

Исследование гигантского комбинационного рассеяния перитонеальной жидкости пациентов с наружным генитальным эндометриозом

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

Фидан Т. Алиева
Первый Московский
государственный медицинский
университет имени И. М. Сеченова
Москва, Россия
fidan.alieva.95@mail.ru

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

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

Фарах Т. Алиева
Первый Московский
государственный медицинский
университет имени И. М. Сеченова
Москва, Россия
fereh.alieva.95@mail.ru

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

Д.В. Брюнин
Первый Московский
государственный медицинский
университет имени И. М. Сеченова
Москва, Россия
bryun777@mail.ru

Аннотация — Эндометриоз — это состояние, при котором эндометрий разрастается за пределы полости матки. Одним из его серьезных последствий является субфертильность. Точная причина эндометриоза до сих пор неизвестна и находится в стадии исследования. Отслеживание симптомов недостаточно для диагностики заболевания. Успешный диагноз может быть поставлен только с помощью лапароскопии. В процессе течения заболевания изменяется метаболизм тканей эндометрия, что приводит к изменению химического состава в биожидкостях организма. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света предоставляет врачу информацию о химической структуре веществ в составе исследуемой пробы биожидкости (без использования красителей или других меток). В этой работе КР-спектроскопию использовали в качестве экспрессного метода для диагностики эндометриоза. Для этого производилось сравнение КР-спектров для 25 образцов перитонеальной жидкости, полученных от 19 пациентов с эндометриозом и 6 образцов контрольной группы. В анализе использовался метод проекций на латентные структуры и дискриминантный анализ (PLS-DA).

Ключевые слова — комбинационное рассеяния света, ГКР, PLS-DA, эндометриоз

1. ВВЕДЕНИЕ

Эндометриоз определяется как разрастание эндометриальной железы и стромы за пределами эндометриальной полости, что обусловлено истечением в брюшную полость. Предыдущие отчеты показали, что каждая десятая женщина во всем мире обращалась за медицинской помощью в связи с эндометриозом и симптомами, связанными с эндометриозом, включая тазовую боль (38,7%), диспареунию (29,5%) и бесплодие (11,6%) [2]. Учитывая, что диагноз эндометриоза зависит от гистопатологического исследования после хирургического удаления, этот подход требует анестезии и госпитализации. Следовательно, это существенно влияет на качество жизни пациентов. Таким образом, внимание исследователей сосредоточено на новых неинвазивных методах диагностики эндометриоза,

включая трансвагинальное УЗИ, анализ биомаркеров крови и генетической предрасположенности.

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 - была использована спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света для дифференциальной диагностики патологий эндометрия. Метод КР-спектроскопии позволяет характеризовать биохимические изменения, происходящие в анализируемых биожидкостях, что делает этот метод важной основой для данного исследования. В работе был проведен анализ спектров комбинационного рассеяния света перитонеальной жидкости пациентов с эндометриозом и контрольной группы. Был проведен многомерный анализ большого массива спектральных данных с использованием метода проекций на латентные структуры и дискриминантного анализа (PLS-DA). PLS-DA — это хемометрический метод, широко используемый для оптимизации разделения между различными группами образцов [1].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрацию спектральных характеристик анализируемых образцов проводили на экспериментальном стенде, состоящим из спектрометрической системы (RamanLife RL785, ООО «ФОТОН-БИО», Россия) на основе ПЗС-детектора и оптического микроскопа ADF U300 (ADF, Китай). Спектры возбуждались в ближнем ИК-диапазоне с помощью лазерного модуля с центральной длиной волны 785 нм. Объектив LMPlan с увеличением 50х использовался для фокусировки излучения на образце и сбора рассеянного излучения. Диаметр лазерного пятна в фокусе составлял 4 мкм. Спектры регистрировали в спектральном диапазоне 380-1800 см⁻¹ со спектральным разрешением 6-8 см⁻¹. При регистрации спектров

гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) мощность лазерного излучения составляла 20 мВт. Время экспозиции составило 2 секунды с 10-кратным усреднением. Регистрация спектров осуществляется с помощью программы EnSpectr. При измерениях ГКР-спектров характерно существенное изменение интенсивности спектральных полос в зависимости от точки измерения, для снижения этого эффекта проводилась нормировка. В результате стандартное отклонение не превышало 10% с использованием одного субстрата.

В качестве подложки для возбуждения поверхностного усиления сигнала комбинационного рассеяния перитонеальной жидкости использовался субстрат на основе высушенного коллоидного раствора наночастиц серебра, нанесенный на поверхность предметного стекла площадью 75 мм x 25, покрытого алюминиевой фольгой. Коллоидный раствор наночастиц серебра получали путем восстановления из водного раствора нитрата серебра цитратом натрия при температуре 95°C в течение 20 минут. Спектр поглощения полученного коллоидного раствора серебра имеет максимум поглощения при 410 нм с полушириной 40 нм. В результате высыхания на фольге формируются агрегаты серебряных частиц с кристаллами нитрата натрия объемной концентрации 0,02%. Кристаллы нитрата натрия обеспечивают возникновение капиллярного эффекта. Полученный субстрат представляет собой агрегаты сферических частиц размером около 200 нм.

Полученные спектральные данные, будучи по своей сути многомерными и многопараметрическими, 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 перитонеальной жидкости соответствует априорная информация о принадлежности к определенной группе. Таким образом, спектральные 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 = 10). На основе регистрируемых волновых

характеристик интенсивности КР-спектров составляли матрицу, где каждому образцу присваивали значение 0 или 1, в зависимости от принадлежности классу контроля (0) или эндометриозу (1).

Для SERS-анализа перитонеальной жидкости были сформированы следующие группы: контроль (6 образцов), эндометриоз (19 образцов). Для каждого образца регистрировалось 3 спектра комбинационного рассеяния.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки полученных данных было использовано три компонента для разделения классов. В результате с помощью метода PLS-DA, точность разделения КР-спектров эндометриоза и контрольной группы для калибровочного набора данных составила 97% (специфичность 100%, чувствительность 94%), а для проверочного набора данных - 85% (специфичность 86%, чувствительность 83%). После построения модели анализа данных PLS-DA был проведен анализ важности переменных, то есть, было показано - какая именно спектральная полоса имеет наибольший вес для разделения классов. Таким образом, были определены основные КР-пики: 635, 721, 1052, 1218, 1372, 1442 и 1573 см⁻¹, которые ответственны за выделение группы эндометриоза. Известно, что в выделенные полосы вносят вклад лейкоциты и белки [3], оценка которых позволяет сделать вывод о наличии характерных изменений компонентного состава перитонеальной жидкости при эндометриозе.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Worley, B. Multivariate Analysis in Metabolomics / B. Worley, R. Powers // *Curr. Metabolomics*. – 2013. – Vol. 1. – P. 92–107.
- [2] Fuldeore, M. J. Prevalence and symptomatic burden of diagnosed endometriosis in the united states: national estimates from a cross-sectional survey of 59,411 women / M.J. Fuldeore, A.M. Soliman // *Gynecologic and obstetric investigation*. – 2017. – Vol. 82. – P. 453–461.
- [3] Bratchenko, L. A. Conventional Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy of ascitic fluid / L.A. Bratchenko, I.A. Bratchenko, D.N. Artemyev, A.A. Moryatov, J.V. Starikova, E.N. Tupikova, I.A. Platonov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2019. – Vol. 1368. – P. 022032