УДК 535.33/.34 535.3

DOI: 10.21779/2542-0321-2018-33-4-129-138

К.М. Гираев^{1,2}, Э.Х. Исрапов^{1,2}, А.А. Муртазаева^{1,2}, Н.А. Ашурбеков¹

Влияние злокачественных новообразований на формирование спектров инфракрасного поглощения проб желчи и панкреатического сока

¹ Дагестанский государственный университет; Россия, 367001, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а;

² Институт физики им. Х.И. Амирханова ДНЦ РАН; Россия, 367003, г. Махачкала, ул. М. Ярагского, 94; kamal_girayev@mail.ru

С использованием метода ИК-Фурье спектроскопии исследованы характеристики поглощения для проб пищеварительных ферментов при различных заболеваниях поджелудочной железы в спектральном диапазоне волновых чисел – 7800–350 см⁻¹. Выполнен спектральный анализ, и установлено, что спектры инфракрасного поглощения сформированы колебаниями ОН-, NH-, СС(С = Н, С, N, О, S) – и РО-групп нуклеиновых кислот, ароматических аминокислот, структурных белков, углеводов, липидов и жирных кислот. Развитие процессов малигнизации приводит к росту интенсивности поглощения в области 1600–400 см⁻¹ и вблизи частоты 840±5 см⁻¹, что может быть вызвано как колебаниями левозакрученной ДНК Z-формы, так и колебаниями перекисных О–О-групп, соответствующих алифатическим и ароматическим перекисям и перекисным кислотам.

Ключевые слова: желчь, панкреатический сок, процессы малигнизации, ИК-Фурье спектроскопия, молекулярный состав, диагностика.

Введение

Как известно, возможности применения спектроскопии инфракрасного поглощения и комбинационного рассеяния практически безграничны и широко используются в различных областях народного хозяйства (промышленность, сельское хозяйство, фармацевтика и др.) и в научных исследованиях при решении различных задач фундаментального и прикладного характера [1–3]. В последнее время методы колебательной спектроскопии получили широкое распространение при мониторинге и диагностике онкологических заболеваний различных органов или для контроля качества их медикаментозного лечения. Известны работы, где различные методы ИК-спектроскопии используется для определения концентрации глюкозы, кислорода или липидов в крови, для определения степени дегидратации кожных покровов и различных форм онкологических заболеваний внутренних органов и др. Систематизированные и обобщённые результаты этих исследований приведены в многочисленных статьях и аналитических обзорах [3–6].

Согласно последним данным Всемирной организации здравоохранения, одним из наиболее распространенных и агрессивных типов онкологических заболеваний является аденокарцинома поджелудочной железы, что обусловлено множеством причин. В частности, авторами работы [7] отмечено: «К числу этиологических и патогенетических факторов развития рака поджелудочной железы относят отсутствие ярко выра-

женных симптомов течения заболевания, высокую чувствительность к воздействию неблагоприятных факторов (злоупотребление алкоголем, нерегулярное и несбалансированное питание, авитаминоз) и др.». В этой связи развитие диагностических методов на ранних стадиях развития онкологических заболеваний поджелудочной железы приобретает первостепенную важность.

В настоящей работе с целью исследования влияния злокачественных новообразований поджелудочной железы на физико-химические свойства пищеварительных ферментов измерены спектры инфракрасного поглощения образцов желчи и панкреатического сока в норме и с патологией. Для проведения количественного анализа был выполнен спектральный разложение полученных результатов и определена динамика состава молекулярных компонентов исследуемых биосред.

Материалы и методы

Для исследования спектров инфракрасного поглощения в работе использовались образцы желчи и панкреатического сока, полученные в ГБУ Республики Дагестан «Республиканская клиническая больница» в ходе оперативного лечения и секционных исследований больных с заболеваниями поджелудочной железы различной степени тяжести. Последующие патогистологические исследования биопсии тканей поджелудочной железы позволили отобрать по 7 проб желчи и панкреатического сока при хроническом панкреатите (биосреды при *средней стадии поражения*) и по 9 образцов желчи и панкреатического сока для случая аденокарциномы поджелудочной железы (образцы биосред при *крайней стадии поражения*).

Методика пробоподготовки заключалась в следующем. В целях минимизации влияния фонового спектра воды на спектры ИК-поглощения проб желчи и панкреатического сока образцы пищеварительных ферментов равномерно наносились на кварцевые стекла вдоль всей их поверхности и подвергались термическому (температура 40.0 ± 2.0 °C) и вакуумному (давление 5×10^{-6} мм рт. ст.) осушению в течение 2 часов.

Дальнейшая пробоподготовка заключалась в тщательном перемешивании тонкоизмельченных соскобов дегидратированных проб ферментов весом 10.0 ± 2.0 мг с порошком КВг и в последующем прессовании полученной смеси в пресс-форме.

Исследование спектров инфракрасного поглощения для проб пищеварительных ферментов проводилось посредством измерения оптической плотности – A на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 6700 (*Thermo Fisher Scientific, США*) в интервале частот $7800\text{--}350$ см^{-1} и со спектральным разрешением – 2.0 см^{-1} при 64-проходном сканировании. При этом оптическая плотность определялась как

$$A = \ln(T_{\text{смп}} - T_0)^{-1},$$

где $T_{\text{смп}}$ и T_0 – коэффициент трансмиссии соответственно для проб биологических сред и воздуха.

Спектроскопические измерения для каждой пробы пищеварительных ферментов выполнялись по несколько раз. Окончательный результат по спектрам инфракрасного поглощения определялся путем усреднения серийных измерений как –

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{\sigma} - \sigma_i)^2}{n(n-1)}},$$

где n – количество серийных измерений, σ_i – значения оптической плотности для i -той пробы, $\bar{\sigma}$ – среднее значение оптической плотности, определяемое как – $\sum_{i=1}^n \frac{\sigma_i}{n}$. Следо-

вательно, анализируемые результаты ИК-спектрометрии представляют собой статистический материал, отобранный и усредненный по видам пищеварительных ферментов и стадиям их патологического поражения.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 и 2 приводятся инфракрасные спектры оптической плотности A (инфракрасного поглощения), усредненные по количеству серийных измерений для желчи и панкреатического сока по мере развития аденокарциномы поджелудочной железы. Как можно видеть, оптическая плотность исследуемых веществ образует спектральный контур, состоящий из трех групп спектральных полос поглощения, обусловленных видом молекулярных колебаний различных соединений: $4400\text{--}2500\text{ см}^{-1}$, $2000\text{--}950\text{ см}^{-1}$ и $900\text{--}400\text{ см}^{-1}$. При этом если для первой группы спектры оптической плотности исследуемых веществ и соответствующих им патологий во многом схожи, то во второй и третьей группе (область «отпечатков пальцев») развитие злокачественных процессов приводит к существенным спектральным изменениям. В частности, это проявляется как в виде повышения интенсивности, так и в виде изменения формы спектрального контура поглощения, что обусловлено, согласно данным работ [8–11], ростом вкладов плоскостных и внеплоскостных колебаний различных соединений амидной группы, липидов, структурных белков, нуклеиновых и жирных кислот, содержание которых существенно варьируется в пробах желчи и сока поджелудочной железы в зависимости от формы заболевания (см. рис. 1 и 2).

Рис. 1. ИК-спектры оптической плотности A для проб желчи в норме (1) и при крайней форме патологии (2). Цифры – волновые числа, соответствующие спектральным пикам поглощения

Рис. 2. ИК-спектры оптической плотности A для проб панкреатического сока в норме (1) и при крайней форме патологии (2). Цифры – волновые числа, соответствующие спектральным пикам поглощения

С целью проведения более детального анализа о динамике вкладов групп соединений в спектры инфракрасного поглощения в работе выполнялось разложение спектрального контура A на отдельные компоненты. Для этого была разработана методика спектрального анализа, заключающаяся в моделировании кривой $F_{GL}(k)$, определяемой на основе комбинаций функций Гаусса – F_L и Лоренца – F_G путем итераций с проверкой качества подгонки по среднему ее отклонению от экспериментальной кривой $A(k)$ как

$$F_{GL}(k) = \mu F_G(k) + (1 - \mu) F_L(k),$$

где μ – параметр, распределенный на отрезке от 0 до 1, при $\mu = 0$ модельный контур приобретает Лоренцеву форму (F_L), а при $\mu = 1$ – Гауссову форму (F_G), k – волновое число. Качество сходимости теоретической и экспериментальной кривой определялось

$$\text{как } \delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A(k) - F_{GL}(k))_i^2}{A(k)}} \leq 1.0.$$

На рисунках 3 и 4 показан результат контурного анализа спектров оптической плотности A исследуемых веществ. Для наглядности спектры оптической плотности представлены в виде спектральных групп 3700–2800 cm^{-1} , 1800–950 cm^{-1} и 900–400 cm^{-1} . Сопоставление полученных результатов с со справочными данными органических соединений [8–13], позволило установить, что в спектральном диапазоне волновых чисел – 3700–2500 cm^{-1} инфракрасное поглощение проб желчи и сока поджелудочной железы определяется вкладом множества спектральных линий валентных симметричных и ассиметричных колебаний. Согласно данным работы [10] эти колебания соответствуют следующим группам: «Для группы $\nu(\text{OH})$ – 3420±5 cm^{-1} , для $\nu(\text{NH})$ -групп – 3295±3, 3203.0±3 и 2680/2635 cm^{-1} , из которых первые две полосы связаны с поглощением амида A и B , а также для $\nu(\text{CH})$ -групп – 3095±5 cm^{-1} , для $\nu(\text{CH}_3)$ -групп – 2965±5 и 2874±2 cm^{-1} и для $\nu(\text{CH}_2)$ -групп – 2930±3 и 2855±5 cm^{-1} » (см. рис. 3а, 3d, 4а, 4d).

Рис. 3. Контурное разложение ИК-спектров оптической плотности для проб желчи в норме (a)–(c) и при крайней стадии патологии (d)–(f)

Рис. 4. Контурное разложение ИК-спектров оптической плотности для проб панкреатического сока в норме (а)–(с) и при крайней стадии патологии (d)–(f)

В диапазоне волновых чисел $1800\text{--}1180\text{ см}^{-1}$ спектры оптической плотности A образованы, как известно [8, 9], комплексом полос поглощения *амидных групп* – *амида I* – $1800\text{--}1600\text{ см}^{-1}$, *амида II* – $1600\text{--}1480\text{ см}^{-1}$ и *амида III* – $1480\text{--}1180\text{ см}^{-1}$. В частности, согласно данным работ [8–14], в этих спектральных областях хорошо различимыми являются следующие компоненты (рис. 3*b*, 3*e*, 4*b*, 4*e*):

- валентные колебания сильной $\nu(CO)$ -связи неупорядоченной структуры – $1658\pm 2\text{ см}^{-1}$, в также α -закрученной спиральной и параллельного β -сдвига структуры – 1653 ± 2 и $1633\pm 2\text{ см}^{-1}$;

- валентные колебания карбонильных и карбоциклических групп вблизи волновых чисел – $1730\pm 5\text{ см}^{-1}$ и – $1632\pm 2\text{ см}^{-1}$;

- плоскостные деформационные колебания $\delta(NH)$ -групп и валентные колебания $\nu(CN)$ - и $\nu(CC)$ -групп вблизи волновых чисел – 1592 ± 3 , 1560 ± 3 и $1520\pm 2\text{ см}^{-1}$;

- деформационные симметричные/ассиметричные колебания для $\delta(CH_3/CH_2)$ -групп на волновых числах – 1458 ± 3 и $1378\pm 3\text{ см}^{-1}$ и для $\delta(C(CH_3)_2)$ -групп вблизи – 1403 ± 3 и $1355\pm 2\text{ см}^{-1}$;

- валентные колебания простых связей $\nu(CN)$ -групп и деформационных колебаний $\delta(NH)$ -групп на волновых числах – 1267 ± 3 , 1250 ± 5 и $1192\pm 2\text{ см}^{-1}$;

- вещерные и крутильные деформационные колебания $\delta(CH_3/CH_2)$ -групп вблизи волновых чисел – 1330 ± 3 , 1313 ± 3 и $1235\pm 3\text{ см}^{-1}$.

В области более низких частот ($1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$) спектр A биосред сформирован множеством полос поглощения (1172 ± 3 , 1152 ± 3 , 1123 ± 2 , 1112 ± 3 , 1079 ± 2 , 1050 ± 5 и $1020\pm 5\text{ см}^{-1}$), представленных скелетно-валентными колебаниями колец простых связей $\nu(C - C)$ и $\nu(C - O)$, а также деформационными колебаниями $\delta(C - OH)$ -групп.

Дальнейшее понижение частоты ($1000\text{--}400\text{ см}^{-1}$) приводит к появлению в спектрах оптической плотности A множества следующих сильно перекрывающихся полос поглощения (см. рис. 3*c*, 3*f*, 4*c* и 4*f*):

- валентные скелетные колебания ароматических колец $\nu(C - C)$ -групп и деформационные колебания $\delta(CH_3)$ - и $\delta(CNH)$ -групп на волновых числах – 977 ± 5 , 923 ± 2 , 915 ± 2 , 870 ± 2 , 852 ± 3 , 825 ± 5 , 750 ± 3 и $725\pm 2\text{ см}^{-1}$;

- комплекс внеплоскостных деформационных скелетных колебаний в диапазоне волновых чисел 647 ± 5 и $620\pm 3\text{ см}^{-1}$ – для $\delta(C - C)$ -групп; для $\delta(C - O - C)$ -групп – $937\text{--}850\text{ см}^{-1}$; для $\delta(C - N)$ -групп – $717\pm 5\text{ см}^{-1}$ и для $\delta(C - OH_3)$ -групп – 493 ± 3 и $472\pm 3\text{ см}^{-1}$;

- валентные колебания $\nu(C - S)$ - и $\nu(S - S)$ -групп соответственно вблизи волновых чисел – $735\text{--}640$ и $535\text{--}510\text{ см}^{-1}$.

Кроме того, в работе [10] показано: «...химический состав исследуемых веществ указывает на высокую вероятность поглощения фосфатных эфиров, образованных симметричными и асимметричными валентными колебаниями групп фосфатных ионов $\nu(PO_2^-)$ - и $\nu_3(PO_3^{3-})$ в интервале частот $1200\text{--}500\text{ см}^{-1}$, поглощения холестерина вблизи – 615.0 ± 5 , 550.0 ± 3 , 535.0 ± 5 и $432.0\pm 3\text{ см}^{-1}$, а также вкладов полос валентных колебаний галогенпроизводных групп сильной $\nu(C - Cl)$ -связи в диапазоне низких частот $800\text{--}600\text{ см}^{-1}$ ».

В то же время развитие аденокарциномы в тканях поджелудочной железы приводит к значительным изменениям формы и интенсивности спектров инфракрасного поглощения. При этом наиболее явные спектральные изменения, согласно данным работ

[8–10], наблюдаются для карбонильных и метиловых групп структурных белков, что выражается в виде усиления интенсивности поглощения вблизи волновых чисел – 1667 ± 2 , 1453 ± 3 , 1260 ± 5 , 1175 ± 3 , 890 ± 3 и 820 ± 3 см^{-1} . Кроме того, высока вероятность роли эндогенных порфиринов в усилении интенсивности поглощения вблизи волновых чисел – 1554 ± 3 , 1523 ± 3 , 1372 ± 5 , 1120 ± 5 , 955 ± 3 , 752 ± 5 и 672 ± 3 см^{-1} . Это может быть вызвано процессами катаболизма билирубина и высвобождением порфириновых групп. Примерно в этом же диапазоне вероятен вклад фосфатных групп (*фосфат I* и *II*) нуклеиновых кислот на частотах – 1242 ± 3 , 1085 ± 3 и 1075 ± 3 см^{-1} , что также хорошо согласуется с данными работ [8–13].

Отдельно следует коснуться полосы интенсивного поглощения вблизи волновых чисел 840 ± 5 см^{-1} , которая наблюдается для патологических биосред. Анализ обнаруженной зависимости позволяет предположить, что данный пик может быть вызван двумя факторами:

- колебанием $C_{2'}$ -эндо/анти и $C_{3'}$ -эндо/син конформации левозакрученной ДНК Z-формы, для которой характерны дополнительные полосы поглощения вблизи волновых чисел – 923 ± 5 , 868 ± 5 и 800 ± 5 см^{-1} [14];

- валентными колебаниями слабой связи перекисных $\nu(O - O)$ -групп алифатических и ароматических перекисей и перекисных кислот с поглощением в интервале волновых чисел $890\text{--}830$ см^{-1} [13].

В пользу данных предположений может свидетельствовать то, что оба указанных фактора – Z-ДНК структура нуклеиновой кислоты и перекисные соединения, известные как мягкие окислители, проявляются в результате активации метиловых групп и являются источниками активного кислорода [15–17], лежащего в основе развития многих форм патологии, включая процессы малигнизации.

Выводы

Исследование динамики спектральной зависимости оптической плотности в диапазоне волновых чисел $7800\text{--}400$ см^{-1} для проб желчи и панкреатического сока при различных стадиях развития аденокарциномы поджелудочной железы позволяет сформулировать следующие выводы:

- инфракрасное поглощение пищеварительных ферментов сформировано множеством сильно перекрывающихся полос молекулярного поглощения, из которых доминирующими являются колебания – OH -, NH -, $CC(C=H, C, N, O, S)$ - и PO -групп, характерных для нуклеиновых кислот (включая ароматические аминокислоты), а также для структурных белков, углеводов, липидов и жирных кислот и др.

- развитие аденокарциномы в тканях поджелудочной железы приводит к интенсификации поглощения в спектральной области волновых чисел $1600\text{--}400$ см^{-1} , соответствующих колебаниям карбонильных и метиловых групп структурных белков, а также фосфатных групп нуклеиновых кислот и производных эндогенных порфиринов;

- развитие злокачественных форм патологии приводит к интенсификации полосы поглощения вблизи 840 ± 5 см^{-1} , связанной с колебаниями как левозакрученной Z-формы нуклеиновой кислоты, так и перекисных соединений алифатических и ароматических перекисей и перекисных кислот.

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП «Аналитическая спектроскопия» Дагестанского государственного университета.

Литература

1. Daehne S., Resch-Genger U., Wolfbeis O.S. Near-Infrared Dyes for High Technology Applications. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. – 294 p.
2. Дель Фанти Н.А. Инфракрасная спектроскопия полимеров: пер. с англ. Б.Н. Тарасевич [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.biblus.ru / Default.asp?book46466glb> (дата обращения 16.05.2012).
3. Burns D.A., Ciurczak E.W. (eds.) Handbook of Near-Infrared Analysis, Practical Spectroscopy, 2nd edit. Marcel Decker. – NY, 2001. – 317 p.
4. Elmi F., Movaghar A.F., Elmi M.M. et al. Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis // Spectrochim Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. – 2017. – V. 187. – P. 87–91.
5. Kraznovska E., Lach L., Depciuch J. et al. Application of infrared spectroscopy for the identification of squamous cell carcinoma (lung cancer). Preliminary study // Infrared Physics & Technology. – 2018. – V. 89. – P. 282–290.
6. Petibois Cyril and Deleris Gerard. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology // TRENDS in Biotechnology. – 2006. – V. 24. – P. 455–462.
7. Маев И.В., Кучерявый Ю.А. Болезни поджелудочной железы: руководство. – М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2009. – 736 с.
8. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues // Applied Spectroscopy Reviews. – 2008. – V. 43. – P. 134–179.
9. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. Raman Spectroscopy of Biological Tissues // Applied Spectroscopy Reviews. – 2007. – V. 42. – P. 493–541.
10. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Магомедов М.А. и др. Влияние процессов малигнизации в тканях поджелудочной железы на формирование оптических и инфракрасных спектров проб желчи и панкреатического сока // Биофизика. – 2017. – Т. 62, №. 4. – С. 784–793.
11. Bellisola G., Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis // Am J Cancer Res. – 2012. – V. 2. – P. 1–21.
12. Petibois C., Deleris G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology // TRENDS in Biotechnology. – 2006. – V. 24. – P. 455–462.
13. Тарасевич Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений. – М.: Intertech Thermo. 2009. – 53 с.
14. Simonova D. and Karamancheva I. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Tumor Diagnosis // Biotechnology & Biotechnological. – 2013. – V. 27. – P. 4200–4207.
15. Baker M.J., Trevisan J., Bassan P. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials // Nat. Protoc. – 2014. – V. 9. – P. 1771–1791.
16. Zelig U., Barlev E., Bar O. et al. Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study // BMC Cancer. – 2015. – V. 15. – P. 408–410.
17. Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – Т. 1–3.

Поступила в редакцию 1 декабря 2018 г.

UDC 535.33/.34; 535.3

DOI: 10.21779/2542-0321-2018-33-4-129-138

The effect of malignant tumors on the formation of infrared absorption spectra of bile and pancreatic juice samples

K.M. Giraev^{1,2}, E.Kh. Israpov^{1,2}, A.A. Murtazaeva^{1,2}, N.A. Ashurbekov¹

¹ Dagestan State University; Russia, 367001, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a;

² Amirkhanov Institute of Physics Dagestan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; Russia, 367003, Makhachkala, M. Yaragski st., 94; kamal_giraev@mail.ru

The infrared absorption spectra were measured for samples of bile and pancreatic juice during the development of malignancy processes in the spectral range of wavenumbers – 7800–350 cm⁻¹. A spectral analysis was performed and it was found out that the infrared absorption spectra are formed by vibrations of OH-, NH-, CC(C = H, C, N, O, S) – and PO-groups of nucleic acids, aromatic amino acids, structural proteins, carbohydrates, lipids and fatty acids. The development of malignant processes leads to an increase in the intensity of absorption in the region of 1600–400 cm⁻¹ and near the frequency of 840±5 cm⁻¹, which may be caused by fluctuations in the Z-shaped left-handed DNA and peroxide O–O-groups corresponding to aliphatic and aromatic peroxides and peroxide acids.

Keywords: *bile, pancreatic juice, malignancy processes, FTIR spectrometry, molecular composition, diagnostics.*

Received 1 December, 2018