

Рамановская спектроскопия для оценки капсулы мочевого пузыря после процесса лиофилизации

© Е.В. Тимченко^{1,2}, П.Е. Тимченко^{1,2}, Л.Т. Волова², А.В. Колсанов², А.В. Казакова², Е.С. Семибратова¹

¹ Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва, Самара, Россия

² Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

e-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 05.11.2024 г.

В окончательной редакции 04.12.2024 г.

Принята к публикации 07.04.2024 г.

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния исследованы капсулы мочевого пузыря после процесса лиофилизации. В результате проведенных исследований установлено, что процесс лиофилизации, проведенный по технологии „ЛИОПЛАСТ“, не оказывает значимого влияния на состав и структуру капсулы мочевого пузыря. Проведенный статистический анализ также показал отсутствие существенных спектральных различий в составе исследуемых образцов.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, спектр, статистический анализ, мочевого пузыря, лиофилизация.

DOI: 10.61011/OS.2025.05.60785.17-25

Введение

В настоящее время оценка состава донорских материалов является актуальной задачей для последующего их применения в регенеративной медицине [1]. Процесс лиофилизации является одним из методов консервации биопродуктов. Однако до конца не изучено, насколько меняется структура биоматериалов после процесса лиофилизации. Оптические методы исследования получили широкое распространение в решении различных биомедицинских задач [2–4]. Среди них одним из распространенных оптических методов является метод спектроскопии комбинационного рассеяния [5–7].

Во многих исследованиях [5–7] авторы демонстрируют комбинационное рассеяние как эффективный инструмент с высокой точностью для оценки тканей мочевого пузыря. Так, в работе авторов [5] представлено клиническое исследование биопсий мочевого пузыря для классификации опухолей *ex vivo* с использованием компактной волоконной системы рамановского сканирования на основе зондов. В статье авторов [6] метод рамановской спектроскопии используется для изучения микроокружения раковых клеток мочевого пузыря. Авторы работ [7] применили рамановскую спектроскопию для идентификации неопухолевой и опухолевой тканей мочевого пузыря и определения в них биохимических различий.

Целью исследования являлось применение рамановской спектроскопии для оценки относительного состава капсулы мочевого пузыря после процесса лиофилизации.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследований были использованы аллогенные капсулы мочевого пузыря различных доноров размером $1.5 \times 1.5 \div 0.2$ см. После изъятия часть биоматериалов помещалась в физраствор с антибиотиком и хранилась 3 суток в холодильнике при температуре $+4^\circ$ от момента забора до начала экспериментов. Донорами исследуемых образцов являлись люди одного возраста и пола. Толщина исследуемых образцов составляла 0.4–0.7 мм. Далее, в день исследования биоматериалы были помещены в дистиллированную воду. Другая часть биоматериалов от тех же доноров была лиофилирована по технологии „ЛИОПЛАСТ“ (ТУ-9398-001-01963143-2004).

Все образцы были условно разделены на 2 группы: 1-я группа — лиофилизированные капсулы мочевого пузыря и 2-я группа — нативные капсулы мочевого пузыря тех же доноров.

Метод рамановской спектроскопии был реализован с помощью экспериментального стенда, состоящего из рамановского пробника RPB-785, совмещенного с лазерным модулем LuxxMaster LML-785.0RB-04 (мощность до 500 мВт, длина волны 784.7 ± 0.05 нм) и высокоразрешающего цифрового спектрометра Shamrock sr-303i, обеспечивающего спектральное разрешение 0.15 нм, со встроенной охлаждаемой камерой DV420A-OE. Рамановские спектры анализировались в области $500 - 1800$ см⁻¹. Обработка спектров осуществлялась в программной среде Wolfram Mathematica 12 и заключалась в удалении шумов сглаживающим усредняющим фильтром по 7 точкам, полиноминой аппроксимации

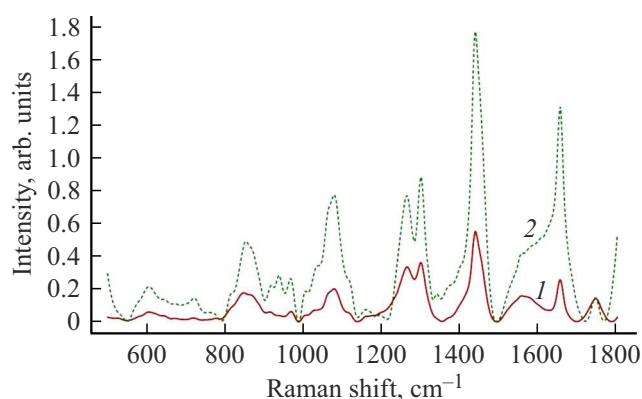


Рис. 1. Усредненные спектры комбинационного рассеяния исследуемых групп образцов: 1 — лиофилизированные капсулы мочевого пузыря, 2 — нативные капсулы мочевого пузыря тех же доноров.

при помощи итерационного алгоритма флуоресцентной составляющей спектра и ее вычитании, и получении итогового спектра комбинационного рассеяния.

Для повышения информативности полученных рамановских спектров был произведен нелинейный регрессионный анализ спектров, состоящий в их разложении на спектральные линии. Состав спектральных линий определен на основе анализа литературы и многократного моделирования рамановских спектров.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены усредненные спектры комбинационного рассеяния всех исследуемых образцов. Они представлены основными линиями $\sim 604 \text{ cm}^{-1}$ (*Nucleotide conformation*), $\sim 720 \text{ cm}^{-1}$ (*DNA*), $\sim 853 \text{ cm}^{-1}$ (*Ring breathing mode of tyrosine & C-C stretch of proline ring*), $\sim 936 \text{ cm}^{-1}$ (*C-C stretching in protein*), $\sim 966 \text{ cm}^{-1}$ (*Lipids*), $\sim 1077 \text{ cm}^{-1}$ (*v(C-C) phospholipids (lipid assignment)*), $\sim 1262 \text{ cm}^{-1}$ (*Amide III*), $\sim 1298 \text{ cm}^{-1}$ (CH_3 , CH_2 twisting, collagen), $\sim 1438 \text{ cm}^{-1}$ (CH_2 deformation), $\sim 1555 \text{ cm}^{-1}$ (*Amide II*), $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$ (*Amide I, α -helix protein*), $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$ (*Phospholipids*).

Спектры КР исследуемых групп в основном имеют схожий характер, но отличаются по интенсивности, за исключением линии КР $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$ (*Phospholipids*). Интенсивности линий КР нативных и лиофилизированных капсул мочевого пузыря могут отличаться из-за различных факторов, включая содержание воды, структурные изменения, денатурацию белка, химические изменения, инструментальную изменчивость, подготовку образца, тип ткани, условия лиофилизации и условия хранения [8].

После лиофилизации образцов значительно уменьшается амплитуда интенсивностей линий КР, соответствующих ДНК: $\sim 604 \text{ cm}^{-1}$ (*Nucleotide conformation*),

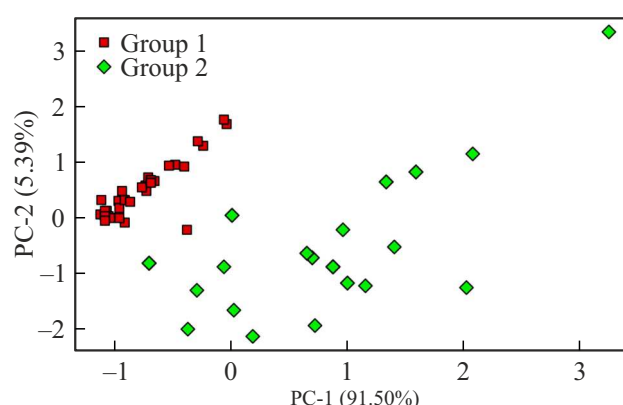


Рис. 2. PCA-анализ для исследуемых групп образцов: 1 — лиофилизированные капсулы мочевого пузыря, 2 — нативные капсулы мочевого пузыря тех же доноров

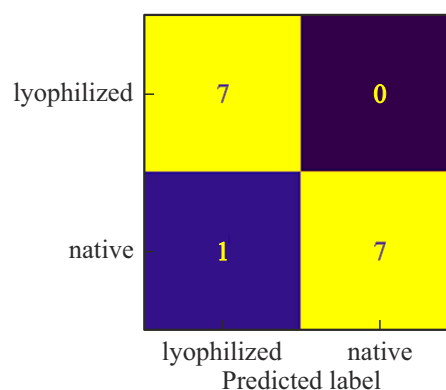


Рис. 3. Матрица решений.

$\sim 720 \text{ cm}^{-1}$ (*DNA*), что может свидетельствовать о разрушении клеточных структур после процесса лиофилизации.

В то же время линии КР, соответствующие органической структуре, сохраняются в образцах после лиофилизации: $\sim 1262 \text{ cm}^{-1}$ (*Amide III*), $\sim 1298 \text{ cm}^{-1}$ (CH_3 , CH_2 twisting, collagen), $\sim 1438 \text{ cm}^{-1}$ (CH_2 deformation), $\sim 1555 \text{ cm}^{-1}$ (*Amide II*), $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$ (*Amide I, α -helix protein*), $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$ (*Phospholipids*), что свидетельствует о сохранности данных структур после процесса лиофилизации.

Для дополнительного анализа исследуемых образцов был выбран метод линейного дискриминантного анализа в программе RS-Tool.

На рис. 2 представлены результаты PCA-анализа для 2 исследуемых групп образцов (в программе SPSS Statistics). Группе 1 соответствуют значения $-0.5 < \text{PC} - 2 < 2$ и $\text{PC} - 1 < 0$, а группа 2 занимает практически весь приведенный диапазон PC-1 и PC-2.

Из рис. 2 видно, что изменения по PC-1 и PC-2 незначительные между двумя исследуемыми группами, что свидетельствует о небольшом различии в структуре образцов после процесса лиофилизации. Основные спек-

тральные различия между исследуемыми группами проявляются на линиях КР, соответствующих клеточным структурам в составе образцов.

Результаты классификации групп представлены на рис. 3.

Видно, что количество правильно классифицированных значений приблизительно равно для каждой из групп. Для 1-й и 2-й групп количество правильно классифицированных значений составило 7 из 8.

Выводы

С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния установлено, что после лиофилизации происходит разрушение клеточных структур (линии КР 604 cm^{-1} (*Nucleotide conformation*) и 720 cm^{-1} (*DNA*)). Показано, что линии КР, соответствующие органической структуре: 936 cm^{-1} (*C-C stretching in protein*), 966 cm^{-1} (*Lipids*), 1077 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$ *phospholipids (lipid assignment)*), 1262 cm^{-1} (*Amide III*), 1298 cm^{-1} (CH_3 , CH_2 *twisting, collagen*), 1438 cm^{-1} (CH_2 *deformation*), 1555 cm^{-1} (*Amide II*), 1654 cm^{-1} (*Amide I, alpha-helix protein*), 1745 cm^{-1} (*Phospholipids*) сохраняются после лиофилизации по технологии „ЛИО-ПЛАСТ“, что свидетельствует об отсутствии значимого влияния её на органическую структуру биоматериалов.

Показана возможность применения метода спектроскопии комбинационного рассеяния для оценки процесса лиофилизации капсулы мочевого пузыря.

Соблюдение этических стандартов

Исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией, протокол был одобрен Комитетом по этике (выписка из протокола № 207 заседания комитета по биоэтике Самарского государственного медицинского университета от 09.12.2020 г.).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] B.L. Eppley, W.S. Pietrzak, M.W. Blanton. *J Craniofac Surg*, **16** (6), 981–989 (2005). DOI: 10.1097/01.scs.0000179662.38172.dd
- [2] О.В. Мкртычев, В.Е. Привалов, А.Э. Фотиади, В.Г. Шеманин. Научно-технические Ведомости СПб ГПУ. Физико-математические науки, **1** (213), 128–135 (2015). DOI: 10.5862/JPM.213.13
- [3] Г.И. Долгих, В.Е. Привалов. *Лазерная физика. Фундаментальные и прикладные исследования* (Рея, Владивосток, 2016).
- [4] Е.В. Тимченко, П.Е. Тимченко, Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, Л.Т. Волова, О.О. Фролов, Я.В. Федорова, Г.П. Тихомирова, Д.А. Романова, М.А. Даниэль. *Опт. и спектр.*, **128** (7), 982–990 (2020). DOI: 10.21883/OS.2020.07.49571.75-20 [E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, E.V. Pisareva, M.Yu. Vlasov, L.T. Volova, O.O. Frolov, Ya.V. Fedorova, G.P. Tikhomirova, D.A. Romanova, M.A. Daniel. *Opt. Spectrosc.*, **128** (7), 989–997 (2020). DOI: 10.1134/S0030400X20070243].
- [5] E. Cordero, J.Rüger, D. Marti, A.S. Mondol, T.Hasselager, K. Mogensen, G.G. Hermann, J. Popp, I.W. Schie. *J. Biophotonics*, **13** (2), (2020). DOI: 10.1002/jbio.201960025
- [6] M. Kanmalar, Siti Fairus Abdul Sani, Nur Izzahtul Nabilla B. Kamri, Nur Akmarina B.M. Said, Amirah Hajirah B.A. Jamil, S. Kuppusamy, K.S. Mun, D.A. Bradley. *Cellular & Molecular Biology Lett.*, **27** (9), (2022). DOI: 10.1186/s11658-022-00307-x
- [7] Bas W.D. de Jong, Tom C. Bakker Schut, KeesMaquelin, Theo van der Kwast, Chris H. Bangma, Dirk-Jan Kok, Gerwin J. Puppels. *Analytical Chemistry*, **78** (22), 7761–7769 (2006). DOI: 10.1021/ac061417b
- [8] D.O. Freytes, R.S. Tullius, J.E. Valentin, A.M. Stewart-Akers, S.F. Badylak. *J. Biomedical Materials Research*, **87A** (4), 862–872 (2008). DOI: 10.1002/jbma.a.31821
- [9] B.L. Eppley, W.S. Pietrzak, M.W. Blanton. *J Craniofac Surg*, **16** (6), 981–989 (2005). DOI: 10.1097/01.scs.0000179662.38172.dd
- [10] О.В. Мкртычев, В.Е. Привалов, А.Э. Фотиади, В.Г. Шеманин. Научно-технические Ведомости СПб ГПУ. Физико-математические науки, **1** (213), 128–135 (2015). DOI: 10.5862/JPM.213.13
- [11] Г.И. Долгих, В.Е. Привалов. *Лазерная физика. Фундаментальные и прикладные исследования* (Рея, Владивосток, 2016).
- [12] Е.В. Тимченко, П.Е. Тимченко, Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, Л.Т. Волова, О.О. Фролов, Я.В. Федорова, Г.П. Тихомирова, Д.А. Романова, М.А. Даниэль. *Опт. и спектр.*, **128** (7), 982–990 (2020). DOI: 10.21883/OS.2020.07.49571.75-20