

Исследование методов спонтанной и резонансной Рамановской спектроскопии плазмы крови для экспресс-диагностики преэклампсии

Д.Н. Артемьев¹, В.И. Кукушкин², Р.Х. Шаваева³, А.В. Мурашко³, О.В. Шарапова³,
В.Ф. Зуев³, С.А. Тимофеев³

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34А, Самара, Россия, 443086

²Институт физики твердого тела РАН, Академика Осипьяна 2, Черноголовка, Россия, 142432

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Трубецкая 8, стр. 2, Москва, Россия, 119991

Аннотация. В данной работе была исследована эффективность использования спонтанной и резонансной рамановской спектроскопии плазмы крови пациентов для экспресс-диагностики преэклампсии. В качестве резонансной длины волны было выбрано лазерное излучение с длиной волны 532 нм, что характерно для возбуждения каротиноидов. Было обнаружено, что вклад некоторых типов каротиноидов (β -каротин, астаксантин, миксоксантофилл, ликопен, деиноксантин, спириллоксантин, неоксантин, фукоксантин) значительно изменяется в ходе развития заболевания, и было отмечено, что общая концентрация всех типов каротиноидов в плазме крови в норме обычно значительно выше, чем при преэклампсии.

1. Введение

Преэклампсия (ПЭ) является важной проблемой современного акушерства в связи с тем, что занимает одно из ведущих мест в структуре материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [1, 2]. Во время беременности происходит изменение не только гормонального фона, но и изменение обмена веществ. Продукция активной формы кислорода (супероксид) увеличивается, что изменяет функцию плаценты. Кроме того, избыток свободных радикалов кислорода может приводить к пероксидному стрессу, запускающему процессы повреждения различных органов, в том числе эндотелии сосудов, что в свою очередь может приводить во время беременности к «эндотелиозу» и различным патологическим состояниям, например, к преэклампсии. Важную роль в формировании концентрационного баланса свободнорадикальных соединений играют каротиноиды, которые вместе с другими антиоксидантами защищают организм от обширного окислительного стресса и его осложнений. Уровень каротиноидов в плазме крови зависит от рациона человека, но около 95% каротиноидов в плазме представлены только шестью соединениями: β -каротин, α -каротин, ликопин, β -криптоксантин, лютеин и зеаксантин.

На сегодняшний день не существует простых методов быстрого и точного определения концентраций каротиноидов в плазме крови. Одним из перспективных методов для решения

этой задачи и зарекомендовавшим себя в качестве способа для химического анализа молекулярных структур является метод Рамановской спектроскопии. Этот тип оптической спектроскопии основан на взаимодействии лазерного излучения с веществом и детектировании оптического отклика от вещества в виде Рамановского рассеяния света с помощью матричных фотодетекторов. При взаимодействии лазерного излучения и вещества в спектре рассеянного света появляются спектральные компоненты, сдвинутые относительно частоты зондирующего лазерного излучения на частоты внутримолекулярных колебаний вещества. Эти частотные сдвиги проявляются в спектре и однозначно определяют химическую структуру вещества. Методы Рамановской спектроскопии активно применяются в различных областях биологии и медицины, в промышленности, геммологии и геологии, народном хозяйстве [3-5].

Цель – изучение эффективности использования резонансной и спонтанной Рамановской спектроскопии плазмы крови пациенток в качестве экспресс-диагностики преэклампсии.

2. Материалы и методы

В исследование вошли более 50 образцов плазм крови беременных женщин. В ходе исследования пациенты были разделены на три примерно равные по численности группы: 1 группа – пациенты с умеренной формой ПЭ, 2 группа – пациенты с тяжелой формой ПЭ, 3 группа – группа нормы (женщины с нормальным физиологическим течением беременности). Пациентки 3-х групп не имели достоверных различий в перенесенных соматических и гинекологических заболеваниях.

У всех пациенток из катетеризированной центральной вены забирали в пробирку 4-5 мл крови. Для получения плазмы забранную кровь центрифугировали со скоростью 20 тысяч об/мин в течение 10 минут. Полученную плазму крови убирали на хранение в морозильную камеру при температуре -70°C . После набора необходимого количества проб все пробирки размораживались и производились измерения на Раман-люминесцентном спектрометре «ФОТОН-БИО 532 Л» (производитель ООО «ФОТОН-БИО», Россия) с длиной волны возбуждающего лазерного излучения 532 нм и выходной мощностью 25 мВт (предварительно проводились исследования спонтанного Рамановского рассеяния при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 785 нм). Спектральный диапазон данного оптического спектрометра составлял $160-4000\text{ см}^{-1}$, а спектральное разрешение в коротковолновой спектральной области составляло 4 см^{-1} . Для каждого измерения использовалось время экспозиции 200 мс и производилось усреднение по 25 измерениям для каждой исследуемой пробы плазмы крови.

С целью получения высокой чувствительности в определении каротиноидов по сигналу Рамановского рассеяния света были произведены сравнительные измерения оптических откликов плазм крови при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 532 нм и 785 нм и выбрана оптимальная резонансная длина волны зондирующего лазерного излучения 532 нм, которая совпадает со спектральной областью поглощения основных видов каротиноидов, представленных в плазме крови (альфа-каротин, бета-каротин, лютеин, зеаксантин, ликопин и др.) [6]. Таким образом, в спектре Рамановского рассеяния плазмы крови пациенток с ПЭ регистрируется интегральный сигнал всех каротиноидов, который отражает активность антиоксидантной защиты организма.

Регистрируемые многомерные данные (сдвиг компонент Рамановского рассеяния света относительно зондирующего лазерного излучения, интенсивность люминесценции и Рамановского рассеяния) анализировали с использованием метода дискриминантного анализа с помощью проекции на латентные структуры (PLS-DA). Из интенсивностей Раман-люминесцентных спектров в определенных спектральных полосах, составляли матрицу, где каждому образцу присваивали значение 0 или 1, в зависимости от принадлежности классу (здоровая плазма - 1 против плазмы с преэклампсией - 0 или тяжелая форма преэклампсии - 1 против умеренной - 0). Так как во время регистрации спектральных данных внешние условия (объем исследуемого образца, постоянство оптической схемы) были одинаковыми, то нормировка данных не производилась. Перед применением метода PLS-DA Рамановские спектры были отделены от люминесцентного вклада методом Савицкого-Голея с первой

производной [7] и коррекции опорной линии с использованием ассиметричных наименьших квадратов (Baseline ALS) [8]. Перед построением также проводилось центрирование данных.

3. Результаты и обсуждение

На первом этапе исследовались спектральные особенности плазмы крови пациентов с различной формой преэклампсии относительно здоровой группы. На Рис. 1 показаны исходные спектральные данные здоровой группы и группы с преэклампсией. Были обнаружены следующие характерные Рамановские пики каротиноидов: 873, 952, 1003, 1152, 1279, 1443, 1496, 1513, 1533, 2155, 2300, 2512, 2655, 2919 см^{-1} . На Рис. 2 показаны обработанные спектральные данные после применения алгоритма вычитания люминесцентного фона методом Савицкого-Голея. Для более ресурсоемкого метода Baseline ALS получились спектры, у которых позиции основных пиков практически не изменялись.

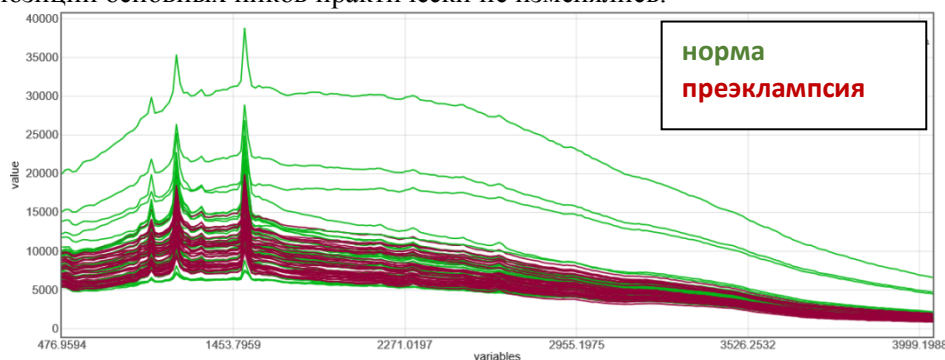


Рисунок 1. Исходные (необработанные) Раман-люминесцентные спектры плазмы крови группы здоровых женщин (зеленые спектры) в сравнении со спектрами плазмы крови пациенток с преэклампсией (красные спектры).



Рисунок 2. Спектральные данные плазмы крови женщин из здоровой группы (зеленый цвет) и группы с преэклампсией (красный цвет) после применения алгоритма вычитания люминесцентного фона.

Затем для предобработанных данных строились модели PLS-DA для разделения класса «нормы» и «преэклампсии». При построении модели PLS-DA осуществлялась проверка поведения построенной модели на «независимых» данных с использованием кросс-валидации. В результате для обоих методов вычитания люминесцентного фона модели на проверочном наборе данных показали одинаковые значения.

Для того чтобы модель для разделения классов PLS-DA была устойчива в данном случае возможно использование только двух векторов нагрузок. В результате использования модели PLS-DA на калибровочном наборе данных для разделения классов «нормы» и «преэклампсии» достигается точность разделения данных классов 96%.

Аналогичный подход был выполнен для разделения двух форм заболевания «умеренная преэклампсия» и «тяжелая преэклампсия». В этом случае точность разделения составила 72%.

На Рис. 3 показаны VIP спектры, показывающие наиболее значимые переменные исходного спектра (Рамановские пики), за счет изменения которых производилось отделение одного

класса от другого. Можно отметить, что достаточно сильно поменялось соотношение линий 1155 см^{-1} и 1513 см^{-1} в VIP спектрах и вклад по интенсивности от линии каротиноидов 1513 см^{-1} повысился при разделении двух форм заболеваний по сравнению с разделением классов «нормы» и «преэклампсии». При этом для полосы $1490\text{--}1535\text{ см}^{-1}$ происходит разделение исходного пика на три пика 1496 , 1513 и 1533 см^{-1} . Это может быть вызвано тем, что меняется вклад отдельных типов каротиноидов при разделении классов. Так, например, пик 1496 см^{-1} возникает из-за наличия колебания связи $\text{C}=\text{C}$ в бактериоруберине и β -каротине [9]. Основной вклад в изменение интенсивности пика 1513 см^{-1} вносят колебания связей в β -каротине, астаксантине, миксоксантофилле, ликопине, деиноксантине и спириллоксантине, а за возникновение пика 1533 см^{-1} отвечают такие каротиноиды, как неоксантин, фукоксантин, диадиноксантин и т.д.

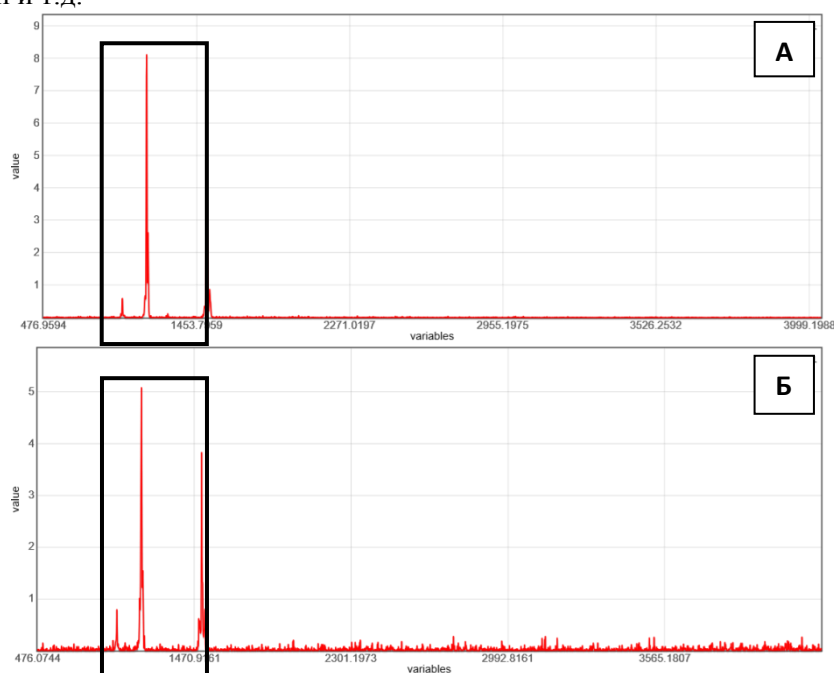


Рисунок 3. VIP спектры: А – при разделении классов «норма» и «преэклампсии»; Б - при разделении двух форм заболевания «умеренная преэклампсия» и «тяжелая преэклампсия».

В результате проведения данных исследований было установлено, что концентрация каротиноидов в плазме крови в норме достоверно выше, чем при преэклампсии – этот факт хорошо согласуется с литературными данными [10], из которых следует, что уровни β -каротина и ликопина были значительно ниже у женщин с преэклампсией. А в случае тяжелой формы ПЭ концентрация каротиноидов выше, чем при умеренной форме ПЭ. Это, скорее всего, вызвано тем, что в случае тяжелой формы ПЭ организм пытается восстановить тонкий баланс окислительно-восстановительных процессов за счет выработки большого количества антиоксидантов для защиты от обширного окислительного стресса.

4. Заключение

В результате построения аналитической модели с помощью метода проекций на латентные структуры с последующим дискриминантным анализом (PLS-DA) осуществлено разделение Раман-люминесцентных спектров проб плазмы крови различных групп пациентов:

- точность разделения классов «нормы» и «преэклампсии» составляет 96%;
- точность разделения двух форм заболевания «умеренная преэклампсия» и «тяжелая преэклампсия» составляет 72%.

Таким образом, дальнейшее развитие данной методики является чрезвычайно перспективным с целью создания простой и дешевой экспресс-диагностики преэклампсии и мониторинга течения данного заболевания. В дальнейших исследованиях для увеличения

чувствительности, специфичности и точности подхода планируется задействовать мультимодальный подход с использованием нескольких Раман-люминесцентных установок, отличающихся длинами волн лазерного излучения и резонансным возбуждением различных молекулярных структур, а также значительно увеличить выборку пациентов в каждой группе.

5. Литература

- [1] Зарипова, Л.Р. Прогнозирование и ранняя диагностика преэклампсии / Л.Р. Зарипова, Т.В. Галина, Т.П. Голикова, А.С. Гондаренко // Вестник РУДН. Серия «Медицина. Акушерство и гинекология». – 2012. – Т. 6. – С. 15-22.
- [2] Иванец, Т.Ю. Плацентарный фактор роста и fms-подобная тирозинкиназа-1 как маркеры преэклампсии в динамике беременности / Т.Ю. Иванец, М.Л. Алексеева, Н.С. Логинова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – Т. 8. – С. 14-17.
- [3] Vankeirsbilck, T. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis / T. Vankeirsbilck, A. Vercauteren, W. Baeyens // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2002. – Vol. 21. – P. 869-877.
- [4] Abramczyk, H. Human breast tissue cancer diagnosis by Raman spectroscopy / H. Abramczyk, I. Placek, B. Brozek-Płuska, K. Kurczewski, Z. Morawiec, M. Tazbir // Spectroscopy. – 2008. – Vol. 22. – P. 113-121.
- [5] Александров, Н.С. Перспективы использования раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике почечно-клеточного рака / Н.С. Александров, С.Т. Аврамова, Ю.А. Кириллов, Е.А. Безруков, А.В. Кондрашина, В.И. Кукушкин, Д.Н. Артемьев // Вопросы урологии и андрологии. – 2018. – Т. 6, № 4. – С. 43-49.
- [6] Ermakov, I.V. Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue / I.V. Ermakov, M. Sharifzadeh, M. Ermakova, W. Gellermann // J Biomed Opt. – 2005. – Vol. 10(6). – P. 064028.
- [7] Savitzky, A. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures / A. Savitzky, M. Golay // Anal. Chem. – 1964. – Vol. 36(8). – P. 1627-1639.
- [8] Baek, S.-J. Baseline correction using asymmetrically reweighted penalized least squares smoothing / S.-J. Baek, A. Park, Y.-J. Ahn, J. Choo // Analyst. – 2015. – Vol. 140(1). – P. 250-257.
- [9] Jehlicka, J. Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: implications for astrobiology / J. Jehlicka, Howell G.M. Edwards, K. Osterrothova, J. Novotna, L. Nedbalova, J. Kopecky, I. Nemecek, A. Oren // Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. – 2014. – Vol. 372(2030).
- [10] Palan, P.R. Placental and serum levels of carotenoids in preeclampsia / P.R. Palan, M.S. Mikhail, S.L. Romney // Obstet Gynecol. – 2001. – Vol. 98(3). – P. 459-462.

The study of methods of spontaneous and resonance Raman spectroscopy of blood plasma for the rapid diagnosis of preeclampsia

D.N. Artemyev¹, V.I. Kukushkin², R.Kh. Shavaeva³, A.V. Murashko³, O.V. Sharapova³,
V.F. Zuev³, S.A. Timofeev³

¹Samara National Research University, Moskovskoe shosse 34A, Samara, Russia, 443086

²Institute of Solid State Physics RAS, Academician Osipyan 2, Chernogolovka, Russia, 142432

³First Moscow State Medical University, Trubetskaya 8, p. 2, Moscow, Russia, 119991

Abstract. In this work, we studied the effectiveness of using spontaneous and resonant Raman spectroscopy of blood plasma of patients as an express diagnosis of preeclampsia. As the resonant wavelength, radiation with a wavelength of 532 nm was chosen, which is characteristic of the excitation of a signal of carotenoids. It was found that the contribution of certain types of carotenoids (β – carotene, astaxanthin, mixoxanthophyll, lycopene, deinoxanthin, spirilloxanthin, neoxanthin, fucoxanthin) significantly changes during the development of the disease and it was noted that the total concentration of all types of carotenoids in blood plasma is normally significantly higher than with preeclampsia.