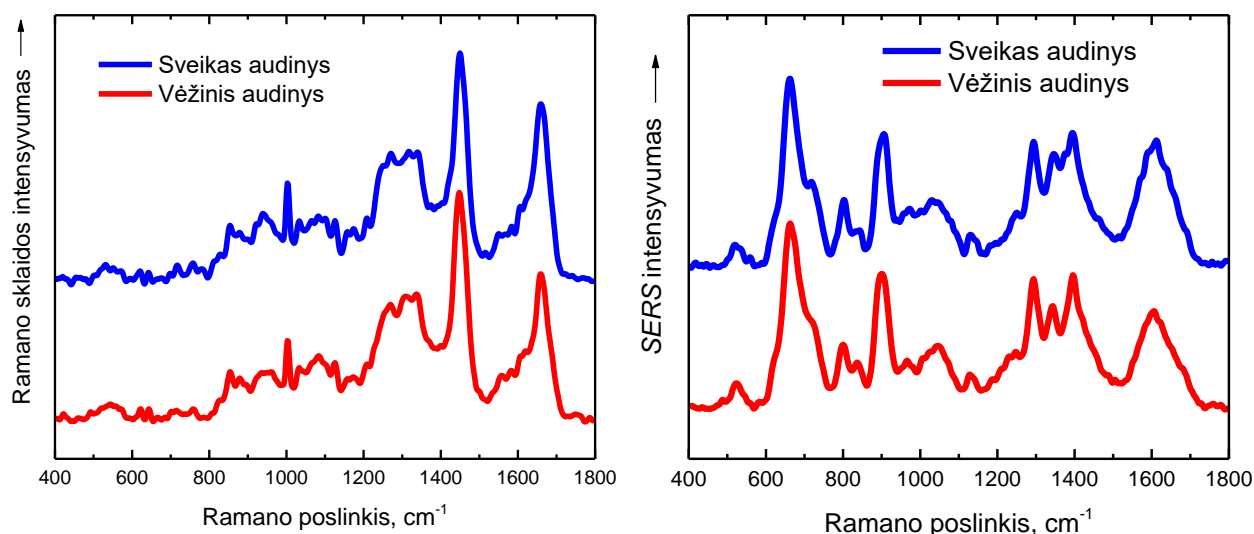
Atlikus eksperimentus ir palyginus *SERS* spektrus, užregistruotus naudojant skirtingus substratus, galima teigti, kad šiame darbe paruošti substratai gali būti panaudoti šlapimo rūgšties priemaišų aptikimui biologiniuose skysčiuose ir iš dalies yra tinkami ir kiekybinei mažų koncentracijų šlapimo rūgšties analizei. Žinoma, tokiu būdu nustatytų koncentracijų skaitinių verčių paklaidos būtų didelės, bet nustatyti ar šlapimo rūgšties koncentracija yra didesnė nei normali ir preliminariai nusakyti jos koncentraciją yra galima, nes skirtingų koncentracijų šlapimo rūgšties tirpalų *SERS* spektrų intensyvumas taip pat ženkliai skiriasi. Iš praktikos metu gautų rezultatų galima daryti išvadą, kad tinkamiausias substratas ką tik aptartam pritaikymui yra iš sferinės formos sidabro nanodalelių koloidinio tirpalo paruoštas substratas. Lyginant su prizmės formos nanodalelėmis jo integrinio intensyvumo profilio verčių nuokrypis nuo vidurkio yra mažesnis. Lyginant su komerciniais substratais paruošimo kaštai yra daug kartų mažesni nei komercinio substrato kaina. Dėl aptartų sferinių sidabro nanodalelių sluoksnių pranašumo, šio tipo sluoksniai buvo ruošiami bei naudojami inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis tyrimams.

2.2. Inkstų audinių tyrimai.

Tiriant inkstų audinius, pirmiausia buvo įsitikinta, kad įprasta Ramano sklaidos bei *SERS* metodikos nėra tinkamos inkstų audinių vėžio tyrimams. Šiam teiginiui patvirtinti, užregistruoti vėžinių ir sveikų inkstų audinių bei inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis Ramano sklaidos bei *SERS* spektrai, kurie yra pateikti 22 pav.

Nesunkiai galima pastebėti, kad darbo metu užregistruotuose vėžinių ir sveikų inkstų audinių Ramano sklaidos spektruose, pateiktuose 22 pav. kairėje, nėra įmanoma išvelgti esminių skirtumų. Dėl šios priežasties įprasta Ramano sklaidos metodika nėra tinkama vėžinių inkstų audinių diagnostikai registruojant audinių spektrus. Skirtumai tarp vėžinių ir sveikų inkstų audinių Ramano

sklaidos spektrų greičiausiai nestebimi todėl, kad dėl didelio ląstelių skaičiaus spektriniai pokyčiai yra nustelbiami stiprios žadinančios spinduliuotės sklaidos, nulemtos didelio molekulių skaičiaus, kurių koncentracijos yra vienodos tiek vėžinėse, tiek sveikose ląstelėse.



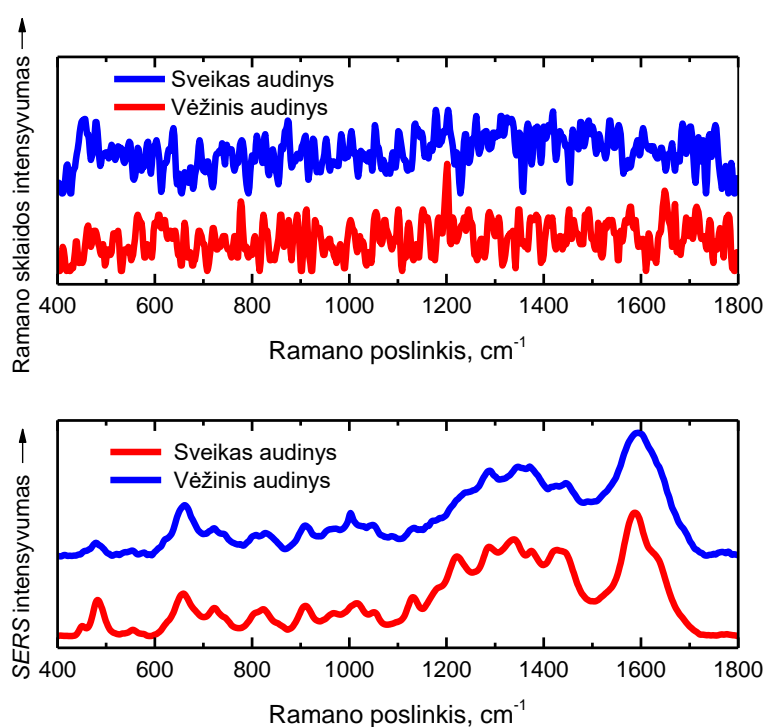
22 pav. Vėžinių ir sveikų inkstų audinių Ramano sklaidos bei *SERS* spektrai.

Priešingai nei Ramano sklaidos spektruose, užregistruotuose vėžinių ir sveikų inkstų audinių *SERS* spektruose, pateiktuose 22 pav. dešinėje, galima pastebėti nedidelius kelių spektrinių juostų intensyvumų skirtumus. Vis dėlto, operatyviam audinio vėžinių sričių nustatymui šie spektriniai skirtumai yra per maži, nes tiesiogiai diagnozuoti vėžinius inkstų audinius pagal šiuos pokyčius nėra įmanoma. Tam reikia naudoti papildomas matematinės procedūras, pavyzdžiui, pagrindinių komponentų analizę (*PCA*) [32-33], o tai apsunkina analizę ir sumažina rezultatų tikslumą.

Užregistruoti inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis inkstų audinio ląstelėmis Ramano sklaidos bei *SERS* spektrai yra pateikti 23 pav. Svarbu paminėti, kad Ramano sklaidos spektruose (23 pav. viršuje) ordinačių ašies skalė, lyginant ją su *SERS* spektruose (23 pav. apačioje) pateikta ordinačių ašimi, yra specialiai išplėsta. Yra žinoma, kad dėl spektrinių signalų silpnumo įprasta Ramano sklaida netinka plonų plėvelių tyrimams. Todėl nesunku suprasti, kad dėl plono tarpląstelinio skysčio sluoksnio, kuris yra gaunamas ruošiant bandinius, nėra įmanoma užregistruoti šių bandinių Ramano sklaidos spektrų. Tai patvirtina ir šiame darbe gauti eksperimentiniai rezultatai, nes tarpląstelinio skysčio Ramano sklaidos spektruose nestebimos jokios spektrinės juostos ir vyrauja tik triukšmai.

Darbo metu užregistruotuose tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis *SERS* spektruose, pateiktuose 23 pav. apačioje, ne tik stebimos bandinių spektrinės juostos bet ir nesunkiai galima pastebėti ir skirtumus tarp šių spektrų. Kadangi spektruose esančių virpesinių juostų intensyvumo

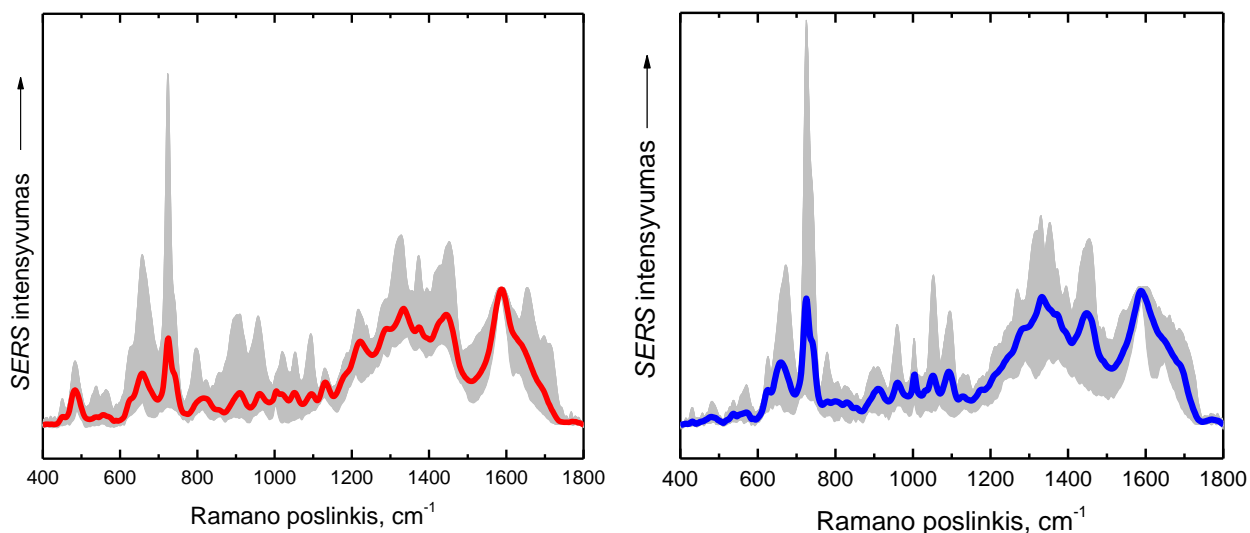
pokyčiai yra ženklūs, nustatyti vėžinio audinio sritis galima be papildomo spektrų matematinio apdorojimo. Dėl šios priežasties analizuoti *SERS* metodu užregistruotus inkstų audinių tarpląstelinio skysčio spektrus yra patogiau ir tiksliau nei analizuoti *SERS* metodu užregistruotus audinių spektrus. Būtina pabrėžti, kad inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis *SERS* spektrai šiame darbe yra pateikiami kaip kelių *SERS* spektrų, užregistruotų skirtingose bandinio vietose, vidurkiai. Spektrai buvo registruojami skirtingose tarpląstelinio skysčio plėvelės vietose, kad būtų išvengta atsitiktinių virpesinių juostų intensyvumo pokyčių spektruose, kurie gali kilti dėl to, kad bandinio paruošimo metu yra suformuojama nevienodo storio tarpląstelinio skysčio plėvelė ar dėl skirtingo skaičiaus molekulių, adsorbuotų prie nanodalelių. Taip pat pateikiami *SERS* spektrai yra sunormuoti pagal virpesinės juostos, esančios ties 1586 cm^{-1} intensyvumą.



23 pav. Vėžinių ir sveikų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis Ramano sklaidos (viršuje) bei *SERS* (apačioje) spektrai.

Norint įsitikinti, kad spektriniai pokyčiai nėra atsitiktiniai ir pagal juos galima diagnozuoti inkstų audinio vėžį, darbo metu buvo užregistruoti 24 skirtingų pacientų sveikų ir vėžinių inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis *SERS* spektrai. Suvidurkinti ir sunormuoti spektrai yra pateikti 24 pav. Taip pat šiuose spektruose pateikti ir virpesinių juostų intensyvumo nuokrypiai (pilkos sritys), kurie pasireiškia registruojant iš skirtingų pacientų inkstų audinių paruoštus bandinius. Galima pastebėti, kad spektrinių juostų intensyvumai kinta ženkliai. Šie intensyvumo pokyčiai veikiausiai yra nulemti skirtingo pacientų gyvenimo būdo, kadangi priklausomai nuo maitinimosi ypatumų, fizinės veiklos ir kitų lemiančių faktorių, žmogaus organizme

gali padaugėti ar sumažėti įvairių biologinių molekulių. Spektrinių juostų intensyvumų pokyčius nulėmė ir tai, kad pacientų vėžio išsivystymo stadijos buvo skirtingos. Tačiau būtina paminėti ir tai, kad spektrinių juostų intensyvumo pokyčius galėjo dalinai nulemti ir bandinio paruošimo netikslumai. Bandinio paruošime dalyvavo ir medikas chirurgas, kuris inkstų audinių mėginius atpjaudavo iš tam tikros inkstų audinių vietos. Todėl priklausomai nuo pjūvio vietos, tam tikrų biomolekulių kiekis gali kisti.



24 pav. Vėžinių (kairėje) ir sveikų (dešinėje) inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis inkstų audinio ląstelėmis *SERS* spektrai.

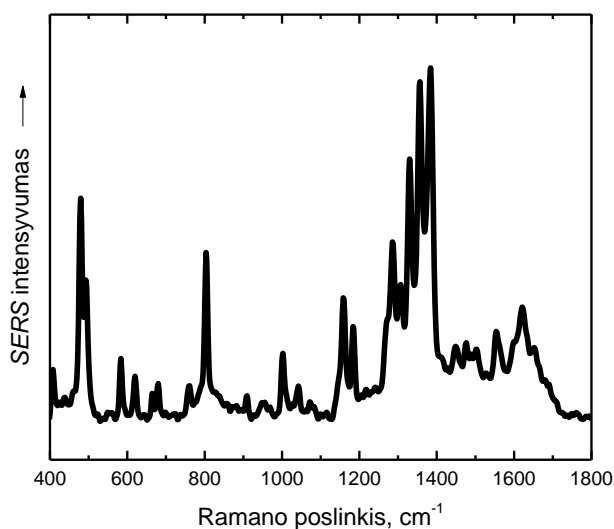
Net ir esant dideliems spektrinių juostų intensyvumų pokyčiams, tarpusavyje lyginant spektrus buvo rasti du esminiai skirtumai tarp bandinių, paruoštų iš vėžinių ir sveikų inkstų audinių, kurie stebimi visuose užregistruotuose spektruose. Šie skirtumai - tai intensyvios spektrinės juostos stebimos iš vėžinių inkstų audinių paruoštų bandinių spektruose ir nestebimos arba stebimos itin silpnos virpesinės juostos iš sveikų inkstų audinių paruoštų bandinių spektruose. Šios virpesinės juostos užregistruotuose *SERS* spektruose yra stebimos ties 483 cm^{-1} bei 1221 cm^{-1} .

Norint sužinoti, kas nulemia darbo metu užregistruotų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis inkstų audinio ląstelėmis *SERS* spektrų skirtumus, buvo atliktas spektruose stebimų intensyviausių spektrinių juostų priskyrimas molekulių vidiniams virpesiams. Spektrinių juostų interpretacija atlikta naudojantis literatūroje [32-38] pateiktais priskyrimais. Spektrinių juostų padėtys, bei šioms juostoms priskirti normalieji virpesiai ir šaltinių, kuriais remiantis atliktas priskyrimas, nuorodos pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Virpesinių juostų, stebimų *SERS* spektruose, interpretacija.

Virpesinės juostos padėtis, cm^{-1}	Normalusis virpesys	Molekulė	Literatūra
452	Žiedo virpesys	Fenilalaninas	32
483	-	Glikogenas	34
537	$\nu(\text{S-S})$	Baltymai	32, 33, 36
557	-	Guaninas, timinas, uracilas	32
589	Amide IV	Baltymai	35
625	$\delta(\text{C-C})$	Fenilalaninas	33
657	$\nu(\text{C-S})$ $\delta(\text{C-C})$	Cistinas Fenilalaninas /Tirozinas	32, 34
724	$\delta(\text{C-H})$	Adeninas	33 - 35
740	Žiedo virpesys	Timinas	36, 37
797	-	Citozinas, baltymai, pieno rūgštis	33
814	$\nu(\text{C-C})$	Kolagenas	38
829	Žiedo virpesys	Tirozinas	34, 35
852	$\nu(\text{C-C})$	Tirozinas	34
887	$\delta(\text{C-O-H})$	D-Galactosamine	37, 38
910	$\nu(\text{C-C})$	Baltymai, sacharidai	32 - 34
959	-	Fosfolipidai, baltymai, cholesterolis	32, 33
1004	$\nu(\text{C-C})$, žiedo kvėpavimas	Fenilalaninas, triptofanas	35, 37
1052	$\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-N})$	Baltymai	32, 33
1094	$\nu(\text{C-N})$	D-Mannose	36
1130	$\nu(\text{C-C})$ $\nu(\text{C-N})$	Lipidai Baltymai	32, 36
1173	-	Citozinas, guaninas	33
1221	$\nu(\text{C-C}_6\text{-H}_5)$	Fenilalaninas, tirozinas	32, 34
1286	-	Baltymai, adeninas	33
1332	$\nu(\text{CH})$	Baltymai, DNR	32, 33, 36, 38
1372	-	Guaninas, triptofanas, lipidai	36
1443	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$	Baltymai, fosfolipidai	32 - 34, 36
1586	$\delta(\text{C=C})$	Fenilalaninas	32, 34, 38
1650	$\nu(\text{C=O})$	Amide I, α -spirale (baltymai)	34, 35, 37, 38
1684	-	-	-

Pagal 3 lentelėje pateiktus duomenis nustatyta dviejų esminių skirtumų, kurie pasikartoja visuose bandinių, paruoštų iš vėžinių ir sveikų inkstų audinių, spektruose, cheminė prigimtis. Nustatyta, kad vėžinio inkstų audinio tarpląstelinio skysčio *SERS* spektre stebima intensyvi spektrinė juosta, esanti ties 483 cm^{-1} , yra susijusi su glikogeno virpesiais. Bandiniuose, paruoštuose iš sveikų inkstų audinių, ši juosta nestebima arba yra itin silpna. Pastarasis rezultatas gerai paaiškinamas vėžinių ląstelių metabolizmo ypatumais, aprašytais teorinėje dalyje. Kadangi vėžinių ląstelių išgyvenimui reikia daug energijos pastarosios kaupia didelį kiekį glikogeno. Padidėjusi glikogeno koncentracija nulemia spektrinės juostos intensyvumo padidėjimą. Norint patikrinti, ar stebima spektrinė juosta yra tikrai susijusi su glikogeno virpesiais, užregistruotas vandeninio glikogeno tirpalo (10^{-3} M) *SERS* spektras. Užregistruotas glikogeno (*Sigma Aldrich*, 99 %, JAV) spektras pateiktas 25 pav. Šiame spektre aiškiai matoma intensyvi virpesinė juosta esanti ties 483 cm^{-1} , o tai patvirtina, kad bandiniuose, paruoštuose iš vėžinio inkstų audinio, stebima intensyvi juosta, esanti ties 483 cm^{-1} , yra susijusi su glikogeno virpesiais. Kitos glikogeno virpesiams priskiriamos juostos inksto audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis inkstų audinio ląstelėmis spektruose nestebimos, nes yra nustelbiamos intensyvių kitų molekulių virpesinių spektrų juostų.



25 pav. Glikogeno *SERS* spektras.

Antrosios virpesinės juostos intensyvumo pokytis yra susijęs su amino rūgštimis fenilalaninu bei tirozinu. Iš vėžinio inkstų audinio paruoštų bandinių spektruose stebima intensyvi virpesinė juosta, esanti ties 1221 cm^{-1} , o bandiniuose, paruoštuose iš sveiko audinio, ši juosta nėra stebima. Yra žinoma, kad inkstuose iš fenilalanino yra gaminamas tirozinas, todėl šios juostos atsiradimas greičiausiai nurodo, kad fenilalanino bei tirozino koncentracijų santykis yra ženkliai pakitęs vėžiniame audinyje. Fenilalanino ir tirozino kiekių santykio pokyčiai, gali būti siejami su inkstų veiklos sutrikimais [39]. Kadangi vėžinės ląstelės taip pat netenka dalies savo funkcijų, galima daryti prielaidą, jog jų sudėtyje turėtų būti pakitęs fenilalanino bei tirozino koncentracijų santykis. Toks

pokytis gali nulemti stebimos juostos intensyvumo padidėjimą, stebimą šiame darbe užregistruotuose spektruose.

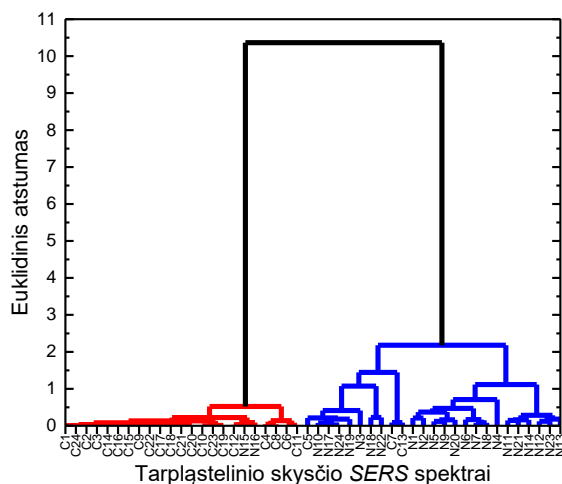
Su glikogeno virpesiais susijusios virpesinė juosta yra žymiai intensyvesnė vėžinių inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis spektruose. Su fenilalanino bei tirozino virpesiais susijusios juostos intensyvumas taip pat yra pakitęs su vėžiu susijusiuose spektruose, tačiau daugumoje šių spektrų pastaroji juosta nėra gerai išreikšta ir stebima tik kaip gretimos spektrinės juostos „petys“. Dėl to, diagnozuoti vėžinius audinius pagal fenilalanino bei tirozino virpesinės juostos intensyvumą gali būti netikslu. Glikogeno virpesinė juosta *SERS* spektruose yra intensyvi ir nepersikloja su kitomis juostomis todėl pagal jos intensyvumą turėtų būti galima tiksliau diagnozuoti vėžinius ir sveikus audinius.

Metodikos tikslumas diagnozuoti vėžinius inkstų audinius buvo nustatytas atlikus klasterinę darbo metu užregistruotų spektrų analizę. Ši analizė buvo atlikta naudojantis programoje *ORIGIN PRO* įdiegta klasterinės analizės funkcija. Spektrų duomenys analizuoti naudojant *Ward* algoritimą. Naudojant *Ward* algoritimą, analizė yra pradedama kiekvieną narį laikant kaip atskirą grupę (klasterį). Tuomet 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:

$$SSE = \sum_{j=1}^K \sum_{x_i \in C_j} \text{dist}(c_j, x_i)^2, \quad (16)$$

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

Duomenys analizei buvo paimti iš užregistruotų sveikų bei vėžinių inkstų audinių tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrų Ramano poslinkių spektrinės srities nuo 530 cm^{-1} iki 440 cm^{-1} . Ši Ramano poslinkių spektrinė sritis pasirinkta todėl, nes į ją patenka su glikogeno virpesiais susijusi virpesinė juosta. Analizės rezultatai pateikti 26 pav.



26 pav. Klasterinės analizės rezultatai. Simboliu C – žymimi vėžinių, o N – sveikų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrai.

Pateiktuose klasterinės analizės rezultatuose galima pastebėti, kad vėžinių ir sveikų audinių klasės yra gerai išskirtos. Tačiau matoma, kad iš 24 pacientų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrų vėžys teisingai diagnozuotas 21 atveju. Be to, diagnozuojant sveikus audinius suklysta du kartus. Būtina paminėti, kad neteisingoms kategorijoms priskirti spektrai yra greta ir išskirti kaip atskiri pogrupiai. Neteisingas spektrų priskyrimas gali būti įtakotas pjūvio vietos, iš kurios buvo atpjaunamas inkstų audinys. Jei sveikas inkstų audinys buvo atpjautas iš sveiko-vėžinio audinio ribos, sveiko audinio tarpląstelinio skysčio *SERS* spektruose gali būti stebimos vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrams būdingos virpesinės juostos. Taip pat dėl galimai gerybinės vėžio stadijos vėžinių audinių tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrai gali būti priskiriami sveikų audinių klasei. Klasterinės analizės rezultatai teikia daug vilčių, nes visiškai teisingai diagnozuota 89,6 % atvejų, o vėžys teisingai diagnozuotas 87,5 % atvejų. Tiksliesniems rezultatams pasiekti reikalinga didesnė duomenų imtis.

Svarbu paminėti, kad darbo metu nebuvo atsižvelgiama į inkstų vėžio stadijas, kurios panaudojant histologinius tyrimus buvo diagnozuotos pacientams. Dėl šios priežasties nėra galima susieti inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis *SERS* spektruose stebimų virpesinių spektrinių juostų intensyvumų pokyčių su tam tikromis vėžio stadijomis.

Darbo metu nustatyta, kad *SERS* spektroskopijos metodika yra perspektyvi ir gali būti panaudota vėžinių inkstų audinių diagnozei operacijų metu. Vis dėlto kol kas negalima teigti, kad darbe išvystyta metodika galima ne tik diagnozuoti inkstų audinio vėžį bet ir nustatyti jo stadiją iš užregistruotų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrų. Didesnė duomenų imtis bei histopatologų nustatytos inkstų vėžio stadijos yra reikalingi *SERS* spektroskopijos metodikos praplėtimui.

Pagrindiniai rezultatai ir išvados

1. Nustatyta, kad tiek sferinių, tiek prizmės formos sidabro nanodalelių sluoksniai, suformuoti darbo metu, pasižymi dideliu Ramano sklaidos signalo stiprinimu. Sluoksniai su sferinėmis nanodalelėmis yra homogeniškesni ir dėl to tinkamesni kiekybinei šlapimo rūgšties biologiniuose skysčiuose analizei *SERS* metodu.
2. Darbo metu atlikus užregistruotų skirtingų pacientų vėžinių ir sveikų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrų analizę nustatyta, kad su glikogeno bei fenilalanino ir tirozino virpesiais susijusios *SERS* spektrinės juostos, esančios atitinkamai ties 483 cm^{-1} ir 1221 cm^{-1} , yra tinkamiausios inkstų vėžio diagnostikai.
3. Atlikta darbo metu užregistruotų 24 pacientų inkstų audinio tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrų statistinė analizė. Teisingai identifikuota 89,6 % spektrų, o 87,5 % spektrų teisingai priskirti vėžinių audinių grupei.

Literatūra

- [1] R. Siegel et. al., Cancer statistics, 2014, *CA Cancer J. Clin.* 64(1), 9-29 (2014).
- [2] Max Diem, *Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-Spectroscopy. Theory, Instrumentation and Biomedical Applications*, (John Wiley & Sons, Ltd, Vakarų Saseksas, Jungtinė karalystė, 2015).
- [3] O. J. Old, L. M. Fullwood, et. al., Vibrational spectroscopy for cancer diagnostics, *Analytical Methyods*, 6(12), 3901-3917, (2014).
- [4] Lillian A. Mundt, Kristy Shanahan, *Graff's Textbook of Routine Urianalysis and Body Fluids*, (Lippincott Williams &Wilkins, Filadelfija, JAV, 2011).
- [5] Andreas Barth, Parvez I. Haris, *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy*, (IOS Press, Amsterdamas, Olandija, 2009).
- [6] Yuri Y. Sautin, Richard J. Johnson, Uric Acid: The Oxidant – Antioxidant Paradox, *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*.27(6), 608-619, (2008).
- [7] Alexander So, Bernard Thorens, Uric Acid Transport and Disease, *J. Clin. Invest.* 120(6), 1791-1799, (2010).
- [8] Sanaz Sedaghat, Ewout J. Hoorn, et. al., Serum Uric Acid and Chronic Kidney Disease: The Role of Hypertension, *PLOS One*. 8(11), 1-8, (2013).
- [9] Melinda K. Kutnizg, Dr. Bonnie L. Firestein, Altered Uric Acid Levels and Disease States, *JPET*. 324(1), 1-7, (2008).
- [10] Zhong Xia Wang, Shou Nian Ding, A Simple Colorimetric Detection of Silver Ion based on uric acid for plasmon silver nanoparticle, *Environment, Energy and Applied Technology, Conference proceedings*. 123-127, (2015).
- [11] NG, C.S. Wood, C.G. Silverman, P.M. Tannir, N.M. Tamboli, P. Sandler, C.M. Renal cell carcinoma: Diagnosis, staging, and surveillance. *AJR Am. J. Roentgenol.* 2008, 191, 1200-1232.
- [12] B. Szachowsicz – Petelska et. al., Changes in the Physico-Chemical Properties of Human Kidney Cell Membranes during the Cancer Transformation, *Advances in Biological Chemistry*, 2014, 4, 223-231
- [13] R. Gebhard et al., Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma, *J. Lipid Res.* 28(10), 1177-1184 (1987).

- [14] D. K. Nomura et. al., Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis, *Cell* 140(1), 49-61 (2010)
- [15] Robert A. Gatenby and Robert J. Gillies, Why Do Cancers Have High Aerobic Glycolysis? *Nature Reviews*, 2004, 891-899.
- [16] Griffiths, J.R., McIntyre, D. J., Howe, F. A. & Stubbs, M. Why are cancers acidic? A carrier-mediated diffusion model for H⁺ transport in the interstitial fluid. *Novartis Found. Symp*, 240, 46-62 (2001).
- [17] Christos E. Zois, Elena Favaro, Adrian L. Harris, Glycogen metabolism in cancer, *Biochemical Pharmacology*, 92 (2014) 3-11.
- [18] 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).
- [19] John R. Lombardi, Ronald L. Birke, et. al., Charge-transfer theory of surface enhanced Raman spectroscopy Herzberg-Teller contributions, *J. Chem. Phys.*, **84**(8), 4174-4180 (1986).
- [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] Michael Quinten, *Optical Properties of Nanoparticle Systems: Mie and Beyond* (Wiley-VCH, Vokietija, 2010).
- [23] Anna Rita Bizzarri, SERS detection of thrombin by protein recognition using functionalised gold nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* **3**(4), 306-310, (2007).
- [24] Matthew D. Sonntag, Eric A. Pozzi, et. al., Recent Advances in Tip-Enhanced Raman Spectroscopy, *J. Phy. Chem. Lett.* **5**(18), 3125-3130, (2014).
- [25] Eric Lee Ru, Pablo Etchegoin, *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, (Elsevier, Amsterdama, Olandija, 2009).
- [26] G. Niaura, A.K. Gaigalas, V.L. Vilker, Moving spectroelectrochemical cell for surface Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, **28**(12), 1009-1011, (1997).

- [27] Gobind Das, Manohar Chirumamilla, et. al., Plasmon based biosensor for distinguishing different peptides mutation states, *Scientific Reports (Nature)*. **3**(1), 1-6, (2014).
- [28] 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).
- [29] Khellil Sefiane, Patterns from drying drops, *Advances in Colloid and Interface Science*, **206**(1), 372-381, (2014).
- [30] 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).
- [31] D. Aherne, et al. Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature, *Adv. Funct. Mater.* **18**(14), 2005-2016, (2008).
- [32] Sevda Mert, et. al, Kidney tumor staging using surface-enhanced Raman scattering, *Journal of Biomedical Optics*, **20**(4), 1-9, (2015).
- [33] Sevda Mert, Mustafa Culha, Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Detection of Cancerous Renal Cells, *Applied Spectroscopy*, **68**(6), 617-624, (2014).
- [34] Shaoxin Li, et. al., Characterization and noninvasive diagnosis of bladder cancer with serum surface enhanced Raman spectroscopy and genetic algorithms, *Scientific Reports*, **5**(1), 1-7, (2015).
- [35] Duo Lin, etl. al., Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis, *Optics Express*, **19**(14), 13565-13577, (2011).
- [36] Bing Yan, et. al., 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).
- [37] Duo Lin, et. al., Label-free blood plasma test based on surface-enhanced Raman scattering tumor stages detection in nasopharyngeal cancer, *Scientific Reports*, **4**(1), 1-8, (2014).
- [38] Shangyuan Feng, et. al., Blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy for non-invasive optical detection of cervical cancer, *Analyst*, **138**(1), 3967-3974, (2013).
- [39] Yves Boirie, Robert Albrigh, et. al., Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency, *Kidney International*, **66**(), 591-596 (2004).

Santrauka

Studentas: Martynas Velička

Magistrantūros studijų baigiamojo darbo tema: „INKSTŲ VĖŽIO DIAGNOSTIKA PAVIRŠIAUS SUSTIPRINTOS RAMANO SKLAIDOS SPEKTRINIŲ METODŲ“.

Magistrinio darbo tikslas – suformuoti biologinių skysčių *SERS* spektriniais tyrimams efektyvius sidabro nanodalelių sluoksnius ir pritaikyti juos inkstų piktybinių navikų aptikimui, analizuojant inkstų audinio tarpląstelinio skysčio *SERS* spektrus.

Tikslui pasiekti iškeltos tokios užduotys:

1. Patobulinti *SERS* spektroskopijai skirtų sidabro nanodalelių sluoksnių paruošimo metodiką, testiniu *SERS* bandiniu panaudojant šlapimo rūgšties vandenyje ir kraujyje tirpalus.
2. Naudojantis paruoštais nanodalelių sluoksniais, užregistruoti onkologinių pacientų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis inkstų audinio ląstelėmis *SERS* spektrus ir nustatyti spektrinius vėžinių ląstelių žymenis.
3. Įvertinti metodikos tinkamumą vėžinių inkstų audinio sričių nustatymui.

Nustatyta, kad darbo metu naudojant sferinius ir prizmės formos sidabro nanodalelių koloidinius tirpalus uždaroje aplinkoje paruošti sluoksniai yra homogeniškesni nei atviroje aplinkoje ruošti sluoksniai. Naudojant šiuos sluoksnius yra gaunamos mažesnės tiriamos medžiagos koncentracijos nustatymo paklaidos, kurios yra palyginamos su paklaidomis, gaunamomis naudojant komercinius substratus. Dėl pigesnio paruošimo šie substratai yra tinkamesni rutininei biologinių skysčių analizei.

Darbo metu nustatyta, kad *SERS* signalo stiprinimui panaudojant nanodalelių sluoksnius galima aptikti šlapimo rūgštį biologiniuose tirpaluose net ir esant mažesnei nei leistina ($202 - 416 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) jos koncentracijai. Taip pat, šie substratai gali būti panaudojami apytikslei kiekybinei šlapimo rūgšties biologiniuose skysčiuose analizei.

Darbo metu naudojantis paruoštais nanodalelių sluoksniais užregistruoti vėžinių ir sveikų inkstų audinių tarpląstelinio skysčio su pavienėmis ląstelėmis *SERS* spektrai. Atlikus spektruose stebimų virpesinių juostų interpretaciją nustatyti pagrindiniai spektriniai pokyčiai, kurie įgalina vėžinių audinių diagnostiką.

Nustatyta, kad su glikogeno virpesiais susijusi spektrinė juosta gali būti panaudota kaip spektrinis žymuo tiksliam vėžinių inksto sričių nustatymui.

Summary

Student: Martynas Velička

Title of the master thesis: „THE DIAGNOSIS OF KIDNEY CANCER USING SURFACE ENHANCED RAMAN SCATTERING SPECTROSCOPY”.

The aim of this work was to prepare silver nanoparticle layers, which would be effective for the analysis of biological fluids, and use them for the kidney cancer diagnosis by analyzing SERS spectra of the extracellular matrix of kidney tissue.

The tasks of this work were set as follows.

1. To improve the preparation of silver nanoparticle layers used in SERS spectroscopy and testing them by detecting uric acid molecules in water and blood.
2. Using prepared layers, to register the spectra of the extracellular matrix of the kidney tissues taken from different patients, and to determine the spectral markers of cancerous cells which could be used for the cancerous tissue identification.
3. To determine the usability of the SERS method for diagnosis of kidney cancer carcinoma.

It was determined that the spherical and prism shaped nanoparticle layers prepared during this work were more homogenous than prepared in an open environment. Measurement deviations got while using these layers were smaller and comparable with the ones got while using commercially sold substrates. Due to the lower cost of the prepared substrates they were more suitable for the routine analysis of biological fluids.

It was determined that the nanoparticle layers can be used for detection of uric acid in biological fluids even with concentrations that were lower than normal. Also, these substrates could be used for the approximate quantitative analysis of uric acid in biological fluids.

SERS spectra of cancerous and normal kidney extracellular matrix with single cells was registered using the layers prepared in this work. The assignment of the vibrational bands were made and the main differences between the spectra were identified. These spectral differences allowed the identification of cancerous tissue areas.

It was determined that the vibrational band corresponding to the vibrations of glycogen can be used as spectral marker for the precise diagnosis of cancerous kidney tissue areas.