

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭФФЕКТА ШТАРКА В АНАЛИЗЕ СПЕКТРОВ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ АДЕНОКАРЦИНОМ

И. Г. Мотевич^{1*}, А. В. Шульга², С. А. Маскевич³, Н. Д. Стрекаль¹

УДК 535.375.5

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2023-90-2-186-190>

¹ Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь; e-mail: i.motevich@grsu.by

² Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

³ Белорусский государственный университет,

Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова, Минск, Беларусь

(Поступила 15 февраля 2023)

Проведен комплексный анализ гистологических препаратов толстой кишки без патологии, хронического колита и операционного материала первичных колоректальных аденокарцином с учетом выживаемости пациентов после стандартного лечения методом конфокальной микроспектроскопии комбинационного рассеяния света с пространственным разрешением. Показано, что основным различием в спектрах нормальных и патологически измененных тканей являются положения и относительные интенсивности колебательных полос на частотах 1248, 1537, 1587 и 1620 см⁻¹. Анализ спектральных изменений проведен в рамках эффекта Штарка в предположении изменения локального электрического поля в клетках эпителия в процессе онкогенеза.

Ключевые слова: эффект Штарка, микроспектроскопия комбинационного рассеяния света, колоректальная аденокарцинома.

The complex analysis of histological preparations of the colon without pathology, chronic colitis and surgical material of primary colorectal adenocarcinomas, taking into account the survival of patients after standard treatment using confocal Raman microspectroscopy with spatial resolution was presented. It is shown that the main difference in the spectra of normal and pathologically altered tissues are the positions and relative intensities of vibrational bands at frequencies of 1248, 1537, 1587, and 1620 cm⁻¹. The analysis of spectral changes was carried out within the framework of the Stark effect assuming changes in the local electric field in epithelial cells during oncogenesis.

Keywords: Stark effect, Raman microspectroscopy, colorectal adenocarcinomas.

Введение. Молекулярная спектроскопия, большой вклад в которую внес академик АН БССР Б. И. Степанов [1], несмотря на разнообразие коммерческих программ квантово-химических расчетов молекул, остается единственным источником фундаментального научного понимания проблемы. Научные достижения Б. И. Степанова в совокупности с прогрессивным развитием и совершенствованием технической базы молекулярной спектроскопии актуальны и в настоящее время.

Использование методов оптической спектроскопии биологических тканей открывает новые возможности в обнаружении раковых изменений даже на ранних стадиях канцерогенеза. Данная многомерная спектроскопическая диагностика может предоставить объективную биохимическую информацию в режиме реального времени с полностью автоматизированными протоколами подозрительных поражений [2—6]. Спектроскопические методы имеют важное значение для диагностики рака

STARK EFFECT MODELING IN RAMAN SPECTRA ANALYSIS OF HISTOLOGICAL PREPARATIONS OF COLORECTAL ADENOCARCINOMAS

I. G. Motevich^{1*}, A. V. Shulga², S. A. Maskevich³, N. D. Strekal¹ (¹ Yanka Kupala Grodno State University, Grodno, Belarus; e-mail: i.motevich@grsu.by; ² Grodno State Medical University, Grodno, Belarus;

³ Belarusian State University, A. D. Sakharov International State Ecological Institute, Minsk, Belarus)

на ранней стадии, а также служат руководством для точной идентификации границ ткани во время хирургических процедур в режиме реального времени. Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР) является одним из старейших методов анализа биологических молекул. В последние годы много работ посвящено применению спектроскопии КР и визуализации в биомедицинской диагностике для анализа тканей и клеток, в том числе живых. Спектроскопия КР обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами диагностики: простотой пробоподготовки, большим объемом получаемой информации и неразрушающим характером анализа. Положение, интенсивность и ширина пиков КР в колебательных спектрах могут быть использованы для мониторинга функциональных групп или конкретных молекул в различных неоднородных условиях и окружающих средах. В биологических системах такие различные состояния образцов связаны со здоровьем или болезненными состояниями, правильным или нарушенным обменом веществ, стрессом и т. д.

Известно, что процесс канцерогенеза сопровождается изменениями не только морфологических признаков, но и ионного окружения опухолевых клеток, вырабатывающих специфические продукты жизнедеятельности. Это связано с увеличением скорости их метаболизма, избирательным накоплением определенных элементов [7], функционированием митогенов и другими факторами ангиогенеза. С физической точки зрения опосредованный по всей культуре ткани результат жизнедеятельности здоровой и патологически измененной клеток проявляется в итоге в изменении локального электростатического поля в процессе онкогенеза. Физическое моделирование этого результата сводится к анализу спектральных изменений флуоресценции специальных зондов, в том числе контрастирующих хромофоров, которыми окрашивается биоптат, в рамках проявления эффекта Штарка [8]. Такой подход использован в предыдущих работах по дифференцировке клеток по данным спектrophотометрии [9] и люминесценции [10].

Цель данной работы — интерпретация в рамках модели Штарка дифференцированных клеточных тканей по полученным с пространственным разрешением спектрам КР гистологических срезов толстой кишки с различной патологией.

Эксперимент. В качестве образцов выбраны гистологические препараты эпителия толстой кишки без патологии, с воспалением (хронический колит умеренной степени выраженности) и операционный материал первичных колоректальных аденокарцином. Медиана возраста пациентов на момент операции составила 65.06 (60.42—72.86) лет. Клинические данные получены из историй болезни, амбулаторных карт, регистра областного онкологического диспансера УЗ “Гродненская университетская клиника”. Динамическое наблюдение в течение 1—180 месяцев проводилось в соответствии с национальными протоколами. Случай считался завершенным по времени диагностики рецидива, метастазов или смерти от основного заболевания. С учетом этого выделены две группы пациентов: проживших >5 лет без прогрессирования процесса и <5 лет, которые умерли от основного заболевания, было метастазирование или рецидив.

После вырезки фрагменты толстой кишки дегитратировались с помощью тканевого процессора в батарее спиртов восходящей концентрации, заключались в парафиновую среду (гистомикс экстра) с сохранением ориентации. Из блоков изготавливались гистологические срезы толщиной 4 мкм. В качестве контрастирующих красителей выбраны кислый эозин и основной гематоксилин (H&E) (Sigma-Aldridge). Окрашивание H&E гистологических срезов проводилось на кафедре патологической анатомии Гродненского медицинского университета. Регистрация спектров КР гистологических срезов осуществлялась на 3D-сканирующем конфокальном микроскопе со спектрометром Nanofinder S (SOL Instruments, Беларусь). Источником возбуждения служило лазерное излучение с $\lambda = 633$ нм. Статистическая достоверность полученных результатов достигалась за счет измерений в разных однотипных точках среза, а также использовалась выборка однотипных срезов тканей большого числа пациентов. В каждой группе пациентов представлено не менее 20 образцов.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведены оптические изображения, полученные с помощью конфокального микроскопа Nanofinder S, а также усредненные по группам пациентов спектры КР типичных гистологических срезов без патологии и аденокарцином толстой кишки. Рассмотрен диапазон частот $1500\text{—}1650\text{ см}^{-1}$, в котором происходят заметные изменения при переходе от здоровых тканей к патологически измененным. В спектре КР гистологического среза без патологии наблюдаются полосы 1537 , 1587 и 1620 см^{-1} . Полоса 1537 см^{-1} соответствует деформационным колебаниям $\delta(\text{NH})$, $\delta(\text{CH}_2)$ и валентным колебаниям $\nu(\text{CN})$ амида II [11]. На частотах 1587 и 1620 см^{-1} наблюдаются деформационные колебания связи $\delta(\text{N}^+\text{H}_3)$ и $\nu(\text{COO}^-)$ в белках [12], т. е. все три полосы данного частотного диапазона спектра КР принадлежат колебаниям белковых компонентов тканей

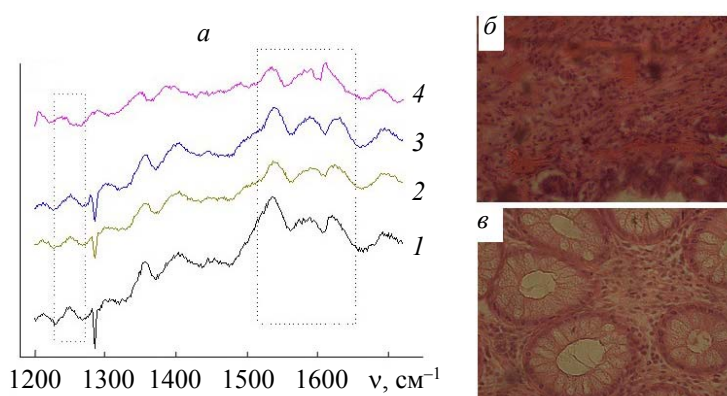


Рис. 1. Спектры КР (а), полученные с помощью конфокального микроскопа Nanofinder S путем усреднения в однотипных точках изображений без патологии (1) и с развитием злокачественных новообразований (2 — воспаление, 3 — с выживаемостью <5 лет, 4 — с выживаемостью >5 лет); оптические изображения типичных гистологических срезов, окрашенных Н&Е, без патологии (б) и аденокарциномы толстой кишки (в)

гистологических срезов. В этом случае спектральное положение полос КР образца отражает величину локального электрического поля, в котором происходит колебательное движение групп атомов, а их относительная интенсивность — поляризуемость, также зависящую от локального электрического поля в тканях.

В срезах с патологическими процессами положение и относительная интенсивность полос претерпевают ряд изменений: в гистологических срезах аденокарциномы (с выживаемостью <5 лет) и в препаратах с воспалением полоса 1537 см^{-1} смещается в высокочастотную область до 1539 и 1541 см^{-1} . Аналогичная ситуация наблюдается и с колебательными полосами 1587 и 1620 см^{-1} (табл. 1). В гистологических срезах аденокарциномы толстой кишки (с выживаемостью >5 лет) полоса 1620 см^{-1} , наоборот, смещается в низкочастотную область до 1613 см^{-1} . Если рассмотреть относительную интенсивность этих полос, приняв за единицу относительную интенсивность полосы 1355 см^{-1} , которая не претерпевает заметных изменений, можно отметить, что интенсивность полос 1590 и 1620 см^{-1} уменьшается в гистологических срезах пациентов с выживаемостью <5 лет, в то время как в патологических срезах в группе с выживаемостью >5 лет и с воспалением — возрастает (табл. 1). Относительная интенсивность полосы 1538 см^{-1} уменьшается для всех патологий.

Т а б л и ц а 1. Относительные интенсивности ($I_{\text{отн}}$) колебательных полос в спектрах КР тканей толстой кишки

Без патологии		С патологией					
		Воспаление		Выживаемость <5 лет		Выживаемость >5 лет	
$\nu, \text{см}^{-1}$	$I_{\text{отн}}$	$\nu, \text{см}^{-1}$	$I_{\text{отн}}$	$\nu, \text{см}^{-1}$	$I_{\text{отн}}$	$\nu, \text{см}^{-1}$	$I_{\text{отн}}$
1248	0.44	1250	0.53	1250	0.4	1240	0.43
1537	2.08	1541	1.84	1539	0.67	1537	1.32
1587	1.26	1592	1.31	1590	0.49	1589	1.43
1620	1.28	1623	1.4	1629	0.42	1613	1.93

В области 1240 см^{-1} проявляются деформационные колебания пептидной группы амид III и деформационные колебания $\delta(\text{OH})$ и $\delta(\text{NH})$ боковых цепей ряда аминокислот [13]. Данные группы атомов участвуют в образовании водородных связей и межмолекулярных взаимодействиях. Колебания амид III происходят при 1248 см^{-1} в гистологических срезах без патологии, в то время как в препаратах аденокарциномы пациентов с выживаемостью >5 лет проявляются в виде широкой полосы средней интенсивности с частотой 1240 см^{-1} , а в срезах с воспалением и аденокарциномы с выживаемостью в группе <5 лет — 1250 см^{-1} . Относительная интенсивность этой полосы практически не изменяется.

Причиной спектрального смещения колебательных полос в спектрах гистологических срезов разного уровня патологии могут быть различия в структурах и зарядах микроокружения данных

групп атомов для разных образцов [10]. Смещения для четырех указанных полос проанализируем в рамках модели эффекта Штарка [8, 14] в предположении, что спектральное смещение вызвано локальным электрическим полем. Предположим, что в гистологических срезах без патологии локальные электростатические поля, создаваемые протонами водорода и отрицательными гидроксил-ионами, взаимно экранируют друг друга.

Изменение частоты $\Delta\nu$ при переходе молекулы из начального состояния в конечное во внешнем электрическом поле напряженностью E , вызванное нескомпенсированными электрическими зарядами, может быть представлено в виде

$$\Delta\nu = -\Delta\mu E - 1/2 E \Delta\alpha E,$$

где $\Delta\mu$ — изменение дипольного момента; $\Delta\alpha$ — изменение поляризуемости молекулы или ее отдельного фрагмента. В зависимости от того, что дает наибольший вклад в выражение для $\Delta\nu$, наблюдается линейный (первое слагаемое) или квадратичный (второе слагаемое) эффект Штарка. Действительно, если молекула (или ее фрагмент на определенной частоте колебания) обладает дипольным моментом, то зависимость от напряженности поля носит линейный характер, а если молекулу или ее фрагмент можно характеризовать наведенным дипольным моментом, связанным с поляризуемостью системы, то зависимость от напряженности носит квадратичный характер. Как известно, интенсивность колебательных полос в спектрах КР обусловлена именно значительными изменениями поляризуемости групп, участвующих в нормальном колебании. Поэтому очевидно, что увеличение/уменьшение относительной интенсивности колебательных полос также должно сопровождаться изменением поляризуемости и увеличением вклада квадратичного эффекта Штарка.

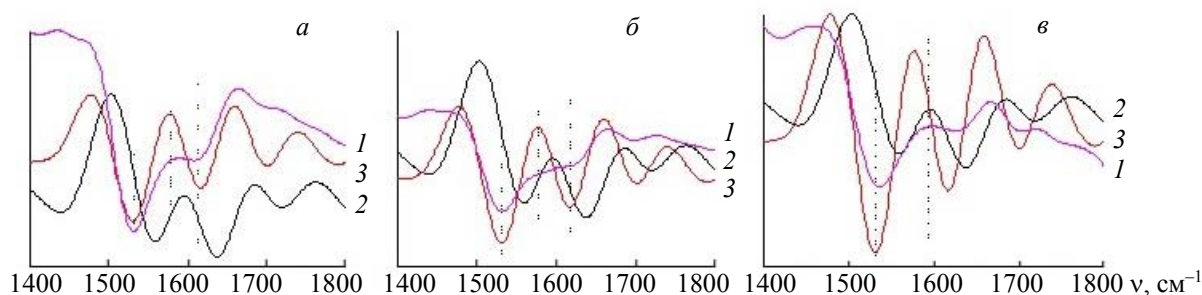


Рис. 2. Спектры, полученные как разница между спектром КР патологических тканей и спектром КР среза без патологии (1), а также первая (2) и вторая (3) производные от спектра КР гистологического среза без патологии; а — патология с выживаемостью <5 лет, б — воспаление, в — патология с выживаемостью >5 лет

На рис. 2 представлены спектры, полученные как разница между спектром КР патологических тканей и спектром КР среза без патологии (далее — разностные спектры), а также первая и вторая производные от спектра КР гистологического среза без патологии. Данный спектр может быть представлен как суперпозиция первой и второй производных от спектра КР без патологии (без поля). Разностный спектр при 1540 см^{-1} во всех гистологических срезах патологий хорошо аппроксимируется второй производной от спектра КР гистологического среза без патологии (рис. 2, кривые 3). При 1537 см^{-1} происходят деформационные колебания $\delta(\text{NH})$, $\delta(\text{NH}_2)$ и валентные колебания $\nu(\text{CN})$ амида II. Разностный спектр, полученный в гистологических срезах воспаления и аденокарциномы с выживаемостью <5 лет, в диапазоне $1590\text{—}1630\text{ см}^{-1}$ также хорошо аппроксимируется второй производной от спектра КР гистологического среза без патологии (рис. 2, а, б). В этом случае наблюдается линейный эффект Штарка, обусловленный наличием у данной группы атомов дипольного момента. Это хорошо согласуется с отнесением колебаний к ионогенным группам атомов N^+H_3 и COO^- в белках. Разностный спектр для гистологических срезов с выживаемостью >5 лет в диапазоне $1590\text{—}1630\text{ см}^{-1}$ аппроксимируется первой производной от спектра КР гистологического среза без патологии (рис. 2, в), что обусловлено изменением поляризуемости данных групп атомов. Это возможно лишь в случае, когда группа N^+H_3 депротонирована, а карбоксигруппа COO^- , наоборот, протонирована.

Смещение полосы 1240 см^{-1} в спектре КР гистологического среза аденокарциномы с выживаемостью >5 лет в рамках штарковской спектроскопии описывается первой производной, что свиде-

льствует о проявлении квадратичного эффекта Штарка. Кроме того, группа, участвующая в колебаниях с этой частотой, не обладает дипольным моментом и переход обусловлен сугубо изменением поляризуемости. На эти выводы указывает также увеличение относительной интенсивности полос для тканей пациентов с выживаемостью >5 лет, что имеет место в случае КР-спектроскопии. Смещения колебательной полосы 1240 см^{-1} для гистологических срезов пациентов с воспалением и аденокарциномой с выживаемостью <5 лет невозможно представить с помощью первой или второй производной. Полученный разностный спектр является линейной комбинацией двух производных.

Заключение. Современные достижения спектроскопии КР с пространственным разрешением для исследования гистологических срезов открывают новые возможности дифференцировки клеток, которые позволяют определить изменения в гистологических тканях с патологией и могут быть использованы как дополнительные средства для диагностики злокачественных новообразований. Изменения в спектрах КР гистологических срезов аденокарциномы связаны с изменением зарядового окружения отдельных групп атомов, что хорошо согласуется с результатами анализа смещения колебательных полос в рамках штарковской спектроскопии и изменения их относительной интенсивности как способности к изменению поляризуемости отдельных молекулярных групп в комбинационном рассеянии света. Для получения более конкретной информации о происходящих при патологии изменениях структуры белковых молекул требуется сочетанный анализ спектров КР срезов с помощью конфокальной микроскопии с данными иммуногистохимии. Ранее [15] для данных образцов было определено прогностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки и выявлено два маркера ангиогенеза VEGF-A CD105, уровень которых коррелирует с выживаемостью пациентов. Так, продолжительность жизни пациента от трех до пяти лет прогнозируется, если VEGF-A в строме опухоли <0.965 , но ≥ 0.95 (чувствительность 71 %, специфичность 82 %), а CD105 ≥ 0.725 (чувствительность 85 %, специфичность 86 %). Скорректированную безрецидивную выживаемость более пяти лет можно прогнозировать при уровнях VEGF-A в опухолевой строме ≥ 0.965 (чувствительность 71 %, специфичность 82 %), а CD105 <0.725 (чувствительность 85 %, специфичность 86 %). Таким образом, КР-микроспектрометрия с пространственным разрешением открывает новые возможности в оценке прямого или опосредованного влияния уровня маркеров ангиогенеза в тканях толстой кишки в рамках модели Штарка.

Работа выполнена в рамках ГПНИ “Конвергенция” (грант 3.03.7), а также при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Ф21ТЮБ-012).

- [1] М. В. Волькенштейн, Л. А. Грибов, М. А. Ельяшевич, Б. И. Степанов. Колебания молекул, изд. 2-е, Москва, Наука (1972)
- [2] A. Imiela, B. Polis, L. Polis, H. Abramczyk. *Oncotarget*, **8** (2017) 85290—85310
- [3] B. Brozek-Pluska, M. Kopec. *Spectrochim. Acta A*, **169** (2016) 182—191
- [4] S. Cui, S. Zhang, S. Yue. *J. Health Eng.* (2018) 8619342
- [5] G.W. Auner, S. K. Koya, C. Huang, B. Broadbent, M. Trexler, Z. Auner, A. Elias, K. C. Mehne, M. A. Brusatori. *Cancer Metastasis Rev.*, **37**, N 4 (2018) 691—717
- [6] K. Hanna, E. Krzoska, A. M. Shaaban, D. Muirhead. *British J. Cancer*, **126** (2022) 1125—1139
- [7] И. Г. Мотевич, Н. Д. Стрекаль, Н. М. Попко, М. И. Глебович, А. В. Шульга, С. А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **82**, № 1 (2015) 103—109 [I. G. Motevich, N. D. Strekal, N. M. Papko, M. I. Glebovich, A. V. Shulha, S. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **82**, N 1 (2015) 98—103]
- [8] Н. Д. Стрекаль, С. А. Маскевич. *Наука и инновации*, **129**, № 11 (2013) 62—65
- [9] И. Г. Мотевич, Н. Д. Стрекаль, А. В. Шульга, С. А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **83**, № 2 (2016) 255—261 [I. G. Motevich, N. D. Strekal, A. V. Shulha, S. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **83**, N 2 (2016) 234—239]
- [10] И. Г. Мотевич, Н. Д. Стрекаль, А. В. Шульга, С. А. Маскевич. *Опт. и спектр.*, **124**, № 5 (2018) 605—611
- [11] B. Brozek-Pluska, J. Musial, R. Kordek, H. Abramczyk. *J. Mol. Sci.*, **20** (2019), doi: 10.3390/ijms20143398
- [12] A. Sadat, I. J. Joye. *Appl. Sci.*, **10** (2020), doi: 10.3390/app10175918
- [13] Г. Н. Тен, А. Ю. Герасименко, Н. Е. Щербакова, В. И. Баранов. *Изв. Саратов. ун-та. Сер. физика*, **19**, № 1 (2019) 43—57
- [14] G. U. Bublitz, St. G. Boxer. *Ann. Rev.*, **48** (1997) 213—243
- [15] Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк. *Евраз. онкол. журн.*, **8**, № 1 (2016) 42—48