

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА У ЖЕНЩИН И ИХ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

**М.Т. Александров, В.М. Зуев, В.В. Кукушкин, А.И. Карселадзе, А.И. Ищенко,
Т.А. Джибладзе, Б.Г. Метревели, Т.А. Хомерики**

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
НКЦ реабилитации женского здоровья, ФГУ ЛРЦ МЗ РФ
ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН
Институт физики твердого тела РАН
Контакты: Михаил Тимофеевич Александров alex_mt@mail.ru

Цель: Изучение спектральных характеристик органов малого таза женщин для выявления механизмов развития опухолей.

Материалы и методы: Для следования использован аппаратно-програмный комплекс «Ин Спектр», в основе действия которого положено физическое явление – рамановское рассеяние. Всего исследовано 120 тест-объектов верифицированного биопсийного материала.

Результаты: В результате выявлены характерные отличия спектральных характеристик здоровых и опухолевых тканей, а также плазмы крови здоровых и больных эндометриозом, злокачественными опухолями органов малого таза и беременных с преэклампсией.

Выводы: Сделан вывод о том, методика и аппаратура могут быть использованы для экспресс-диагностики опухолей органов малого таза и динамического мониторинга состояния онкологических больных.

Ключевые слова: спектральные характеристики, органы малого таза, рак, опухоли, плазма крови, рамановское рассеяние.

SPECTRAL ANALYSIS OF PELVIC TISSUES IN WOMEN AND IT'S CLINICAL VALUE

**M.T. Alexandrov, V.M. Zuev, V.V. Kukushkin, A.I. Karseladze, A.I. Ishenko,
T.A. Dzhibladze, B.G. Metrevelli, T.A. Khomeriki**

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Scientific and Clinical Women's Health Recovery Center
Federal State Institution «Treatment and Rehabilitation Center» of the Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center»
of the Russian Academy of Medical Sciences
Institute of Solid State Physics of the Russian Academy of Sciences
Further Information Contact: Mikhail Timofeevich Alexandrov: alex_mt@mail.ru

Objective: spectral analysis of pelvic organs in women to detect mechanisms that control tumor development.

Materials and Methods: Hardware-Software complex «In Spectrum» whose operation is based on the physical phenomenon — Raman scattering was used for the research purposes. Totally 120 test-objects of the verified biopsied material were examined.

Results: Characteristic differences in the spectral analysis of healthy tissues and tumour tissues as well as of blood plasma of healthy women and patients with endometriosis, malignant neoplasms of the pelvic organs and in pregnant women with pre-eclampsia were detected in the study.

Conclusions: It has been concluded that the methodics and equipment can be used for the express diagnosis of the tumours of pelvic organs and for the dynamic monitoring of the condition of oncologic patients.

Key Words: spectral features, pelvic organs, cancer, tumors, blood plasma, Raman scattering.

Введение

По прогнозам ВОЗ, с 1999 г. по 2020 г. заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований во всем мире возрастут в два раза: с 10 до 20 млн новых случаев и с 6 до 12 млн регистрируемых смертей.

В России в 2004 году прирост показателя заболеваемости злокачественными новообразованиями по сравнению с предыдущим годом составил 2,8%, по сравнению с 1994 г. — 12,7%. При этом лишь 0,7% новых случаев рака диагностированы в стадии *in situ*, 43,3% — в I–II стадии, 24,8% — в III стадии, 23,3% — в IV стадии заболевания, стадия не установлена в 7,9% наблюдений. В 2005 г. в России было 2,4 миллиона онкологических больных, из которых около 51% проживет менее пяти лет после установления диагноза и начала лечения [2].

Особый интерес представляет исследование репродуктивных органов малого таза женщин: матки, шейки матки, яичников и маточных труб, диагностика и лечение заболеваний которых представляют собой важную и сложную клиническую проблему.

Диагностика указанных объектов часто вызывает затруднения, связанные с большим количеством анатомических структур в области таза, из которых могут исходить опухолевидные образования, и большим разнообразием факторов, приводящих к возникновению таких образований или опухолей (функциональных, воспалительных, неопластических, вызванных непроходимостью и т.д.). Опухолевидные образования сходного происхождения часто проявляются по-разному, что может ввести в заблуждение даже очень опытного клинициста. Поэтому возникает необходимость в проведении обширной дифференциальной диагностики объемных образований, диапазон которой можно сократить только путем выбора точных, информативных и целенаправленных исследований и знаний исходного состояния тканей (интактные ткани) и органов малого таза как объектов сравнения.

Сегодня диагностика как доброкачественных, так и злокачественных опухолей осуществляется в основном в специализированных ЛПУ (когда часто уже есть выраженные признаки онкологического заболевания) при помощи клинических, лучевых (рентгенологических, ультразвуковых, лазерной флюоресцентной диагностики с использованием для контрастности опухоли и ее границ препаратов на основе порфирина или его предшественников), химических, цитологических, гистологических методов исследования [5, 7] или проводится диагностика с использованием маркеров (для отдельных видов опухолей). Все перечисленные методы, несмотря на высокую эффективность их моно- или комплексного применения, не являются экспрессными: в стадии *in situ* диагностируют 0,7% опухолей, в I–II стадии 36–40%, а остальные выявляются на более поздних стадиях заболевания — как в России, так и за рубежом [10]. Именно поэтому несвоевременная диагностика доброкачественных и злокачественных новообразований может приводить к тяжелым последствиям для больной с угрозой для ее жизни (только 40% больных после операции живут до пяти лет) [9]. Широкая распространенность во всем мире и рост числа доброкачественных и злокачественных опухолей органов малого таза обуславливают необходимость разработки и внедрения высокотехнологичных методов ранней диагностики рака (особенно на этапе диспансеризации или первичного осмотра по обращаемости) и поиск новых методов лечения, основанных на использовании последних достижений науки, техники и медицинских технологий.

Один из таких перспективных методов — метод лазерной конверсионной диагностики (его раман-флюоресцентная составляющая) [2].

Цель исследования

Цель работы — исследование спектральных характеристик органов малого таза женщин, выявление механизмов развития опухолей.

В данной работе путем одновременного измерения рамановского рассеяния и сигнала люминес-

Таблица 1

Заболеваемость населения злокачественными новообразованиями по полу и отдельным локализациям (выявлено заболеваний у больных с диагнозом, установленным впервые в жизни)

Год	1995	2000	2005	2007	2008
	Всего (тыс. человек)				
Все злокачественные новообразования (женщины)	206,1	232,3	250,1	259,2	262,5
Рак шейки и тела матки	24,9	27,5	30,2	31,8	

ценции на SERS-подложках мы получили спектры злокачественной опухоли и здоровой ткани, проанализировав которые, можно найти ряд характерных отличий.

Для получения указанных результатов были поставлены следующие задачи:

- создание аппаратно-программного комплекса, обеспечивающего экспресс-диагностику спектральных характеристик тканей для выявления ранних признаков заболеваний, а также возможных предопухолевых и опухолевых процессов;
- создание программы, которая в числовом и графическом выражении выдает интегральную интенсивность в исследуемой области и свидетельствует о наличии опухоли;
- спектральная диагностика патологических процессов различной локализации;
- патоморфологическое исследование, полученное при биопсии или в результате операции образцов тканей;
- динамический контроль состояния онкологических больных при минимальных затратах времени и средств.

Методы и материал исследования

Для исследования использовался аппаратно-программный комплекс «Ин Спектр» и метод лазерной

конверсионной диагностики (ЛКД) (рамановская и флюоресцентная составляющие). Рамановское (неупругое) рассеяние света обусловлено неупругими столкновениями световых квантов (фотонов) с нейтральными возбуждениями исследуемого вещества. При таком столкновении спектр рамановского рассеяния органических молекул состоит из линий, соответствующих деформационным и валентным колебаниям химических связей углерода с другими элементами, как правило, водородом, кислородом и азотом, а также характеристическим колебаниям различных функциональных групп (гидроксильной -ОН, аминогруппы -NH₂ и т.д.). Поскольку в органических молекулах большое количество вращательных и колебательных степеней свободы, все они проявляются в спектре рамановского рассеяния света в виде набора линий, каждая из которых характеризуется индивидуальным спектральным положением и относительной интенсивностью. Именно этот набор спектральных характеристик дает возможность говорить о рамановском «отпечатке» пальцев органической молекулы и позволяет проводить анализ веществ, а также расшифровывать состав смесей многих веществ.

Таким образом, из набора возбужденных состояний, измеренных по спектру рассеянного света, можно сделать заключение о природе молекул, из которых состоит исследуемое вещество.

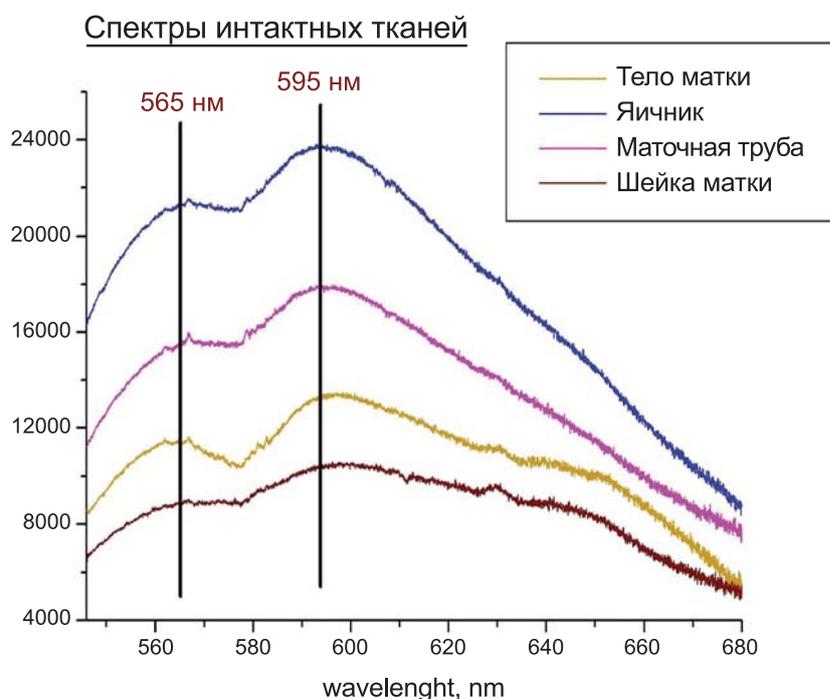


Рис. 1. На рисунке изображены спектры интактных тканей — тела матки, яичника, маточной трубы и шейки матки

Кроме того, по характеру люминесценции можно определить, является ли исследуемая ткань опухолевой (злокачественной) или интактной (здоровой).

Всего исследовано 120 тест-объектов верифицированного (гистологами) биопсийного материала (лаборатория патоморфологии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, заведующий проф. А.И. Карселадзе.). Для улучшения результата исследований (повышение чувствительности метода) применяли SERS-подложки, которые позволяют увеличить сигнал рамановского рассеяния в сотни тысяч раз. В этом случае для исследования:

- 1) производили отпечаток исследуемого биопсийного материала на подложку;
- 2) дожидались высыхания;
- 3) ставили подложку в фокус лазерного излучения и двигали лазерное пятно в область высохшего исследуемого вещества;
- 4) выставляли определенную мощность, чтобы с «пустой» подложки не было спектра самой подложки;
- 5) накапливали и усредняли измерения (до сотни спектров) за несколько секунд, чтобы получился гладкий спектр;
- 6) проводили анализ и интерпретацию результатов исследования.

В отдельном исследовании при изучении диапазона применения разрабатываемой методики изуча-

ли раман-флюоресцентные спектры плазмы крови доноров (40 чел.), больных эндометриозом, беременных с преэклампсией (19 чел.) и здоровых спортсменов (12 чел.).

Результаты представлены в виде таблиц и графиков.

Результаты исследования

В результате выявлены характерные отличия спектральных характеристик здоровых и опухолевых тканей, а также плазмы крови здоровых и больных эндометриозом, злокачественными опухолями органов малого таза и беременных с преэклампсией.

Приведены раман-люминесцентные спектры разных типов опухолевых доброкачественных и злокачественных, а также интактных тканей органов малого таза у женщин. Для выявления отличий в спектрах опухолевых и интактных тканей необходимо правильно проводить нормировку интенсивности (чтобы относительная интенсивность не зависела от параметров установки). Чтобы избавиться от всех чужеродных факторов, интенсивность люминесценции (или рамановской линии) делили на какую-нибудь интенсивность, которая также зависит от всех этих факторов-помех. Такой нормировочной интенсивностью, которая стоит в знаменателе, может быть интенсив-

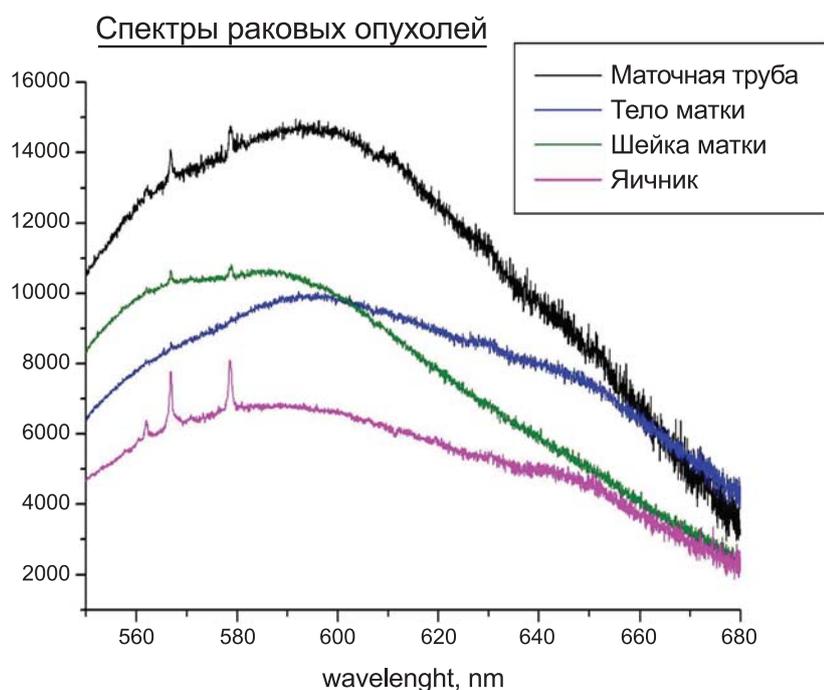


Рис. 2. На рисунке изображены спектры раковых тканей — тела матки, яичника, маточной трубы и шейки матки

ность рассеянной лазерной компоненты или интенсивность рамановской линии воды, которая содержится в исследуемом объекте. Ниже представлены полученные данные.

Сначала приведем спектры интактных тканей.

На рисунке 2 изображены спектры тканей злокачественных опухолей — тела матки, яичника, маточной трубы и шейки матки.

По снятым спектрам интактных и опухолевых тканей можно сделать следующие заключения:

1. Спектры интактных тканей имеют похожую двугорбую форму (во всех исследованных тканях — неспецифический индикатор отсутствия патологии). Независимо от разновидности ткани и точки, в которой мы снимаем спектр, мы всегда видим двугорбую люминесценцию. Форма спектров — подобная, гомотетичная и от раза к разу воспроизводится. Изменяется интенсивность пиков люминесценции в зависимости от точки и ткани, но положение пиков всегда остается на том же месте — есть пик на 565 нм и пик на 595 нм. Полуширина первого пика (с максимумом на 565 нм) —

16–22 нм, полуширина второго пика (с максимумом на 595 нм) — 32–40 нм.

2. Спектры злокачественных опухолей отличаются друг от друга (по форме люминесценции) в зависимости от ткани и точки, в которой записываются спектры. Это, возможно, объясняется тем, что мы видим люминесценцию каких-нибудь бактерий или веществ, концентрация и состав которых различны на разных стадиях развития онкологии. Из-за этого, возможно, пик люминесценции смещается вправо или влево (в зависимости от ткани и стадии развития опухоли). В отличие от спектров здоровых тканей, опухолевые спектры характеризуются куполообразной «одногорбой» люминесценцией, степень выраженности которой может также варьироваться. Пики люминесценции злокачественных опухолей обнаруживаются на длинах волн — 560 нм, 580 нм и 600 нм. Полуширины люминесценции сильно отличаются друг от друга в зависимости от точки измерения и вида ткани и во всех случаях существенно отличаются от интактных тканей.

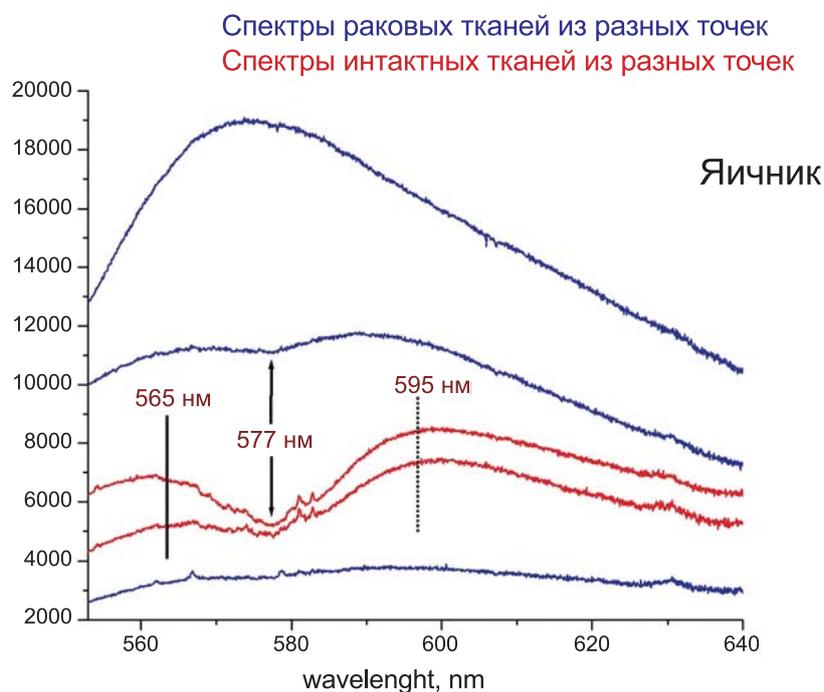


Рис. 3. Здесь построены спектры:

1) здоровой ткани яичника (два красных спектра) с локальными максимумами люминесценции на длинах волн — 565 нм и 595 нм и локальным минимумом на 577 нм;

2) раковой ткани яичника (три синих спектра). Синие спектры сильно отличаются друг от друга, как по форме, так и по интенсивности, что говорит о неоднородности раковой ткани — иногда мы попадаем на сгустки раковых клеток, а иногда на участки интактной ткани (средний синий спектр). У среднего синего спектра локальные максимумы и минимумы в тех же местах, что и у здоровой ткани

3. *Спектры злокачественных опухолей иногда имеют двугорбую люминесценцию (рис. 3), сходную с люминесценцией здоровой ткани.* Это означает, что при записи спектра мы встали лазером на здоровую область в опухолевой ткани. Такие спектры действительно должны иногда быть потому, что в опухолевой ткани могут попадаться здоровые клеточные структуры, размер которых соизмерим с размером лазерного пучка (мы можем попасть то на области здоровых клеток, то на области опухолевых клеток).

По рамановским линиям в данном случае отличать ткани между собой не получается. Это обосновано тем, что рамановские пики у разных тканей находятся в одинаковых местах, но имеют в разных точках этих тканей разные интенсивности — это свидетельствует о разной концентрации веществ в ткани в разных точках. Это и понятно, так как исходя из единства морфометрического и биохимического строения однотипных тканей, мы не должны видеть различия в спектрах рамановского рассеяния. Однако если в ткани будет накапливаться какое-то специфичное вещество и (или) клеточные структуры, то по изменению рамановского спектра мы сможем сказать, что это за вещество, и определить его концентрацию. И тем самым в еще большей степени повысить специфичность и чувствительность разрабатываемой диагностической технологии.

Теперь обсудим спектры люминесценции (широкий профиль спектра). Различия в спектрах люминесценции для здоровой ткани и при патологии отчетливо и однозначно выявляются. Спектр здоровой ткани всегда имеет двугорбую форму люминесценции, а спектры опухолевой ткани достоверно и сильно отличаются (при этом встречаются и участки интактной ткани внутри опухолевой, что соответствует данным гистологического исследования) и не похожи друг на друга. Основываясь на этом, можно предложить программную методику, которая позволит отличать опухолевые ткани от интактных тканей (на основе создания соответствующей базы данных). Для правильного проведения исследований и постановки адекватного диагноза необходима правильная нормировка, пробоподготовка и единообразие измерений.

Исследованные спектры плазмы крови доноров и пациентов

Из представленного рисунка следует, что раман-флуоресцентные спектры доноров, здоровых спортсменов, больных с эндометриозом и беременных с преэклампсией имеют существенные характерные отличия, поэтому рассматриваемая методика и аппаратура могут быть использованы как для исследования различных тканей органов малого таза у женщин, так и биологических жидкостей человека.

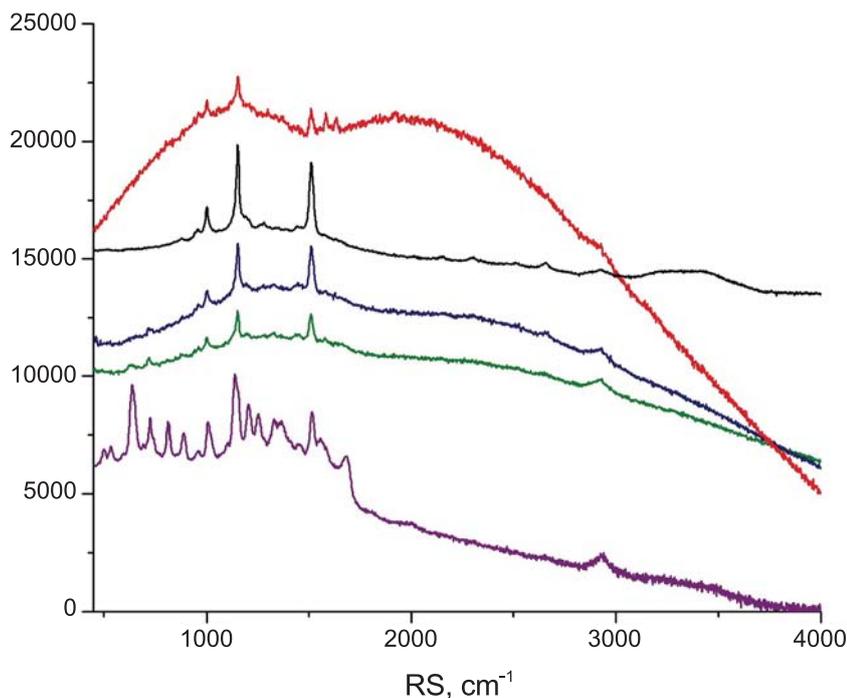


Рис. 4. Спектры плазмы крови здоровых доноров, больных эндометриозом, и беременных с преэклампсией

Обсуждение

Таким образом, была проведена работа по исследованию спектральных характеристик органов малого таза женщин, которая позволила выявить ряд характерных особенностей, отличающих опухолевую ткань от ткани в норме, путем анализа рамановского излучения и люминесценции.

Выводы

На основе полученных результатов были сделаны следующие выводы:

- Форма люминесценции исследуемой ткани говорит о ее состоянии: норма («двугорбость») или рак («одногогорбость»)/куполообразная форма, наличие в комбинации спектров спектров интактных тканей). Однако степень выраженности формы может варьировать. Кроме того, у интактной ткани пики активности люминесценции постоянны, а полуширина «горбов» имеет определенную величину.

- Форма люминесценции опухолевой ткани может также быть «двугорбой», что означает, что для исследования выбрана точка, соответствующая

здоровой ткани среди опухолевой. Поэтому для точного получения данных важно провести исследование в нескольких точках. А при сканировании ткани можно получить оценочную концентрацию злокачественных и интактных клеток в ткани.

- Различные пики, ширина, форма одногорбой люминесценции указывают на ряд факторов, повлиявших на развитие опухоли. К ним относится возраст опухоли, характер развития, скорость распространения и т.д.

Методика и аппаратура могут быть использованы для экспресс-диагностики опухолей органов малого таза и динамического мониторинга состояния онкологических больных.

В дальнейшем планируется усовершенствование технологии, позволяющей более точно диагностировать ткани, возможно, даже бесконтактным путем, а также получение сведений о возрасте опухоли, характере развития, скорости распространения и выборе средств борьбы (своевременная профилактика и ранняя диагностика), направленных на предотвращение возникновения и развития злокачественных новообразований в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузин М.И. и соавт. (1995 г.), Харнас С.С. (1997 г.), Sharabasy M.M., Waseef A.M., Hafez M.M., Salim S.A. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Cancer*. 1992 Mar. 65(3), 409–12.
2. Александров М.Т. Лазерная клиническая биофотометрия. М.: Техносфера, 2008.
3. Александров М.Т., Прохончуков А.А. Лазер в клинической медицине. М.: 1981.
4. Плетнев С.Д. (ред.). Лазеры в клинической медицине. М.: Медицина, 1996.
5. Скобелкин О.К. (ред.). Лазерная хирургия. М.: Медицина, 1989.
6. Зуев В.М., Ищенко А.И., Джигладзе Т.А., Зайцева Г.Ю. Лазерное лечение дисплазии шейки матки. М., 1997.
7. Гамалея А.Ф. Механизмы биологического действия излучения лазеров. Лазеры в клинической медицине. М.: Медицина, 1981.
8. Евстигнеев А.Р., Черкашин В.В. Проблемы интенсивной терапии в клинике. М.: Медицина. 1985.
9. Козаченко В.П. Рак матки. М., 1983.
10. Мустафина Е.А., Баринов В.В., Шабанов М.А., Пескова В.И., Бокина Л.И. Влияние морфологических признаков рака тела матки II стадии на возникновение рецидивов и метастазов. Опухоли женской репродуктивной системы. 2010. № 2. С. 78–83.
11. Feltmate C.M., Duska L.R., Chiao Y. et. Al. Predictors of recurrence in surgical stage II endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* 1999; 73:407–11.
12. http://humbio.ru/humbio/01122001/canc_sv/00046f3d.htm