

УДК 612.117.5 : 535.51

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЛИПСОМЕТРИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ БИООРГАНИЧЕСКИХ СРЕД

М. И. Воевода¹, С. Е. Пельтек¹, М. В. Кручинина², С. А. Курилович²,
В. Н. Кручинин³, С. В. Рыхлицкий³, К. П. Могильников³

¹ Учреждение Российской академии наук

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10*

² Учреждение Российской академии медицинских наук

*Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН,
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1*

³ Учреждение Российской академии наук

*Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова Сибирского отделения РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13*

E-mail: kruch@isp.nsc.ru

Методом спектральной эллипсометрии проведено исследование тонких плёнок, полученных центрифугированием сыворотки крови здоровых людей и пациентов с диффузной патологией печени с разной степенью фиброза. Обнаружено, что физические свойства плёнок зависят от биоорганического состава сыворотки крови, который, в свою очередь, определяется патологическими процессами, протекающими при различной степени фиброза печени. Получены корреляции биохимических параметров сыворотки крови и эллипсометрических показателей. Проведены пилотные эллипсометрические эксперименты по исследованию сывороток крови в условиях наблюдения поверхностного плазмонного резонанса у пациентов с опухолями кишечника. Выявлено наличие стойкого специфического взаимодействия между антигенами сывороток крови пациентов и моноклональными антителами СД24, которое приводит к изменению положения поверхностного плазмонного резонанса. Показано, что эллипсометрия представляет собой высокочувствительный, неразрушающий, экономичный экспресс-метод скрининга, предварительной диагностики стадий заболевания пациентов с патологией внутренних органов.

Ключевые слова: эллипсометрия, сыворотка крови, патология внутренних органов, поверхностный плазмонный резонанс.

Введение. В диагностике патологии внутренних органов всё большее значение приобретают методы, позволяющие в короткие сроки получить комплексную информацию о наличии процесса, его активности, прогрессивности, осложнений. Особенно ценны методы, дающие возможность выявить ранние стадии заболевания, а также методы скрининга, определяющие группы пациентов, нуждающихся в дальнейшем углублённом обследовании. Это актуально как в медицинском, так и в экономическом плане [1].

Среди множества методов, используемых в биомедицинских исследованиях, особое место занимают оптические методы благодаря высокой чувствительности, а также неразрушающему и невозмущающему характеру воздействия на исследуемый объект [2]. В свою очередь, в ряду оптических методов всё большую популярность при изучении биологических сред приобретает эллипсометрия, прежде всего, такие высокоинформативные приложения метода, как эллипсометрия вблизи наблюдения поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и отображающая эллипсометрия [3–6].

Диагностика начальных стадий заболеваний внутренних органов, оценка степени тяжести при диффузной патологии печени (ДПП) и онкологических заболеваниях очень актуальны, так как они определяют прогноз болезни, выбор тактики терапии [7]. Общими

недостатками всех существующих в настоящее время методов оценки степени фиброза печени, стадии онкологических заболеваний являются высокая трудоёмкость, необходимость применения широкой номенклатуры различных ингредиентов, субъективизм, а в случае биопсии — инвазивность, травматичность исследования.

Цель данной работы состояла в оценке диагностической значимости метода эллипсометрии (спектральной эллипсометрии и эллипсометрии вблизи наблюдения ППР) при исследовании биоорганических сред в группах больных с ДПП с различной степенью фиброза и злокачественными заболеваниями внутренних органов (опухоли кишечника).

Материалы и методы. *Клинические исследования.* Обследовано 60 человек в возрасте от 19 до 58 лет ($36,5 \pm 2,49$ года): из них 22 женщины и 26 мужчин с диффузной патологией печени, 12 человек ($39,0 \pm 3,15$ года), у которых по данным биохимических и инструментальных методов исследования не было выявлено заболеваний внутренних органов, составили группу сравнения. Все обследованные дали информированное согласие на участие в экспериментах, которые проводились в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.

Степень выраженности фиброза печени устанавливалась на основании данных биопсии, которая была проведена 18 пациентам с диффузными заболеваниями печени. У 30 пациентов степень фиброза печени определялась макроморфологическими методами визуализации (УЗИ, КГ, ЯМРТ). Всем обследованным выполнены биохимические и инструментальные исследования, иммуноферментный анализ, полимеразно-цепная реакция для верификации вирусного генеза заболевания.

По результатам совокупного анализа сформированы три группы по степени выраженности фиброза печени. Первую составили обследуемые группы сравнения без признаков фиброза печени (F0). Вторая группа включала 25 пациентов с первой или второй степенью фиброза (лёгкий невыраженный фиброз — F1–F2). В третью входили 23 пациента с третьей или четвёртой степенью фиброза (выраженный фиброз — F3–F4).

Во второй группе выявлено наличие хронических вирусных гепатитов (у семи — С, у девяти — В, у четырёх — В + С) с минимальной (у 15 пациентов) и умеренной (у 10 больных) биохимической активностью (12 пациентов этой группы систематически употребляли алкоголь). В третьей группе у восьми человек верифицирован хронический вирусный гепатит С, у 12 человек — В, сочетанная вирусная (В + С)-инфекция — у двух больных, а (В + D) — у одного пациента. Биохимическая активность гепатитов у большей части пациентов была умеренной, степень компенсации цирроза по Чайлду — Пью соответствовала 8–10 баллам (класс В), у трёх человек — 12–14 баллам (класс С).

В предварительных эллипсометрических экспериментах по исследованию сывороток крови в условиях наблюдения ППР взяты образцы сыворотки крови четырёх обследуемых мужчин (возраст от 47 до 58 лет). У троих из них выявлены опухоли кишечника в терминальных стадиях, один из них обследован после курса химиолучевой терапии. В качестве контрольной использовалась сыворотка крови пациента, у которого при исследовании онкологическая патология была исключена (табл. 1).

Приготовление тонких плёнок из сыворотки крови. Для получения тонких плёнок из сыворотки крови в данной работе использовался метод центрифугирования [8, 9]. Подробно получение и оценка качества плёнок описаны в работе [10]. Образцы свежей сыворотки крови (~0,1 мл) наносились на центральную часть предварительно отмытых в перекисно-аммиачном травителе кремниевых пластин Si(111) КДБ-10 диаметром 76 мм при комнатной температуре. Скорость вращения составляла 2500 оборот./мин, время вращения 10 с.

Таблица 1

**Образцы сыворотки крови обследуемых,
использованные в предварительном эллипсометрическом исследовании ППР**

Номер образца	Диагноз
1	Первично-множественные опухоли: рак сигмовидной кишки T1N×M0 и прямой кишки T4N×M0
2	Опухоль прямой кишки T3-4N×M0
3	Опухоль прямой кишки T3-4N×M0 (после химиолучевого лечения)
4	Контроль (опухоли исключены)

Перед проведением эллипсометрических измерений плёнки в течение 2 ч сушились на воздухе при комнатной температуре.

Эллипсометрическое исследование плёнок из сыворотки крови. Эллипсометрические спектры $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ измерялись с помощью спектрального эллипсометрического комплекса «ЭЛЛИПС-1771» [11] в диапазоне длин волн $\lambda = 250\text{--}1100$ нм, спектральное разрешение прибора составляло 2 нм, время записи одного спектра не превышало 20 с, угол падения луча света на образец равен 70° . Использовалась четырёхзонная методика измерений с последующим усреднением по всем четырём зонам. Расчёт дисперсионных зависимостей показателя преломления $n(\lambda)$ и значений толщины плёнок проводился решением обратной задачи эллипсометрии с помощью оптической модели подложка—плёнка—среда. Оценивались следующие экспериментальные характеристики плёнок: условный показатель градации (ПГ), значения эффективной толщины d и дисперсия показателя преломления $n(\lambda)$ [10].

Эллипсометрическое исследование вблизи условий наблюдения поверхностного плазмонного резонанса. В работе применялись пластины из кварцевого стекла КУ-1 размером $45 \times 38 \times 2$ мм. На поверхность предварительно обезжиренных в кипящем толуоле пластин последовательно наносились слои металлов посредством вакуумного напыления: титан (10 нм) + золото (40 нм) (резонансный слой).

В исследованиях использовались моноклональные антитела СД24 (FITC Mouse IgG2a, Isotype Control, BD Biosciences). Методика иммобилизации антител на поверхности золота соответствовала описанной в работе [12]. Контроль иммобилизации осуществлялся с помощью метода инфракрасной фурье-спектроскопии.

Исследования реакций взаимодействия антигенов сыворотки крови с моноклональными антителами СД24, иммобилизованными на поверхности пластин, покрытых слоем золота, проводились с помощью установки, схема которой и методика измерений приведены в работах [11, 13].

Методика эксперимента включала следующие стадии.

1. Запись спектральных зависимостей $\Psi(\lambda)$, $\Delta(\lambda)$ образца, покрытого иммобилизованными антителами СД24, при этом кювета заполнялась фосфатно-хлоридным буфером. Определение положения ППР в спектре (λ_{\max}).

2. Запись кинетических зависимостей $\Psi(t)$, $\Delta(t)$ при λ_{\max} с последующим добавлением в систему образца сыворотки крови, который предварительно разбавлялся в объёмном соотношении 1 : 3 в фосфатно-хлоридном буфере.

3. Промывка системы в фосфатно-хлоридном буфере после прекращения процесса.

Оценка воспроизводимости результатов измерений. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы "SPSS Statistics", ver.10 (SPSS, США). До-

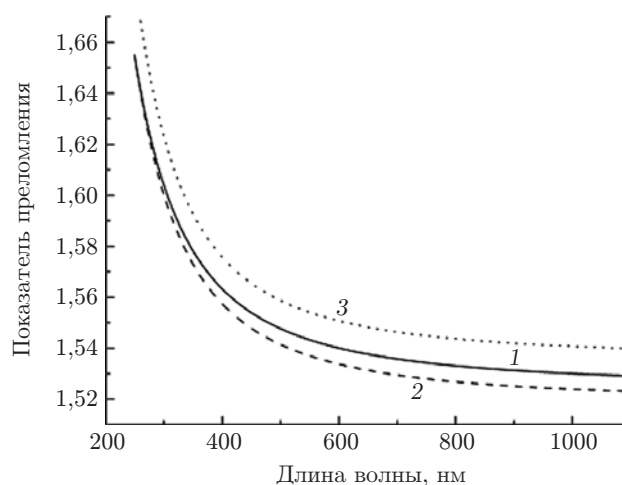


Рис. 1. Дисперсионные зависимости $n(\lambda)$; типичные образцы плёнок сыворотки крови группы сравнения F0 — кривая 1 и групп пациентов с ДПП: F1–F2 — кривая 2, F3–F4 — кривая 3

стоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента и Пирсона в случае, когда распределение подчинялось нормальному закону. При отклонении распределения от нормального использовали непараметрические критерии (U -критерий Манна — Уитни, Колмогорова — Смирнова).

Результаты исследования и обсуждение. *Эллипсометрическое исследование тонких плёнок из сыворотки крови.* Спектральные зависимости эллипсометрических параметров $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ для полученных биоорганических плёнок имели вид, характерный для тонких однородных прозрачных плёнок. В каждой из трёх групп обследуемых было отобрано по одному типичному образцу. Полученные значения $n(\lambda)$ для плёнок образцов сыворотки крови пациентов, типичные для всех трёх групп, показаны на рис. 1, а значения толщины слоёв и величины показателей преломления при $\lambda = 632,8$ нм даны в табл. 2.

В группе сравнения оказались плёнки наименьшей толщины, достоверно отличные от таковых в группах с ДПП (в нанометрах): $154,24 \pm 4,75$ против $167,20 \pm 2,87$, $p < 0,047$, причём плёнки оказались менее равномерными, чем у пациентов с ДПП, с обилием радиальных разрывов, преобладали градации 2–4 ($p < 0,05$) [10]. Значения показателя преломления в контрольной группе проявляли тенденцию к повышению по сравнению с таковыми в группе с ДПП ($1,550 \pm 0,0037$ против $1,546 \pm 0,002$, $p < 0,06$).

Таблица 2

Значения параметров дисперсионной модели для типичных образцов плёнок сыворотки крови в группах пациентов

Группа обследуемых	Эллипсометрия	
	Толщина, нм	Показатель преломления ($\lambda = 632,8$ нм)
1 (F0)	179,8	1,538
2 (F1–F2)	172,7	1,532
3 (F3–F4)	128,5	1,549

В результате у обследуемых пациентов с нормальными биохимическими показателями выявлены тонкие неравномерные плёнки с более высокими значениями показателя преломления.

Обследуемые группы с признаками ДПП кроме биохимических показателей, составляющих синдромы цитолиза и холестаза (высокие уровни АЛТ, АСТ, билирубина, ЩФ, ГГТП), имели и нарушенный липидный профиль в 78 % случаев. У этих пациентов плёнки отличались равномерностью и большей толщиной ($p < 0,05$). У пациентов с ДПП при отсутствии повышенных уровней липидного профиля или изменении их соотношения плёнки распределялись неравномерно, с большим количеством радиальных разрывов или даже фрагментарно. Что касается показателя преломления, то при тенденции к снижению в группах с ДПП при выделении подгруппы обследуемых с высоким уровнем АЛТ и ГГТП значение показателя преломления становилось максимальным: $1,594 \pm 0,0019$.

Таким образом, в группах с ДПП была высокая толщина плёнок, их равномерность определялась наличием или отсутствием нарушений у пациентов липидного обмена, а значение показателя преломления определялось уровнем ферментов цитолиза (АЛТ) и холестаза (ГГТП), степенью нарушения пуринового обмена (мочевая кислота).

При исследовании групп с различной степенью фиброза выявлено, что по мере его роста снижается толщина плёнки от $160,9 \pm 2,81$ нм в группе пациентов с лёгким фиброзом (F1–F2) до $138,05 \pm 3,74$ нм у пациентов с выраженным фиброзом (F3–F4), $p < 0,002$. Подобные изменения могут быть связаны со снижением синтеза целого ряда соединений в печени (в том числе белков сыворотки крови, факторов свёртывания, холестерина, триглицеридов и др.) при выраженном фиброзе, которые являются определяющими для толщины плёнки. Преобладание неравномерных плёнок градаций 3, 4 при выраженном фиброзе, очевидно, связано с биохимическим дисбалансом в сыворотке крови при циррозе печени. Величины коэффициента преломления не демонстрировали значимых различий при разных степенях фиброза ($1,541 \pm 0,0022$ в группе F1–F2 и $1,543 \pm 0,0018$ в группе F3–F4, $p > 0,1$). Это неудивительно, поскольку коэффициент преломления определяется в большей степени компонентами синдромов цитолиза и холестаза, которые могут быть выражены при различных степенях фиброза.

Анализ зависимости экспериментальных характеристик плёнок (ПГ, d , $n(\lambda)$) от биохимических параметров для всех обследованных (60 человек) показал, что эффективная толщина плёнки d прямо и с высокой степенью достоверности коррелировала с уровнями общего холестерина ($r = 0,425$, $p < 0,0001$), триглицеридов ($r = 0,353$, $p < 0,001$), АСТ ($r = 0,205$, $p < 0,05$), общего белка ($r = 0,406$, $p < 0,0001$), мочевой кислоты ($r = 0,319$, $p < 0,034$), уровнем кальция сыворотки ($r = 0,761$, $p < 0,047$), а также возрастом обследуемых ($r = 0,481$, $p < 0,033$). Последнее обстоятельство очевидно, поскольку с возрастом чаще встречаются нарушения липидного, пуринового обмена, диффузные заболевания печени, которые могут приводить к подобным биохимическим сдвигам. Выявлена обратная корреляция эффективной толщины плёнок с уровнем железа сыворотки крови ($r = -0,616$, $p < 0,051$). Анализ связей данного параметра в группах пациентов с ДПП показал сохранение корреляций с уровнями общего холестерина, триглицеридов, общего белка, кальция сыворотки. Но вместе с тем появились тенденции к зависимости толщины от уровня С-реактивного белка ($r = 0,931$, $p < 0,069$), отражающего степень выраженности воспаления, и щелочной фосфатазы ($r = 0,308$, $p < 0,082$), связанной со степенью холестаза.

Показатель градации, определяющий качество нанесения плёнки, также зависел от липидных параметров: уровней общего холестерина ($r = -0,318$, $p < 0,003$), триглицеридов ($r = -0,209$, $p < 0,053$), т. е. чем выше были уровни общего холестерина и триглицеридов, тем более гладкой, равномерной, без видимых радиальных разрывов оказывалась плёнка. Однако на равномерность плёнки влияли также и уровни глюкозы ($r = -0,263$, $p < 0,018$),

мочевой кислоты ($r = -0,129$, $p < 0,032$). Отмечена тенденция к влиянию величин прямого билирубина на данный показатель ($r = -0,329$, $p < 0,062$). У пациентов с ДПП эта величина достигала уровня достоверности ($r = -0,374$, $p < 0,05$). Кроме того, при ДПП выявлена зависимость равномерности плёнки от уровня мочевины ($r = -0,281$, $p < 0,054$). Таким образом, в этих группах отмечена связь данного параметра с элементами синдрома цитолиза, проявлениями нарушения функции почек.

Показатель преломления плёнки n прямо коррелировал с АЛТ ($r = 0,355$, $p < 0,003$) и обратно — с уровнями общего белка ($r = -0,217$, $p < 0,052$), С-реактивного белка ($r = -0,872$, $p < 0,054$) и мочевины ($r = -0,248$, $p < 0,037$). Здесь прослеживается зависимость макроскопической оптической характеристики плёнки от биохимических показателей, определяющих синдромы цитолиза и холестаза, степень воспаления, а также белок-синтетическую и детоксикационную функции печени. Отсюда можно предположить, что значение эффективного показателя преломления будет наиболее заметно изменяться при наличии диффузной патологии печени. Действительно, у пациентов с ДПП нарастала сила связи показателя с уровнем АЛТ ($r = 0,395$, $p < 0,006$), появилась корреляция с уровнями ГГТП ($r = 0,349$, $p < 0,05$), мочевой кислоты ($r = 0,296$, $p < 0,058$).

Эллипсометрическое исследование вблизи условий наблюдения поверхностного плазмонного резонанса. На рис. 2 показаны кинетические кривые изменений эллипсометрического угла Δ во времени в процессах образования поверхностного комплекса антиген—антитело и его распада при взаимодействии антигенов сыворотки крови с иммобилизованными на поверхности моноклональными антителами СД24. Образование поверхностных комплексов в процессе взаимодействия антиген—антитело в сыворотках больных раком приводит к большому изменению эллипсометрического угла Δ : $\delta\Delta \sim 5$ угл. град, что соответствует приблизительно 10000 RU (единиц, введённых фирмой "BIACORE", Швеция; 1 RU равен сдвигу плазмона на $0,1^\circ$ в координатах поглощения света и угла падения луча света).

Как видно из данных рис. 2, кривая 4, соответствующая сыворотке здорового обследуемого, показывает намного более низкое значение изменения эллипсометрического угла: $\delta\Delta \sim 0,5^\circ$. Это изменение почти в 10 раз меньше отклонения угла Δ для сыворотки крови пациентов с опухолями кишечника в терминальных стадиях (кривые 1, 2) и почти в

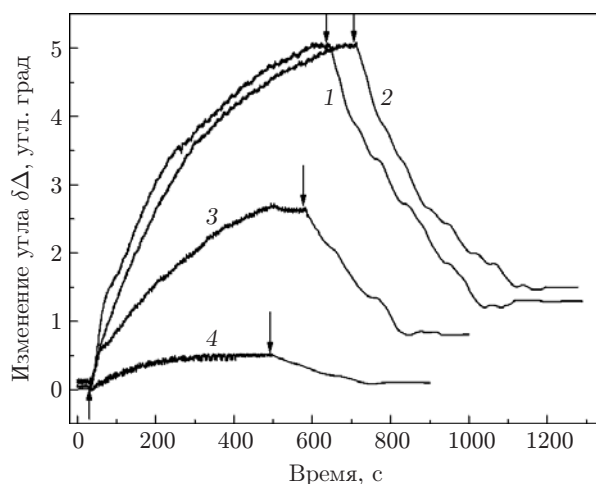


Рис. 2. Кинетические кривые изменения эллипсометрического угла $\delta\Delta(t)$ в процессах образования поверхностного комплекса антиген—антитело (СД24) и его распада. Стрелками на рисунке показаны моменты подачи сыворотки крови в систему и промывки системы. Кривые соответствуют образцам сывороток, приведённым в табл. 1

5 раз меньше для больного с опухолью прямой кишки, прошедшего курс химиотерапии (кривая 3).

Начало отмывки образцов приводило лишь к частичному быстрому разрушению комплексов у пациентов с опухолями кишечника. Окончательное разрушение комплексов и релаксация значения эллипсометрического угла Δ (а значит, и спектрального положения плазмона) до первоначального происходила лишь в процессе длительной отмывки образца в восстановительном буфере.

Полученные данные свидетельствуют о наличии стойкого специфического взаимодействия между антигенами сывороток крови пациентов и моноклональными антителами СД24, что приводит к выраженному изменению положения ППР. Подобное взаимодействие отсутствует для образца сыворотки крови здорового обследуемого, что и сказывается на характере кинетической кривой (4). Следует отметить, что эллипсометрические показатели реагируют на уровень имеющихся в сыворотке крови антигенов, поскольку отклонения угла Δ у первичных пациентов и прошедшего терапию отличаются примерно в 2 раза. Эти наблюдения позволяют рассчитывать на возможность получения дискриминирующих показателей эллипсометрии для разных стадий опухолевого процесса, в том числе ранних, при дальнейших исследованиях.

Заключение. В представленной работе показано, что эллипсометрия является чувствительным, удобным, экономичным, неразрушающим методом исследования биоорганических сред. Метод может быть использован как экспресс-метод скрининга, предварительной диагностики стадий ряда заболеваний внутренних органов. Полученные эллипсометрические данные о наличии особенностей формирования биоорганических покрытий из сыворотки крови (толщина плёнки, показатель преломления) у пациентов с диффузной патологией печени подтверждены выявленными изменениями биохимических показателей.

Эллипсометрия вблизи наблюдения поверхностного плазмонного резонанса может быть использована в скрининговых исследованиях как высокочувствительный метод обнаружения специфического взаимодействия по типу антиген—антитело, при создании биочипов, необходимых для ранней диагностики онкологических процессов различных локализаций, иммунологических сдвигов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлов Ч. П., Золотаревский В. Б., Шульпекова Ю. О. и др. Современные методы ранней диагностики фиброза печени // Клиническая медицина. 2005. **83**, № 12. С. 58–60.
2. Тучин В. В. Оптическая биомедицинская диагностика. М: Физматлит, 2007. 560 с.
3. **Современные** проблемы эллипсометрии /Под ред. А. В. Ржанова. Новосибирск: Наука, 1980. 420 с.
4. Arwin H. Spectroscopic ellipsometry and biology: recent developments and challenges // Thin Solid Films. 1998. **313–314**, N 1–2. P. 764–774.
5. Howland M. C., Szmody A. W., Santii B., Parikh A. N. Characterization of physical properties of supported phospholipids membranes using imaging ellipsometry at optical wavelength // Biophys. Journ. 2007. **92**, N 4. P. 1306–1317.
6. Arwin H. Ellipsometry on thin organic layers of biological interest: characterization and applications // Thin Solid Films. 2000. **377–378**. P. 48–56.
7. **Болезни** печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей /Под ред. В. Т. Ивашкина. М.: «Изд. дом "М-Вести"», 2002. 416 с.
8. Dimitriev B. Y., Ivanova Y., Iordanova R. History of sol-gel science and technology (review) // Journ. Univer. Chem. Technol. and Metallurgy. 2008. **43**, N 2. P. 181–192.

9. **Vorotilov K., Petrovsky V., Vasiljev V.** Spin coating process of sol-gel silicate films deposition: effect of spin speed and processing temperature // Journ. Sol-Gel Sci. and Technol. 1995. **5**, N 3. P. 173–183.
10. **Воевода М. И., Пельтек С. Е., Кручинина М. В. и др.** Исследование тонких плёнок, полученных центрифугированием сыворотки крови человека, методами спектральной эллипсометрии и ИК-спектроскопии // Автометрия. 2010. **46**, № 4. С. 106–120.
11. **Рыхлицкий С. В., Спесивцев Е. В., Швец В. А., Прокопьев В. Ю.** Спектральный эллипсометрический комплекс «ЭЛЛИПС-1771» // Приборы и техника эксперимента. 2007. № 2. С. 160–161.
12. **Ohtsuka K., Kuroki M., Nojima T. et al.** Interaction analysis of the carcinoembryonic antigen (CEA) with its monoclonal antibody immobilized on a gold surface using fourier transform infrared reflection-absorption spectroscopy (FT-IR RAS) // Analit. Sci. 2005. **21**, N 3. P. 215–218.
13. **Рыхлицкий С. В., Кручинин В. Н., Швец В. А., Спесивцев Е. В.** In-situ эллипсометрический П.П.Р.-комплекс для экспресс-анализа биоорганических сред // Приборы и техника эксперимента. 2010. № 2. С. 1–2.

Поступила в редакцию 15 июля 2011 г.
