

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОРФОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА И ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОХШИХ КАПЕЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРОСТАТЫ

*А. В. САВКОВ¹⁾, М. А. СЕРГЕЙ¹⁾, Ж. И. БУЛОЙЧИК¹⁾, Г. Т. МАСЛОВА¹⁾,
А. С. МАВРИЧЕВ²⁾, Л. А. ДЕРЖАВЕЦ²⁾*

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²⁾ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова», 223040, агрогородок Лесной, Минский район, Республика Беларусь

Исследована морфология высохшего образца плазмы крови больных с онкопатологией. Выявлены структурные особенности высохших капель плазмы крови пациентов с диагнозом «рак простаты». Показана возможность уточнения диагноза по отнесению опухоли к типу T₂ или T₃. Получены полуколичественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохшей капли биологических жидкостей и в слоях с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что данный метод дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является важным средством в диагностике заболеваний. Полученные экспериментальные данные могут служить основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: биологическая жидкость; морфология капли; лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; двоянные лазерные импульсы; пространственное распределение; послыйный анализ; кальций.

THE USE OF MORPHOSTRUCTURAL ANALYSIS AND LASER ATOMIC-EMISSION SPECTROMETRY OF THE DRIED BLOOD PLASMA DROPS FOR DIAGNOSIS OF PROSTATE CARCINOMA

*A. V. SAVKOV^a, M. A. SERGEI^a, J. I. BULOICHIK^a, G. T. MASLOVA^a,
A. S. MAVRICHEV^b, L. A. DERZHAVETS^b*

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bN. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, 223040, Lesnoy, Minsk district, Republic of Belarus

The morphology of the dried blood plasma drops from the patients with oncopathology has been studied. The structural features characteristic for the dried blood plasma drops from the patients with diagnosed prostate carcinoma have been revealed. It has been

Образец цитирования:

Савков А. В., Сергей М. А., Булойчик Ж. И., Маслова Г. Т., Мавричев А. С., Державец Л. А. Использование морфоструктурного анализа и лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии высохших капель плазмы крови для диагностики рака простаты // Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. 2016. № 3. С. 51–62.

For citation:

Savkov A. V., Sergei M. A., Bulovichik J. I., Maslova G. T., Mavrichev A. S., Derzhavets L. A. The use of morphostructural analysis and laser atomic-emission spectrometry of the dried blood plasma drops for diagnosis of prostate carcinoma. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2016. No. 3. P. 51–62 (in Russ.).

Авторы:

Александр Владимирович Савков – магистрант кафедры лазерной физики и спектроскопии физического факультета.
Мария Александровна Сергей – студентка биологического факультета.

Жанна Игнатьевна Булойчик – кандидат химических наук; старший научный сотрудник кафедры физической оптики физического факультета.

Галина Трофимовна Маслова – кандидат биологических наук; доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Анатолий Сергеевич Мавричев – доктор медицинских наук; заместитель директора по лечебной работе.

Лилия Александровна Державец – кандидат биологических наук; заведующий клинико-диагностической лабораторией.

Authors:

Alexander Savkov, master's degree student at the department of laser physics and spectroscopy, faculty of physics. savkov.00@mail.ru

Mariya Sergei, student at the faculty of biology.

Janne Bulovichik, PhD (chemistry); senior researcher at the department of physical optics, faculty of physics.

zajogin_an@mail.ru

Galina Maslova, PhD (biology); associate professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

Anatoli Mavrichev, doctor of science (medical sciences); deputy director for clinical practice.

Liliya Derzhavets, PhD (biology); head of the clinical-diagnostic laboratory.

demonstrated that diagnosis may be more precise due to the possibility to attribute a tumor to the type T_2 or to the type T_3 . Semiquantitative results for the spatial distribution of calcium over the surface of the dried drop of a biological fluid and within the layers have been obtained using the laser atomic-emission spectrometry method. It has been shown that atomic-emission spectrometry enables one to obtain semiquantitative estimates for changes in the albuminous centers and may be an effective diagnostic instrument. The obtained experimental data form the basis for further progress in the early diagnostics of disorders in the functional reserves of human organisms; a system of the adequate rehabilitation measures may be suggested.

Key words: biological fluid; drop morphology; laser atomic-emission spectrometry; double laser pulses; spatial distribution; layer-by-layer analysis; calcium.

В течение многих лет ученые используют разнообразные высокотехнологичные методы, пытаясь определить различные биомаркеры, которые достоверно указывают на наличие того или иного онкологического заболевания. Общеизвестно, что развитие злокачественной опухоли – процесс мультифакторный, сопряженный с нарушением или перестройкой большей части внутриклеточных механизмов. В связи с этим составить представление о течении процесса лишь по одному маркеру практически невозможно.

Принцип применения биомаркеров в диагностике онкологических заболеваний основан на концепции предполагаемой обусловленности развития рака некой мутацией (или набором мутаций), например инаktivацией какого-либо важного гена. В результате в пораженном органе изменяется состав группы белков, в синтезе которых задействован мутировавший ген [1].

Рак предстательной железы (РПЖ) – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний, которое является основной причиной смерти мужчин в развитых странах [2]. Это связано с тем, что на ранних стадиях развития болезни нет явных признаков заболевания и пациенты своевременно не получают лечение. Когда диагноз ставится на поздних стадиях заболевания, выживаемость пациентов с РПЖ составляет примерно 33 %. При ранней диагностике этот показатель равен практически 100 % [3].

Поскольку около 20 % поверхностных белков клеток некоторых органов, включая предстательную железу, могут быть обнаружены и выделены из сыворотки крови, определение набора белков, специфичного для данного онкологического заболевания, представляет собой надежный метод диагностики. Вместе с тем встречается достаточное количество случаев, связанных с недостоверной оценкой стадии проявления (T_2 и T_3) рака простаты [4].

Ранняя диагностика рака простаты требует поиска новых молекулярных биомаркеров. Приоритетной задачей в настоящее время является создание набора из доступных маркеров, способных дать достаточно подробную характеристику опухоли [5]. В последние годы сделан акцент на разработке тестов, связанных с измерением низкомолекулярных веществ в биообразцах, к примеру методом масс-спектрометрии. Накопленные научные данные свидетельствуют о перспективности исследования низкомолекулярных веществ (компонентов) крови для создания диагностических лабораторных тестов [5].

В настоящей работе проведены исследования плазмы крови пациентов с диагностированным раком простаты, включающие изучение как морфологии структурирования образца высыхающей капли биологической жидкости (БЖ), так и пространственного распределения эссенциальных элементов по поверхности и слоям высохшей капли.

Известно, что исследования структуризации твердой фазы БЖ широко используются в диагностических целях в самых разнообразных областях медицины. При малейшей патологии происходит нарушение структуры белков, начинаются процессы их агрегации, сопровождающиеся возникновением аномальных и нерегулярных структур (конкреции, трещины и пр.) [6–8].

Дополнением к этим исследованиям является полуколичественная оценка пространственного распределения макроэлементов, с которыми связаны процессы коагуляции белковых компонентов БЖ, а значит, и процесс структурирования высыхающих капель. В этом плане достаточно информативной БЖ является плазма крови, которая не лишена белковых и элементных компонентов. Ведущую роль в процессах коагуляции белка играют ионы кальция. Комплексное изучение динамики структурирования высыхающей капли БЖ и пространственного распределения кальция, магния и алюминия по поверхности высохшей капли БЖ позволило в ряде случаев уточнить диагноз онкологических больных для своевременной корректировки лечения [9, 10].

В данной работе представлены результаты исследования морфологических структур и пространственного распределения кальция в высохших на твердой поверхности каплях плазмы крови пациентов с диагнозом «рак простаты». Изучена также динамика структурирования высыхающих капель и морфология высохшей капли.

Методика эксперимента

Каплю плазмы крови пациентов (10 мкл) наносили на обезжиренную пластинку из оргстекла и изучали динамику временно-структурных изменений высыхающей капли. Процесс сушки выполнялся при температуре 18–20 °С. Диагностику капли проводили примерно с 40-й минуты, когда начинается процесс структурирования, изменения в структуре фиксировали каждые 10 мин до полного высыхания капли.

Для получения снимков высохших капель использовали оптический микроскоп Webbers, совмещенный с цифровой камерой (отраженный свет), и микроскоп Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой. Оба микроскопа имеют видеонасадки, работающие с компьютером по USB-2 порту.

Локальное пространственное распределение кальция в высохших каплях плазмы крови экспериментально изучено с использованием лазерного многоканального атомно-эмиссионного спектрометра LSS-1. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 100 мм. Размер пятна фокусировки составляет примерно 50 мкм. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Анализировали суммарные результаты действия пяти последовательных сдвоенных лазерных импульсов (СЛИ).

Результаты эксперимента и их обсуждение

Морфология высыхающих капель плазмы крови трех пациентов в качестве примера приведена на рис. 1. Представлены снимки, полученные на 90-й минуте (см. рис. 1, вертикальный ряд I), полностью высохшей капли (24 ч) (см. рис. 1, вертикальный ряд II), а также фрагменты центральной части высохшей капли (увеличение в 120 раз – на пропускание) и операции (см. рис. 1, вертикальный ряд Д) и для сравнения – после операции (см. рис. 1, вертикальный ряд П).

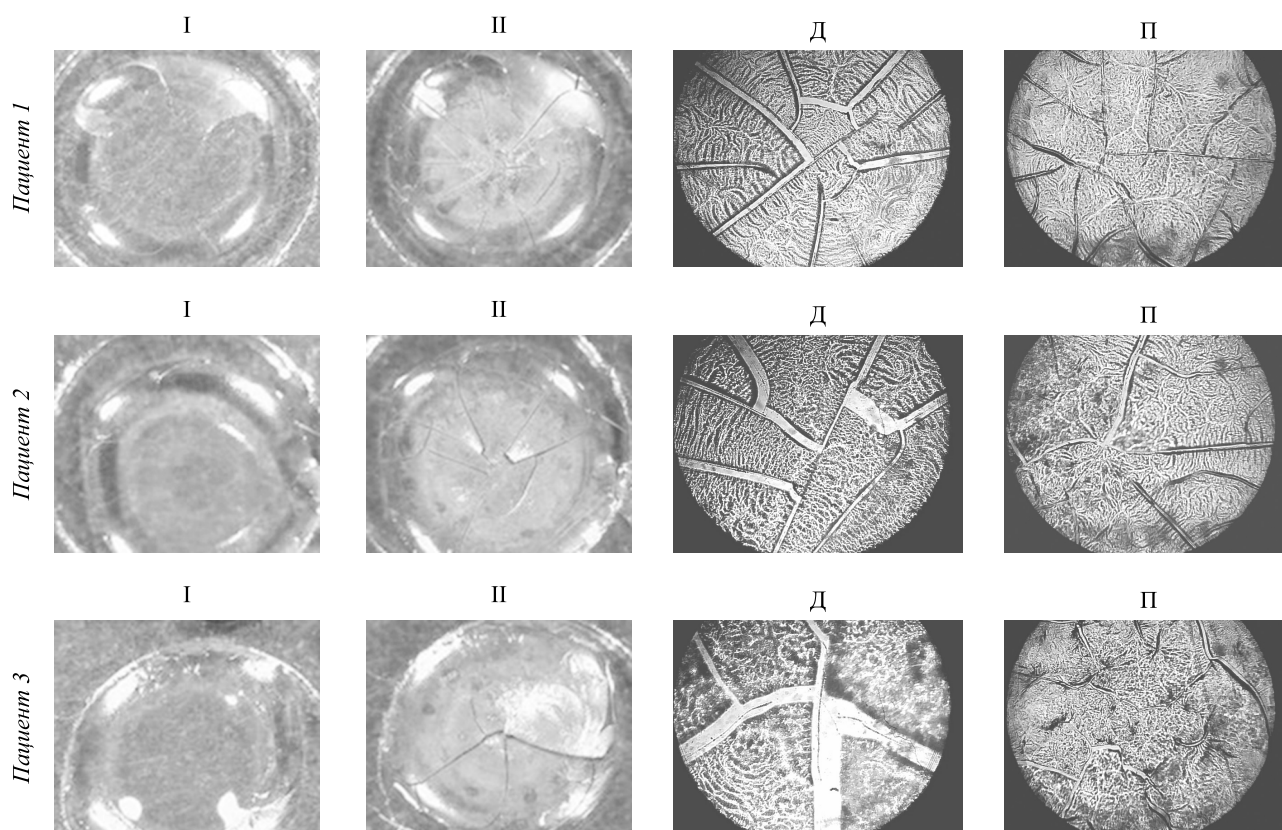


Рис. 1. Структура высохших капель плазмы крови пациентов до операции (I, II, Д) и после операции (П)

Из рис. 1 видно, что процесс структурирования и окончательная морфология высохших капель БЖ пациентов 1 и 2 с диагнозом при поступлении «аденокарцинома простаты типа $T_{2c}N_0M_0$ » очень схожи. Капли при окончательном высыхании имеют четкий краевой белковый валик с разбросанными псевдо-трещинами и темными локальными блоками в центральной части. Прослеживается более-менее радиальное растрескивание капли, что характерно для здорового человека.

Морфоструктура образца плазмы крови пациента 3 несколько отличается. При радиальном растрескивании образуется меньшее количество фрагментов. В центральной части находится большое число завитков, не характерных для структуры высохших капель образцов плазмы крови первых двух пациентов. Диагноз этого пациента – «аденокарцинома простаты типа $T_{3b}N_1M_0$ ».

Следует отметить, что по статистике из-за неоднозначности предварительных диагностических исследований половина опухолей типа T_2 ошибочно принимается за тип T_3 . По этой причине возникает необходимость проведения дополнительных исследований и требуется большая осторожность и деликатность при окончательной постановке диагноза.

Приведенные на рис. 1, П, снимки отчетливо показывают выравнивание картины структурирования после проведения операций. Структура высохших капель плазмы крови после операции у всех трех пациентов становится более единообразной и заметно отличается от структуры капель до лечения, что свидетельствует о его позитивных результатах.

Наряду с анализом морфоструктуры высыхающей на твердой подложке капли плазмы крови дополнительным источником информации может служить оценка локального пространственного распределения кальция (Ca) в высохшей капле БЖ. Этот элемент является одним из жизненно необходимых для человека, преимущественно его ионы связываются с белками и влияют на процесс структурирования.

Нами разработана методика полуколичественного определения кальция методом лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии (ЛАЭМС) [9]. Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы соответственно), временной интервал между удвоенными импульсами – 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения составлял 0,10–0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности. Диаметр высохшей капли – примерно 6 мм.

На рис. 2 представлено распределение Ca (интенсивность I , отн. ед.) линии Ca II (393,239 нм) в спектрах высушенных капель плазмы крови больных до операции как по поверхности капли (вертикаль и горизонталь), так и по слоям (в столбцах справа – номер слоя в точке по диаметру капли). Для сравнения приведено пространственное и послойное распределение кальция в высохшей капле плазмы крови здорового человека.

В образцах высохших капель плазмы крови пациентов, как следует из рис. 2, заметная интенсивность кальция отмечается практически на большей части поверхности капли. В образце капли пациента 1 присутствуют довольно резкие всплески повышения концентрации в третьем и пятом слоях, в образце капли пациента 2 обнаруживается высокое содержание кальция во втором и пятом слоях. Локальное распределение кальция в высохшей капле плазмы крови пациента 2 с более серьезной степенью заболевания показывает, что самое высокое содержание кальция приходится на нижний, пятый слой капли.

Необходимо отметить, что у всех онкобольных до операции концентрация кальция ниже, чем у здорового человека. Из-за хаотичного образования центров коагуляции в высыхающих каплях БЖ пациентов наблюдается разброс концентрации элемента, что также сказывается на интенсивности полос.

Основное отличие локального пространственного распределения кальция пациентов с РПЖ от здорового человека состоит не только в неравномерном распределении кальция по диаметру капли, но и в увеличении его концентрации в более глубоких слоях высохшей капли БЖ данных больных. У здорового человека кальций равномерно распределен по поверхности высохшей капли, он постепенно диффундирует к краям в процессе испарения жидкости, что и обеспечивает максимальную концентрацию его в белковом валике. В нижних слоях высохшей капли кальций практически отсутствует.

Проведена оценка локального пространственного распределения кальция в высохших каплях плазмы крови этих пациентов после операции. Результаты определения послойного содержания кальция в высохших каплях плазмы крови онкопациентов 1, 2, 3 приведены на рис. 3.

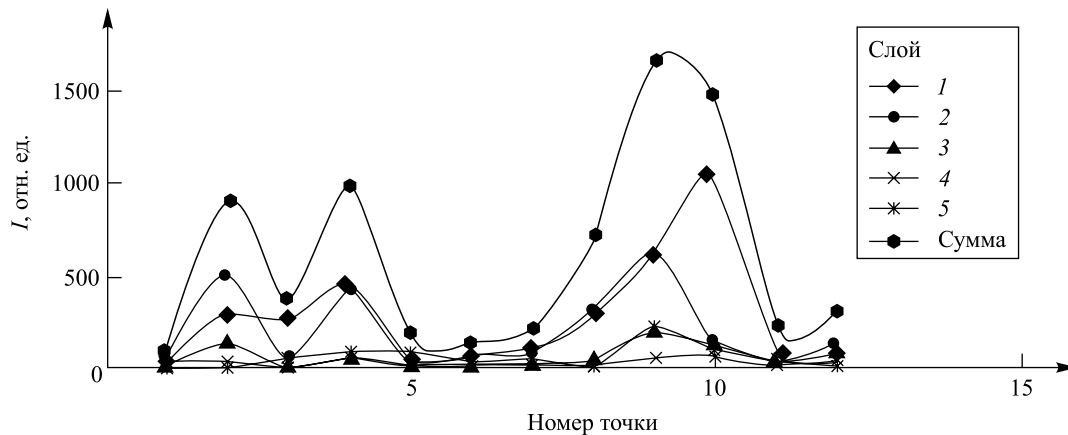
После операции, как очевидно из рис. 3, распределение кальция в высохших образцах капель плазмы крови пациента выравнивалось и заметно приблизилось к распределению элемента, характерному для здорового человека. Это касается и поверхностного, и послойного распределения элемента. Максимальная интенсивность линии кальция приходится на два верхних слоя. Наиболее заметен результат у пациента 3. Произошло существенное выравнивание концентрации с абсолютно явным превалированием содержания кальция в краевом белковом валике, что определенно характеризует позитивный результат операционного вмешательства.

Для систематизации результатов требуется набор статистических данных, но полученные результаты показывают, что различия в величинах интенсивности определяемого макроэлемента как на поверхности, так и в слоях высохшей капли БЖ являются наглядным и достоверным источником информации, позволяющим не только более точно поставить диагноз, но и оценить результат проведенного лечения. Такие исследования с использованием метода ЛАЭМС для анализа высохшей капли БЖ могут быть новым подходом к досимптоматической диагностике, профилактике и лечению этого заболевания.

Пациент 1

а

Ca, горизонталь



б

Ca, вертикаль

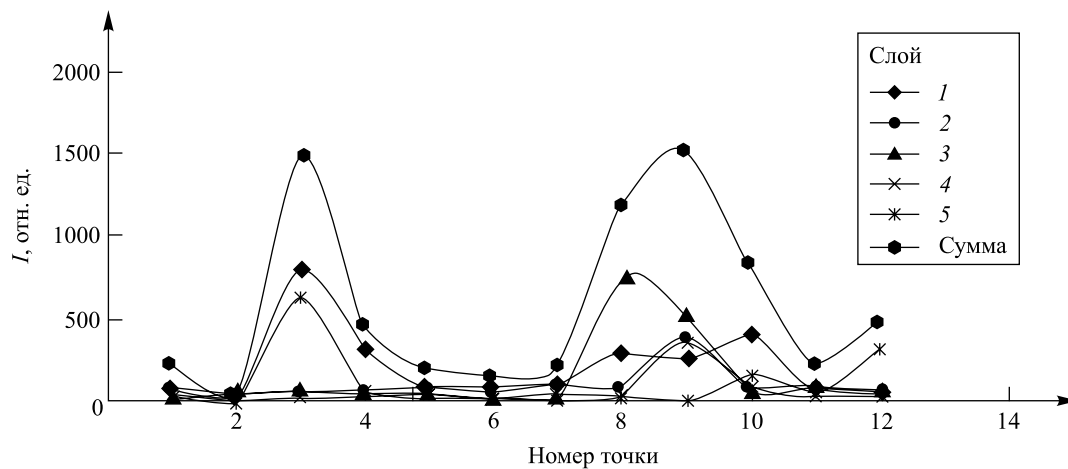
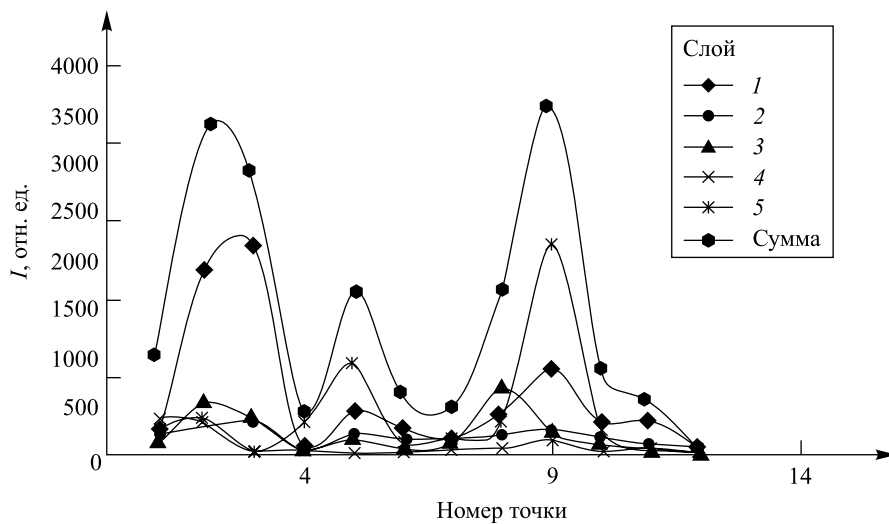


Рис. 2. Послойное распределение Ca (интенсивности I линии) в высушенных каплях плазмы крови пациента до операции (а, б) (начало)

Пациент 2

в

Са, горизонталь



г

Са, вертикаль

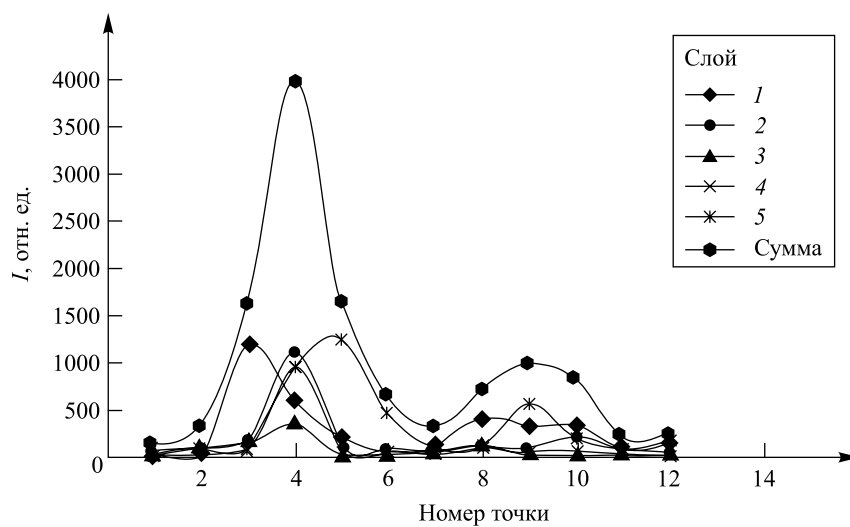
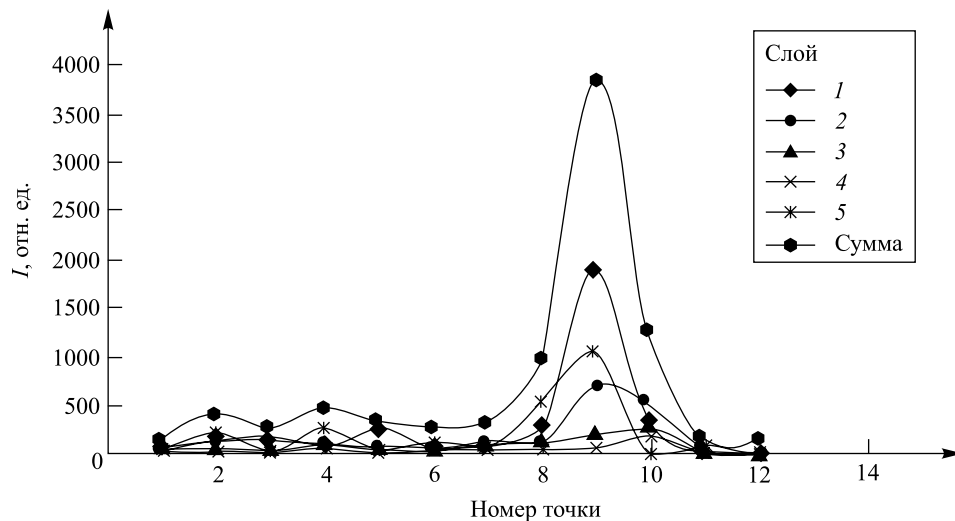


Рис. 2. Послойное распределение Са (интенсивности I) линии в высушенных каплях плазмы крови пациента до операции (в, г) (продолжение)

Пациент 3

δ

Ca, горизонталь



ϵ

Ca, вертикаль

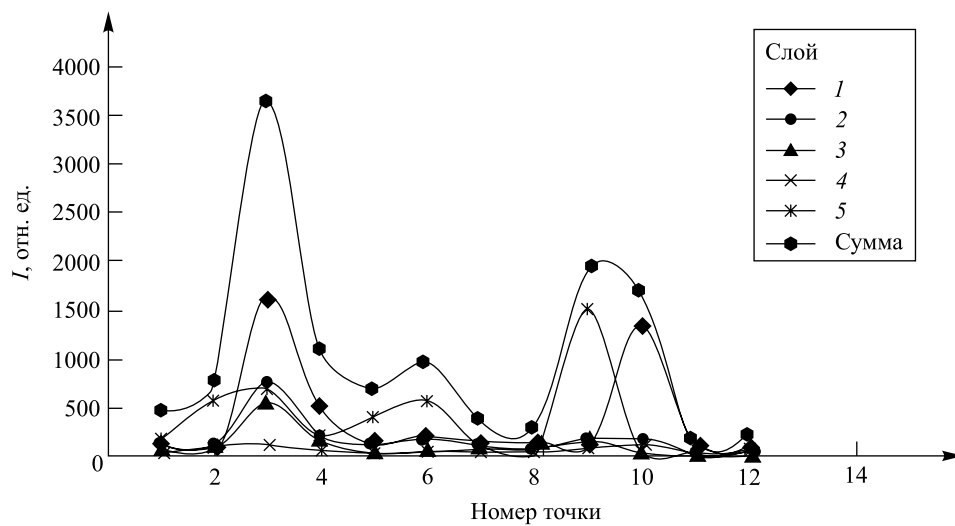
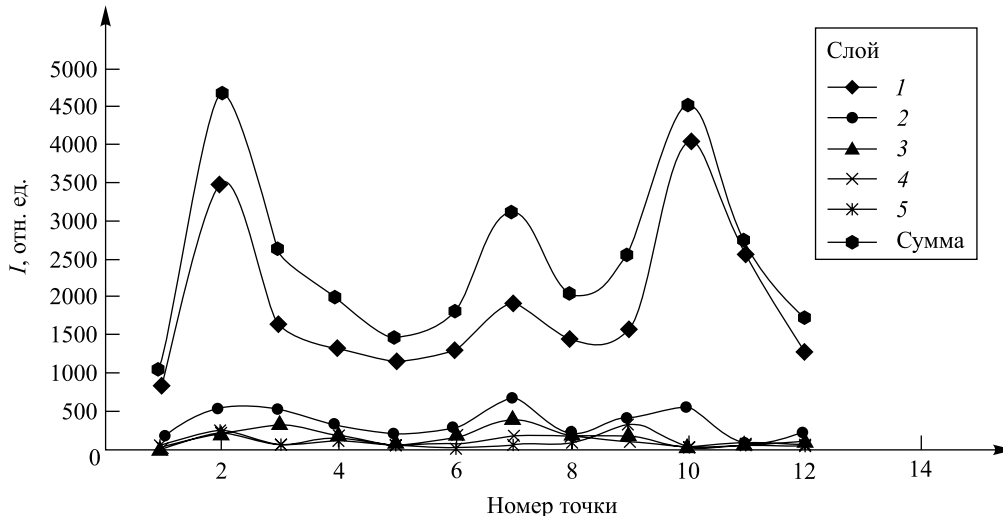


Рис. 2. Послойное распределение Ca (интенсивности I) линии в высушенных каплях плазмы крови пациента до операции (δ , ϵ) (продолжение)

Здоровый человек

ж

Са, горизонталь



з

Са, вертикаль

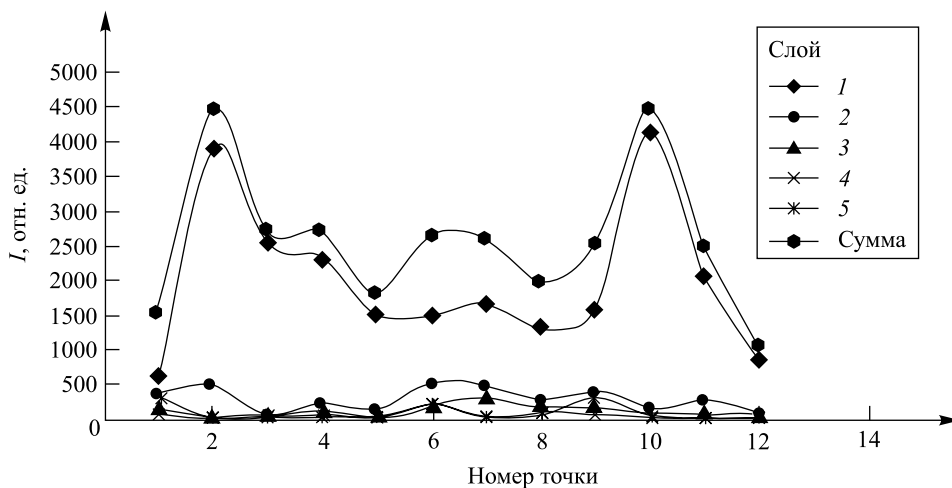
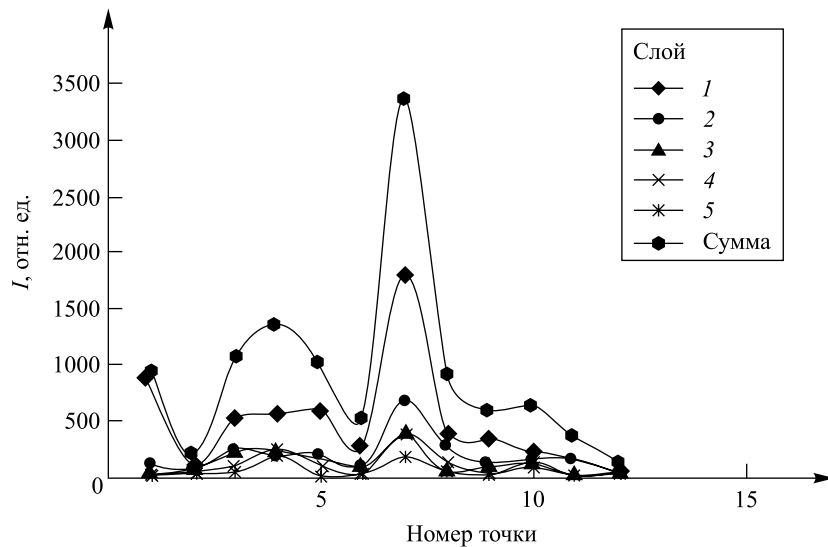


Рис. 2. Послойное распределение Са (интенсивности (I) линии) в высушенных каплях плазмы крови здорового человека (ж, з) (окончание)

Пациент 1

а

Ca, горизонталь



б

Ca, вертикаль

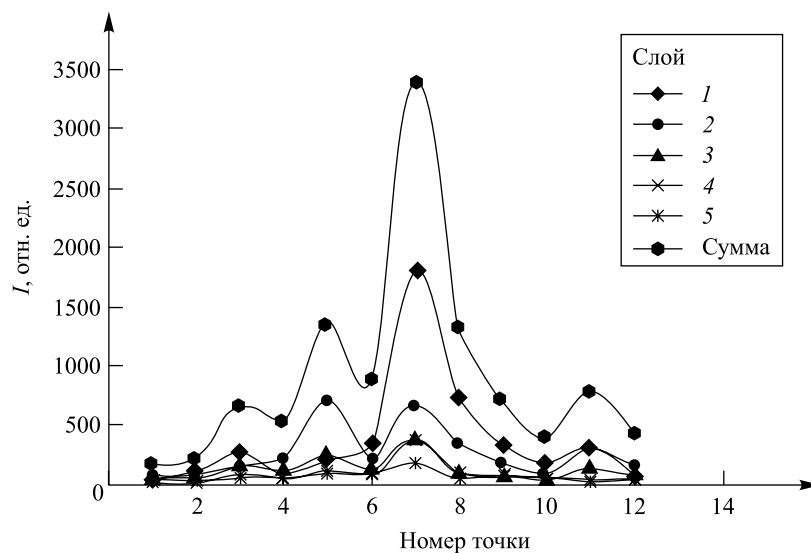
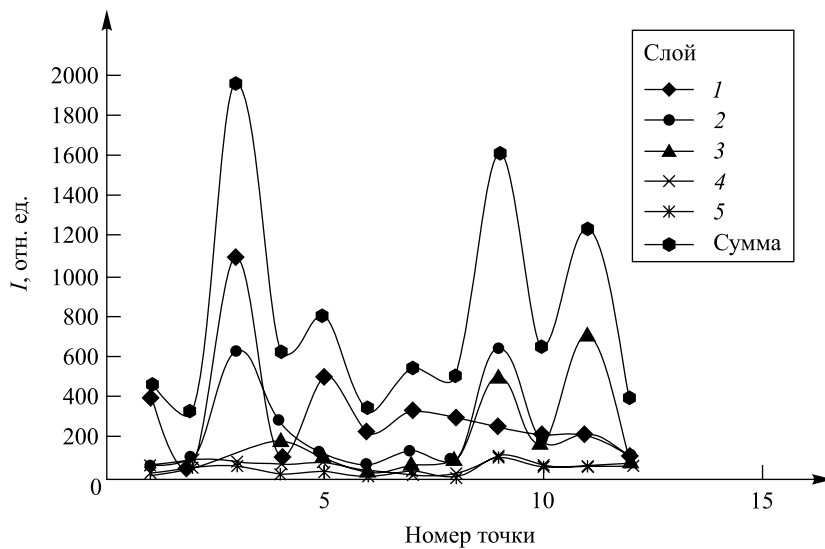


Рис. 3. Послойное распределение Ca (интенсивности I линии) в образцах высохших капель плазмы крови пациента после операции (а, б) (начало)

Пациент 2

в

Са, горизонталь



з

Са, вертикаль

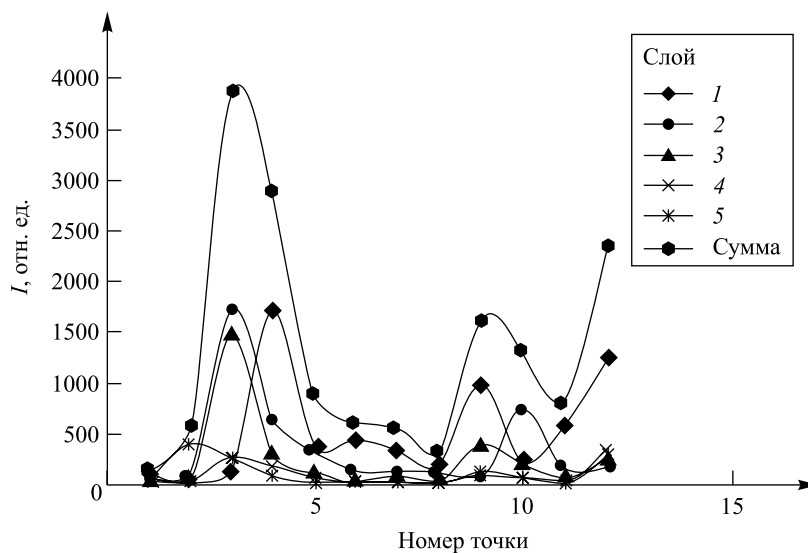
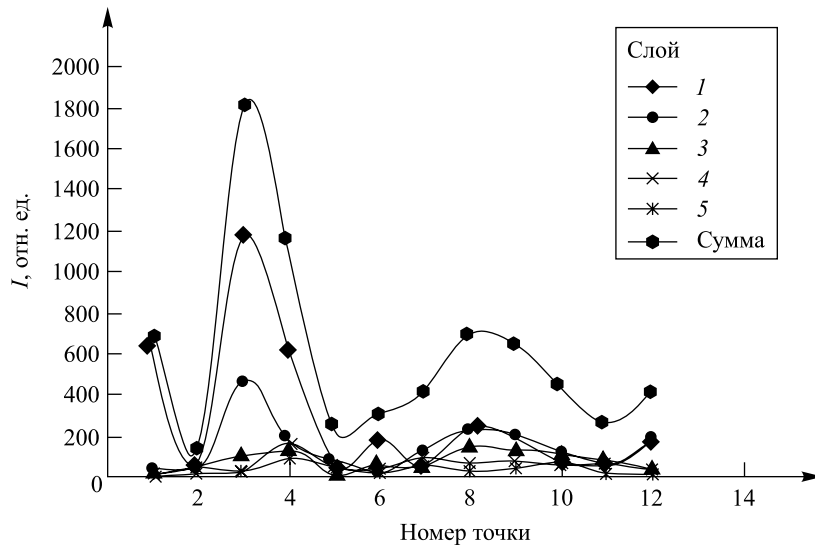


Рис. 3. Послойное распределение Са (интенсивности I линии) в образцах высохших капель плазмы крови пациента после операции (в, з) (продолжение)

Пациент 3

д

Ca, горизонталь



е

Ca, вертикаль

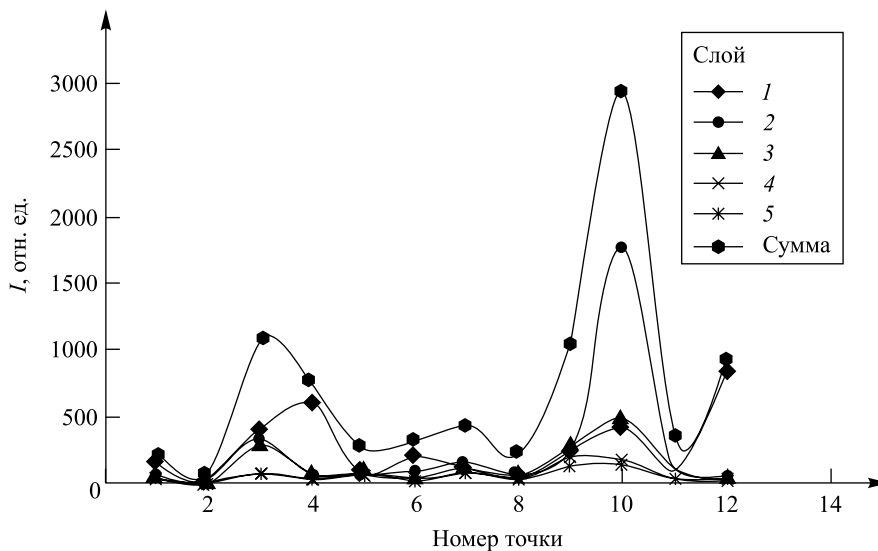


Рис. 3. Послойное распределение Ca (интенсивности I линии) в образцах высохших капель плазмы крови пациента после операции (д, е) (окончание)

Данные морфоструктурного анализа высыхающей капли БЖ, определяющие различия образующихся структур в процессе высыхания капли, оценка пространственного распределения жизненно необходимых элементов в высохшей капле позволяют выявлять серьезные заболевания, уточнять диагноз, поскольку междисциплинарный подход порой единственный возможный путь, позволяющий добиться успеха.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Аляев Ю. Г., Безруков Е. А., Шестиперов П. А. Молекулярная патология рака предстательной железы: диагностическая и прогностическая значимость основных маркеров // Онкоурология. 2006. № 2. С. 45–50 [Alyayev Y. G., Bezrukov E. A., Shestiperov P. A. Molecular pathology of prostate carcinoma: diagnostic and prognostic significance of the main markers. *Onkourologiya = Cancer Urology*. 2006. No. 2. P. 45–50 (in Russ.)].
2. Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics // *CA: Cancer J. Clin.* 2011. Vol. 61, No. 2. P. 69–90 [Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *CA: Cancer J. Clin.* 2011. Vol. 61, No. 2. P. 69–90 (in Engl.)].
3. Jemal A., Tiwari R. C., Murray T., Ghafoor A., Samuels A., Ward E., Feuer E. J., Thun M. J. Cancer statistics // *CA: Cancer J. Clin.* 2004. Vol. 54, No. 1. P. 8–29 [Jemal A., Tiwari R. C., Murray T., Ghafoor A., Samuels A., Ward E., Feuer E. J., Thun M. J. Cancer statistics. *CA: Cancer J. Clin.* 2004. Vol. 54, No. 1. P. 8–29 (in Engl.)].
4. Lein M., Kwiatkowski M., Semjonow A., Luboldt H. J., Hammerer P., Stephan C., Klevecka V., Taymoorian K., Schnorr D., Recker F., Loening S. A., Jung K. A multicenter clinical trial on the use of complexed prostate specific antigen in low prostate specific antigen concentrations // *J. Urol.* 2003. Vol. 170, No. 4. P. 1175–1179 [Lein M., Kwiatkowski M., Semjonow A., Luboldt H. J., Hammerer P., Stephan C., Klevecka V., Taymoorian K., Schnorr D., Recker F., Loening S. A., Jung K. A multicenter clinical trial on the use of complexed prostate specific antigen in low prostate specific antigen concentrations. *J. Urol.* 2003. Vol. 170, No. 4. P. 1175–1179 (in Engl.)].
5. Lokhov P. G., Trifonova O. P., Maslov D. L., Archakov A. I. Blood plasma metabolites and the risk of developing lung cancer in Russia // *Eur. J. Cancer Prev.* 2013. Vol. 22, No. 4. P. 335–341 [Lokhov P. G., Trifonova O. P., Maslov D. L., Archakov A. I. Blood plasma metabolites and the risk of developing lung cancer in Russia. *Eur. J. Cancer Prev.* 2013. Vol. 22, No. 4. P. 335–341 (in Engl.)].
6. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н. Морфология биологических жидкостей человека. М., 2001.
7. Максимов С. А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине // *Бюл. сибир. медицины*. 2007. № 4. С. 80–85 [Maximov S. A. Morphology of the solid state of biological fluids as a diagnostic method in medicine. *Bulleten' sibirskoi meditsiny = Bull. Sib. Med.* 2007. No. 4. P. 80–85 (in Russ.)].
8. Краевой С. А., Колтовой Н. А. Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей : в 4 кн. 2013. Кн. 1 : Открытая капля. С. 67–71.
9. Чинь Нгок Хоанг, Пашковская И. Д., Булойчик Ж. И., Зажогин А. П. Исследование пространственного распределения Al, Ca, Mg, Zn в высушенных каплях белков с помощью лазерной атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии // *Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика*. 2012. № 1. С. 31–34 [Trinh Ngoc Hoang, Pashkovskaya I. D., Buloichik J. I., Zajogin A. P. Investigation into the spatial distribution of Al, Ca, Mg, Zn in dried drops of proteins using atomic-emission multichannel laser spectrometry. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2012. No. 1. P. 31–34 (in Russ.)].
10. Булойчик Ж. И., Веремчук А. Н., Русско Т. А., Маслова Г. Т., Мавричев А. С. Морфологическое и спектрометрическое изучение образцов высохших капель крови онкологических больных // *Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика*. 2015. № 2. С. 24–30 [Buloichik J. I., Veremchuk A. N., Russko T. A., Maslova G. T., Mavrichev A. S. Morphological and spectrometric studies of the dried blood-drop samples of oncological patients. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2015. No. 2. P. 24–30 (in Russ.)].

Статья поступила в редколлегию 30.05.2016.
Received by editorial board 30.05.2016.