

Анализ поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния плазмы крови пациентов с заболеваниями эндометрия

Д.Н. Артемьев
Самарский национальный
исследовательский университет им.
академика С.П. Королева
Самара, Россия
artemyevdn@ssau.ru

Л.А. Братченко
Самарский национальный
исследовательский университет им.
академика С.П. Королева
Самара, Россия
shamina94@inbox.ru

В.В. Евстифорова
Самарский национальный
исследовательский университет им.
академика С.П. Королева
Самара, Россия
evst5377@gmail.com

В.И. Кукушкин
Институт физики твердого тела
имени Ю.А. Осипьяна РАН
Черноголовка, Россия
kukushvi@mail.ru

Д.В. Лысцев
Первый Московский
государственный медицинский
университет имени И. М. Сеченова
Москва, Россия
doc.lyscev@gmail.com

Т.А. Федорова
Национальный медицинский
исследовательский центр
акушерства, гинекологии и
перинатологии
имени академика В.И. Кулакова
Москва, Россия
tfedorova1@mail.ru

В.М. Зуев
Первый Московский
государственный медицинский
университет имени И. М. Сеченова
Москва, Россия
vlzuev@bk.ru

Аннотация — В настоящее время рак эндометрия является наиболее распространенным раком половых органов в развитых странах. Некоторые типы гиперплазии эндометрия могут прогрессировать до этого злокачественного новообразования. Для диагностики в режиме реального времени существует необходимость в создании методов объективной оценки, позволяющих диагностировать патологические изменения. Исследование посвящено анализу поверхностно усиленному рамановскому (комбинационному) рассеянию плазмы крови с последующим многомерным анализом (PLS-DA) спектральных данных для диагностики рака эндометрия, гиперплазии и контрольной группы. В результате точность разделения аденокарциномы для проверочного набора данных составила 85% (специфичность 92%, чувствительность 66%).

Ключевые слова— рамановская спектроскопия, комбинационное рассеяние, *SERS*, *PLS-DA*, эндометрий, гиперплазия, полип, аденокарцинома

1. ВВЕДЕНИЕ

Современная медицина диктует свои правила и предъявляет высокие требования к диагностике заболеваний и к правильности постановки диагноза. В настоящий момент в диагностике патологий эндометрия есть нерешенные проблемы, такие как недостаточная чувствительность и специфичность исследований, инвазивность процедур и высокая стоимость проводимых диагностических манипуляций. В структуре гинекологических заболеваний лидирующие места занимают патологии эндо- и миометрия [1]. По данным научной литературы самой распространенной патологией эндометрия является полип эндометрия – 21,7-27,3 % случаев. Гиперплазия эндометрия без атипии встречается с частотой от 4% до 10% случаев и относится к часто рецидивирующим заболеваниям [2]. В 3,7-11,6 % выявляется сочетанная патология - полип и гиперплазии эндометрия. Малигнизация железистой гиперплазии и полипа эндометрия встречается в 2–5% и достигает 10% в постменопаузе. Атипичная

гиперплазия прогрессирует в инвазивный рак в 25–50% случаев [3].

Для дифференциальной диагностики патологий эндометрия золотым стандартом до сих пор является гистологический метод исследования биопсийного материала. Однако правильность гистологического заключения во многом зависит от человеческого фактора: полноценность забора тканей эндометрия, субъективность при оценке гистологических препаратов, уровень квалификации специалистов. На практике, даже у специалистов экспертного уровня процент расхождения заключений гистологических результатов крайне велик, а выполнение высокочувствительного иммуногистохимического исследования в большинстве случаев недоступно. Также стоит отметить, что получение материала для гистологического исследования сопряжено с рисками, такими как повреждение базального слоя эндометрия, послеоперационные и анестезиологические осложнения.

На основании приведенных данных был сделан вывод о том, что необходимо разработать малоинвазивные, высокочувствительные и недорогие варианты исследований, которые можно использовать в качестве новых диагностических методов. В данной работе было проведено междисциплинарное исследование. В качестве метода была выбрана спектроскопия рамановского рассеяния (комбинационного рассеяния) для дифференциальной диагностики патологий эндометрия. Методы рамановской спектроскопии позволяют характеризовать биохимические изменения у исследуемых образцов. В работе был проведен анализ рамановского рассеяния плазмы крови тестируемых образцов. Для многомерного анализа большого массива спектральных данных использовали метод проекций на латентные структуры и дискриминантный анализ.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрацию спектральных характеристик анализируемой коллоидной среды проводили на экспериментальном стенде, состоящем из спектрометрической системы (RamanLife RL785, ООО «ФОТОН-БИО», Черноголовка, Россия) на основе ПЗС-детектора и микроскопа (ADF U300, ADF, Китай). Спектры возбуждались в ближнем ИК диапазоне с помощью лазерного модуля с центральной длиной волны 785 нм. Объектив LMP1ap с увеличением 50х использовался для фокусировки излучения на образце и сбора рассеянного излучения. Диаметр лазерного пятна в фокусе составлял менее 5 мкм. Спектры регистрировали в спектральном диапазоне 380-1800 см⁻¹ со спектральным разрешением 4-9 см⁻¹. Мощность лазера составляла 20 мВт для метода поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии. Время экспозиции составило 2 секунды с 10-кратным усреднением. Стандартное отклонение относительной интенсивности полос рамановского рассеяния для образцов не превышала 10%. Регистрация спектров осуществляется с помощью программы EnSpectr.

В качестве материала субстрата для достижения поверхностного усиления рамановского сигнала плазмы использован серебряный субстрат на основе высушенного коллоида серебра. Для формирования сложных и крупных структур, полученный коллоидный раствор объемом 20 мл выливали на алюминиевую фольгу площадью и сушили при комнатной температуре до полного высыхания. В результате высыхания на фольге формируются агломераты серебряных частиц с кристаллами нитрата натрия объемной концентрации 0,02%. Кристаллы нитрата натрия обеспечивают возникновение капиллярного эффекта. Полученный субстрат представляет собой агломераты сферических частиц размером около 200 нм.

Полученные данные, будучи по своей сути многомерными, анализировали с использованием метода дискриминантного анализа посредством проекции на латентные структуры (PLS-DA). Суть метода состояла в том, что дискриминационные правила для классов были заданы линейными регрессионными уравнениями. Каждому образцу плазмы соответствует априорная информация о принадлежности к определенной группе. Таким образом, данные были проанализированы посредством обучения с учителем. Во избежание переобучения, оценка устойчивости метода анализа экспериментальных данных и выбор оптимальных параметров были реализованы на основе k-кратной кросс-валидации (k = 7). На основе регистрируемых волновых характеристик интенсивности рамановских спектров составляли матрицу, где каждому образцу присваивали значение 1, 2 или 3, в зависимости от принадлежности классу контроля (1), гиперплазии и полипа (2) или аденокарциномы (3).

Для SERS-анализа плазмы крови были сформированы следующие группы: контроль (25 образцов), полип (31 образец), гиперплазия (10) и аденокарцинома (29 образцов). Для каждого образца регистрировалось 3 спектра рамановского рассеяния.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки полученных данных было использовано две компоненты для разделения классов. В результате с помощью метода PLS-DA, точность разделения рамановских спектров аденокарциномы (3) относительно контрольной группы (1) и группы полипа и гиперплазии (2) для калибровочного составила 87% (специфичность 94%, чувствительность 69%), для проверочного набора составила 85% (специфичность 92%, чувствительность 66%), а для тестовой выборки 78% (специфичность 81%, чувствительность 72%). При этом если исключить контрольную группу и оставить только классы заболеваний, то значения вероятности обнаружения аденокарциномы становятся более 91% (калибровочный набор 93%, проверочный 91%, тестовый 98%). При этом после построения модели анализа данных PLS-DA был проведен анализ важности переменных, то есть, какая именно полоса имеет наибольший вес для разделения классов. Таким образом, были определены основные полосы 723 (C-S в белке, CH₂, аденин), 740 (сжатие пиримидинового кольца), 1020 (фенилаланин), 1053 (C-C растяжение в липидах), 1210 (амид III), 1343 (CH₃, CH₂ скручивание в коллагене), 1392 см⁻¹ (C-H раскачивание), которые ответственны за выделение группы аденокарциномы [4, 5]. Стоит отметить, что это предварительные исследования, которые показывают возможность обнаружения заболеваний и потенциал метода для диагностики конкретных типов заболеваний тканей эндометрия при исследовании биожидкости (плазмы) этого пациента.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке министерства науки и высшего образования Российской Федерации в форме гранта на проведение фундаментальных и прикладных научных исследований по приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники Российской Федерации, для материальной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук и докторов наук (гранты Президента Российской Федерации), соглашение № 075-15-2022-767 от 12 мая 2022 г. (МК-5445.2022.1.2).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Сулима, А. Н. Гистероскопическая и морфологическая оценка внутриматочной патологии в разные возрастные периоды / А. Н. Сулима, И. О. Колесникова, А. А. Давыдова, М. А. Кривенцов // Журнал акушерства и женских болезней. – 2020. – Т. 69, № 2. – С. 51-58.
- [2] Савельева Г.М. Гинекология / Г.М. Савельева, Г.Т. Сухих, В.Н. Серов, В.Е. Радзинский, И.Б. Манухин - Москва: Издательство ГЭОТАР-Медиа, 2020. - 1008 с.
- [3] Казачкова, Э.А. Клинико-анамнестические особенности и структура женщин с гиперплазией слизистой оболочки матки в различные возрастные периоды / Э.А. Казачкова, А.В. Затворницкая, Е.Е. Ворopaева, Е.Е. Казачков, А.А. Рогозина // Уральский медицинский журнал – 2017. – Т. 150, № 6. – С. 18-22.
- [4] Movasaghi, Z. Raman Spectroscopy of Biological Tissues / Z. Movasaghi, S. Rehman, I. Rehman // Applied Spectroscopy Reviews – 2007. – Vol. 42(5). – P. 493-541.
- [5] Paraskevaidi, M., Raman spectroscopic techniques to detect ovarian cancer biomarkers in blood plasma / M. Paraskevaidi, K. M. Ashton, H. F. Stringfellow, N. J. Wood, P. J. Keating, A. W. Rowbottom, P. L. Martin-Hirsch, F. L. Martin // Talanta – 2018. – Vol. 189. – P. 281-288.