

ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ ДИФFUЗНОЙ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ

Маргарита Витальевна Кручинина

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Института цитологии и генетики СО РАН, 630089, Россия, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, тел. (913)728-17-02, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Владимир Николаевич Кручинин

Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН, 630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 13, кандидат химических наук, научный сотрудник, тел. (913)951-39-31, e-mail: vladd.kruch@yandex.ru

Сергей Евгеньевич Пельтек

Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, доктор биологических наук, зав. лабораторией, тел. (913)910-30-10, e-mail: peltek@bionet.nsc.ru

Владимир Алексеевич Володин

Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН, 630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 13, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, тел. (913)753-54-05, e-mail: volodin@isp.nsc.ru

Сергей Владимирович Рыхлицкий

Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН, 630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 13, кандидат химических наук, зав. лабораторией, тел. (913)916-45-26, e-mail: rhl@isp.nsc.ru

Геннадий Владимирович Шувалов

Сибирский государственный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт метрологии, 630004, Россия, г. Новосибирск, пр. Димитрова, 4, кандидат технических наук, директор, тел. (913)939-24-82, e-mail: shuvalov@sniim.ru

Игорь Владиленович Минин

Сибирский государственный университет геосистем и технологий, 630108, Россия, г. Новосибирск, ул. Плеханова, 10, доктор технических наук, старший научный сотрудник, профессор кафедры специальных устройств, инноватики и метрологии, тел. (913)396-51-34, e-mail: prof.minin@gmail.com

Олег Владиленович Минин

Сибирский государственный университет геосистем и технологий, 630108, Россия, г. Новосибирск, ул. Плеханова, 10, доктор технических наук, старший научный сотрудник, профессор кафедры специальных устройств, инноватики и метрологии, тел. (913)396-51-34, e-mail: oleg.minin@ngs.ru

При помощи оптических методов: эллисометрии, ИК-спектроскопии и Раман-спектроскопии исследованы тонкие пленки, полученные центрифугированием из сывороток кро-

ви здоровых людей и больных фиброзом печени различных стадий (легкий и выраженный). Показано, что величины показателя преломления, формы ИК и Раман-спектров пленок у лиц указанных групп достоверно различны, что может быть следствием глубоких метаболических изменений, ассоциированных с развитием патологии. Данный факт позволяет существенно повысить показатели чувствительности, специфичности, индекс точности, а также достичь реальных результатов в диагностике не только выраженных стадий фиброза, но и получить возможность выявлять легкий невыраженный фиброз печени. Это перспективно в скрининговом малоинвазивном определении стадий заболевания при диффузной патологии печени различного генеза.

Ключевые слова: диффузная патология печени, сыворотка крови, тонкие пленки, эллипсометрия, ИК-спектроскопия, Раман-спектроскопия.

POSSIBILITIES OF OPTICAL METHODS FOR STUDYING THE BLOOD SERUM IN THE DIAGNOSTICS OF LIVER DIFFUSE PATHOLOGY

Margarita V. Kruchinina

Research Institute of Therapy and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 175/1, Boris Bogatkova St., Novosibirsk, 630089, Russia, D. Sc., Leading Researcher, phone: (913)728-17-02, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Vladimir N. Kruchinin

Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, 13, Prospect Akademik Lavrentiev St., Novosibirsk, 630090, Russia, Ph. D., Researcher, phone: (913)951-39-31, e-mail: vladd.kruch@yandex.ru

Sergey V. Peltek

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 10, Prospect Akademik Lavrentiev St., Novosibirsk, 630090, Russia, D. Sc., Head of Laboratory, phone: (913)910-30-10, e-mail: peltek@bionet.nsc.ru

Vladimir A. Volodin

Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, 13, Prospect Akademik Lavrentiev St., Novosibirsk, 630090, Russia, D. Sc., Leading Researcher, phone: (913)753-54-05, e-mail: volodin@isp.nsc.ru

Sergey V. Rykhlytskiy

Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, 13, Prospect Akademik Lavrentiev St., Novosibirsk, 630090, Russia, Ph. D., Head of Laboratory, phone: (913)916-45-26, e-mail: rhl@isp.nsc.ru

Gennadiy V. Shuvalov

Siberian State Order of the Red Banner of Labor Research Institute of Metrology, 4, Prospect Dimitrov St., Novosibirsk, 630004, Russia, Ph. D., Director, phone: (913)939-24-82, e-mail: shuvalov@sniim.ru

Igor V. Minin

Siberian State University of Geosystems and Technologies, 10, Plakhotnogo St., Novosibirsk, 630108, Russia, D. Sc., Senior Researcher, Professor, Department of Special-Purpose Devices, Innovatics and Metrology, phone: (913)396-51-34, e-mail: prof.minin@gmail.com

Oleg V. Minin

Siberian State University of Geosystems and Technologies, 10, Plakhotnogo St., Novosibirsk, 630108, Russia, D. Sc., Senior Researcher, Professor, Department of Special-Purpose Devices, Innovatics and Metrology, phone: (913)396-51-34, e-mail: oleg.minin@ngs.ru

Using optical methods: ellipsometry, IR spectroscopy and Raman spectroscopy, thin films obtained by centrifugation from blood sera of healthy people and patients with liver fibrosis of various stages (light and pronounced) were investigated. It is shown that the values of refractive index, shape of IR and Raman spectra of films of individuals of these groups are significantly different, which may be due to profound changes in the metabolism in the body with the development of pathology. This fact can significantly increase the sensitivity, specificity, accuracy index, as well as achieve real results in the diagnosis of not only pronounced stages of fibrosis, but also provides an opportunity to detect mild unexpressed fibrosis of a liver. This is promising in the screening minimally invasive determination of the stages of the disease in diffuse pathologies of the liver of various genesis.

Key words: liver diffuse pathology, blood serum, thin films, ellipsometry, IR spectroscopy, Raman spectroscopy.

Введение

Определение стадии заболевания при фиброзе печени является важным вопросом, поскольку именно это определяет прогноз и дальнейшую тактику терапии [1]. Наряду с «золотым стандартом» – биопсией к настоящему времени предложено много методов определения степени фиброза печени (биохимический, макроморфологический, полуколичественные и др.) [1, 2], которые, наряду с преимуществами имеют ряд недостатков: инвазивность, сложная пробоподготовка, высокая стоимость реактивов, оборудования, недостаточная чувствительность, специфичность.

Оптические методы исследования форменных элементов и сыворотки крови обладают рядом достоинств, важных для исследования биологических объектов. Это, прежде всего, высокая чувствительность как при измерении низких концентраций биоорганических соединений в растворах, так и при нанесении этих растворов на твердые подложки. Во-вторых, неразрушающий характер воздействия на биообъекты, многие из которых обладают сложной структурой. В-третьих, высокая оперативность измерений, которые не требуют создания особых условий (высокого вакуума, нагрева или охлаждения исследуемого образца, специальных ионизирующих излучений, использования флуоресцентных меток и др.).

Цель данной работы – оценить возможности оптических методов исследования эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с диффузной патологией печени с различной степенью фиброза для использования в ранней диагностике.

Методы и материалы

Группы обследуемых. Обследованы 62 мужчины в возрасте от 38 до 69 лет с диффузной патологией печени, подписавших информированное согласие на участие в исследованиях. Группу сравнения составили 21 человек в возрасте от 35 до 60 лет, у которых по данным биохимических и инструментальных методов исследования не было выявлено клинически манифестирующих хрониче-

ских заболеваний внутренних органов и у которых оцениваемые биохимические и гематологические показатели крови были в нормальных пределах.

Степень выраженности фиброза печени устанавливалась на основании данных биопсии печени и макроморфологических методов визуализации (УЗИ, КТ, ЯМРТ). Всем обследованным выполнены биохимические и инструментальные исследования, УЗИ печени, селезенки, а также портальных сосудов.

По результатам совокупного анализа сформированы три группы по степени выраженности фиброза печени. Первую группу составили обследуемые группы сравнения (21 человек) без признаков фиброза печени (F0). Вторая группа включала 39 пациентов с первой или второй степенью фиброза (легкий невыраженный фиброз – F1-F2). В третью группу входили 23 пациента с третьей или четвертой степенью фиброза (выраженный фиброз – F3-F4).

Обследование выполнено с одобрения Комитета Биомедицинской Этики НИИ терапии СО РАМН. Все обследуемые заполняли стандартные анкеты: 1) информированное согласие пациента на участие в обследовании; 2) стандартную анкету о потреблении алкоголя.

Приготовление тонких пленок из сыворотки крови. Для получения пленок в настоящей работе использовался метод центрифугирования [3, 4]. Подробно получение и оценка качества пленок описаны в работе [5]. Образцы свежей сыворотки крови (~0,1 мл) наносились на центральную часть предварительно отмытых в перекисно-аммиачном травителе кремниевых пластин Si(111) КДБ-10 диаметром 76 мм при комнатной температуре. Скорость вращения составляла 2500 об./мин., время вращения – 10 сек. Перед проведением эллипсометрических измерений пленки в течение 2-х часов сушились при комнатной температуре на воздухе. Всем обследуемым были проведены эллипсометрические исследования пленок из сыворотки крови методами спектральной и отображающей эллипсометрии.

Эллипсометрическое исследование пленок из сыворотки крови. Эллипсометрические спектры $\psi(\lambda)$ и $\Delta\lambda$ измерялись с помощью спектрального эллипсометрического комплекса «ЭЛЛИПС-1771», (ИФП СО РАН) [6] в диапазоне длин волн $\lambda = 250-1\ 000$ нм, спектральное разрешение прибора составляло 2 нм, время записи одного спектра не превышало 20 с, угол падения луча света на образец составлял 70° . Использовалась четырехзонная методика измерений с последующим усреднением по всем четырем зонам. Расчет дисперсионных зависимостей показателя преломления $n(\lambda)$ и значений толщин пленок проводился решением обратной задачи эллипсометрии с использованием оптической модели: подложка – пленка-среда. Оценивались следующие экспериментальные характеристики пленок: значения эффективной толщины (d) и дисперсия показателя преломления $n(\lambda)$ [5].

Для исследования однородности покрытия пластины с имеющимися на поверхности пленками из сывороток крови были измерены на сканирующем эллипсометре высокого разрешения «Микроскан» (ИФП СО РАН). Считывание эллипсометрических углов ψ и Δ осуществлялось на центральных областях

пластин (диаметр 76 мм) с размерами $15 \times 15 \text{ мм}^2$ с шагом по осям «х» и «у» 0,1 мм. Угол падения луча света на образец составлял 60° .

ИК-Фурье спектроскопия. Запись ИК спектров проводилась на ИК-Фурье-спектрометре *Bruker Vector 22* в диапазоне длин волн $400\text{--}7\ 000 \text{ см}^{-1}$ с разрешением 2 см^{-1} . Для удаления колебаний, связанных с многолучевой интерференцией и линий поглощения паров воды и углекислого газа использовалась программа OPUS 6.0.

Raman-спектроскопия. Спектры комбинационного рассеяния света жидких сывороток крови пациентов записывались с помощью спектрометра с тройным монохроматором *T64000 (Horiba Jobin Yvon)* при комнатной температуре. Для возбуждения использовалась линия Ar^+ лазера с длиной волны 514,5 нм, спектральное разрешение составляло $1,5 \text{ см}^{-1}$. В качестве детектора использовалась кремниевая матрица фотоприемников, охлаждаемая жидким азотом. Применялась приставка для микроскопических исследований комбинационного рассеяния света. Мощность лазерного пучка, доходящего до образца, составляла 2–3 мВт (размер пятна 5–6 мкм).

Для компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ *CELLFIND*.

Статистическая обработка результатов измерений. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы *SPSS, ver.10*. Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона (при нормальном распределении), в случаях отклонения распределения от нормального использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна – Уитни, Колмогорова – Смирнова).

Результаты и обсуждение

Эллипсометрические измерения тонких пленок, полученных из сывороток крови пациентов с разными степенями фиброза печени, позволили установить факт достоверного увеличения показателя преломления в сочетании со снижением толщины пленки по мере нарастания фиброза ($\lambda = 632,8 \text{ нм}$) F1–F2: $n = 1,54 \pm 0,02$, $d = 161,2 \pm 2,7$; F3–F4: $n = 1,55 \pm 0,03$, $d = 137,9 \pm 3,2$ ($p < 0,001\text{--}0,002$).

Подобные изменения могут быть связаны со снижением синтеза целого ряда соединений в печени (в том числе, белков сыворотки крови, факторов свертывания, холестерина, триглицеридов и др.) при выраженном фиброзе, которые являются определяющими для толщины пленки. Преобладание неравномерных пленок при выраженном фиброзе, очевидно, связано с выраженностью биохимического дисбаланса в сыворотке крови при циррозе печени. Показатель преломления определяется в большей степени компонентами синдромов цитолиза и холестаза, степень выраженности которых усиливается при продвинутом фиброзе [2].

Исследование однородности поверхности пленок, полученных из сывороток крови, с помощью сканирующего эллипсометра высокого разрешения

«Микроскан» показало, пленки больных с фиброзом печени F3–F4 очень неравномерны по толщине, имеют большие разрывы по сравнению с таковыми у пациентов с F1–F2 ($p < 0,05$) и лицами контрольной группы (рис. 1).

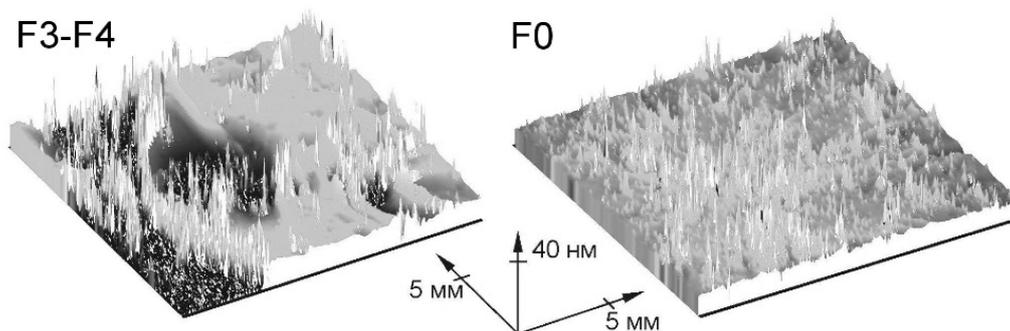


Рис. 1. Сканы толщины пленок из сывороток крови лиц контрольной группы (F0) и больных с выраженным фиброзом печени (F3–F4)

При анализе ИК-спектров пленок из сывороток крови особое внимание уделялось анализу амидных групп amide I, amide II, amide III, которые связаны с поглощением ИК-излучения фрагментами $O=C-N-H$, чувствительными к вторичной структуре белковых молекул (α -helix, β -sheet, random coil), так как изменение вторичной структуры белковых молекул определяется наличием патологических процессов в организме, в том числе и при диффузной патологии печени при различной степени фиброза.

В ИК-спектрах у пациентов с выраженным фиброзом печени F3–F4 достоверно выше, чем в группе пациентов с F1–F2 оказались пики группы amide III – при $1\,280\text{ см}^{-1}$ в диапазоне спектра основных амидных полос поглощения и пик при $3\,190\text{ см}^{-1}$, отражающий колебания связи $N-H$ различных структур, а также достоверно чаще наличие белковых молекул со вторичной структурой в виде спирали (α -helix) ($p < 0,001-0,05$) (рис. 2).

Напротив, у пациентов со степенью фиброза F3–F4 достоверно ниже, чем в группе F1–F2, были пики при 776 , 818 , 889 см^{-1} и 966 см^{-1} , характерные для валентных колебаний связей $C-C$, $C-O$ дезоксирибоз и фрагмента PO_4^- молекул нуклеиновых кислот и протеинов [7] ($p < 0,02-0,05$). Достоверное снижение при выраженном фиброзе продемонстрировал также ряд пиков при $1\,399\text{ см}^{-1}$, отражающий симметричные валентные колебания групп CH_3 скелетных фрагментов молекул белков; при $1\,450\text{ см}^{-1}$, отражающий деформационные колебания групп CH_3 липидов и белков; при $1\,570\text{ см}^{-1}$ (amide II); $1\,581$, $1\,620\text{ см}^{-1}$ (карбонильные структуры) ($p < 0,01-0,05$). Значимое снижение компоненты при $1\,635\text{ см}^{-1}$, выявляющейся при разложении сложных амидных пиков, у пациентов с фиброзом печени F3–F4 связывают со снижением количества белковых молекул со структурой в виде складчатого листа (β -sheet) ($p < 0,05$).

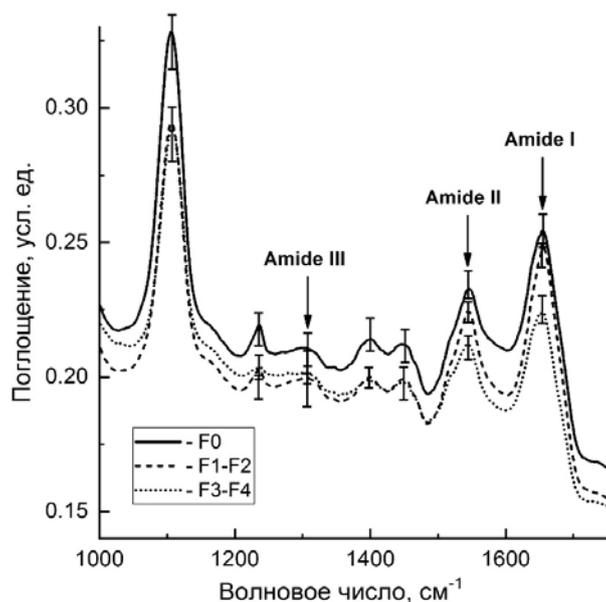


Рис. 2. ИК-спектры пленок из сывороток крови лиц контрольной группы (F0) и больных с фиброзом печени разных стадий (F1–F2, F3–F4)

В спектрах комбинационного рассеяния света образцов жидких сывороток крови в области $750\text{--}1\,750\text{ см}^{-1}$ наблюдались три характерных пика поглощения: при $1\,005$, $1\,157$ и $1\,520\text{ см}^{-1}$, интенсивности которых оказались достоверно ниже при наличии выраженного фиброза F3–F4 по сравнению легким F1–F2 ($p < 0,0058\text{--}0,02$) (рис. 3).

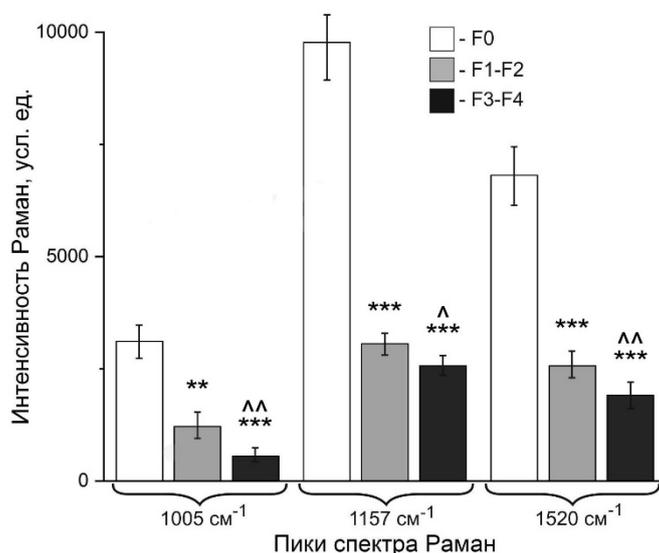


Рис. 3. Интенсивность пиков в группах пиков Раман-спектров пленок из сывороток крови лиц контрольной группы F0 и больных с фиброзом печени стадий: F1–F2 – легкий, F3–F4 – выраженный:

достоверность различий: от F0: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$; *** – $p < 0,0001$; от F1–F2: ^ – $p < 0,05$; ^^ – $p < 0,01$

О природе происхождения этих пиков в литературе к настоящему времени нет единого мнения, однако, в большинстве работ они приписываются каротинам. Так, в работах [8, 9] показано, что у онкологических больных снижено содержание каротина в сыворотке крови, что приводит к резкому уменьшению интенсивности сигналов при 1 005, 1 157 и 1 520 см⁻¹ в Raman-спектрах. В случае диффузной патологии печени, исследуемой в данной работе, можно предположить, что снижение площадей вышеуказанных пиков при выраженном фиброзе связано со значительными сдвигами в обмене каротинов, переходе их в витамин А, что тесно связано с состоянием функции печени [1, 2].

Результаты оценки совокупности оптических методов исследования эритроцитов и сыворотки крови пациентов с диффузной патологией печени для выявления стадии фиброза по сравнению с данными биопсии печени («золотого стандарта» для оценки стадии фиброза) представлены в таблице.

Результаты оценки «панели оптических методов» для выявления степени фиброза печени по сравнению с данными биопсии

Результаты оптических методов исследования	Результаты биопсии печени	
	Группа F3–F4 <i>n</i> = 14 случаев	Группа F1–F2 <i>n</i> = 7 случаев
Группа F3–F4 <i>n</i> = 12 случаев	Истинно положительный Группа F3–F4 <i>n</i> = 11	Ложно положительный Группа F1–F2 <i>n</i> = 1
Группа F1–F2 <i>n</i> = 9 случаев	Ложно отрицательный Группа F3–F4 <i>n</i> = 3	Истинно легкий фиброз Группа F1–F2 <i>n</i> = 6

Чувствительность	$11 : (11 + 3) \times 100 \% = 78,6 \%$;
Специфичность	$6 : (1 + 6) \times 100 \% = 87,7 \%$;
Прогностическая ценность «+» результата метода	$11 : (11 + 1) \times 100 \% = 91,7 \%$;
Прогностическая ценность «-» результата метода	$6 : (3 + 6) \times 100 \% = 66,7 \%$;
Индекс точности	$(11 + 6) / (11 + 1 + 3 + 6) \times 100 \% = 81 \%$

Они демонстрируют достаточно высокие значения чувствительности (78,6 %) и специфичности (87,7 %), прогностической ценности положительного (91,7 %) и отрицательного результата (66,7 %), а также индекса точности (81 %) [4]. Возросшие уровни данных значений по сравнению с изолированным исследованием эритроцитов дают возможность предположить необходимость использования «панели оптических методов» исследования крови для неинвазивной диагностики степени фиброза печени. Особенно важны перспективы в определении ранних стадий фиброза печени (по данным прогностической ценности «-» результата).

Заключение

Таким образом, использование совокупности «панели оптических методов» для исследования сыворотки крови пациентов с диффузной патологией печени позволяет существенно повысить показатели чувствительности, специфичности, индекс точности, а также достичь реальных результатов в диагностике не только выраженных стадий фиброза, но, что особенно важно, получить возможность выявлять легкий невыраженный фиброз печени.

Выявленные возможности оптических методов являются весьма перспективными в скрининговом неинвазивном определении стадий заболевания при диффузной патологии печени различного генеза.

Работа выполнена в рамках темы «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению» ГЗ № 0324-2018-0001, Рег. № АААА-А17-117112850280-2, опытно-конструкторской работы (шифр «Эритроциты»).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ивашкин В. Т., Лапина Т. Л. Гастроэнтерология. Национальное руководство. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 700 с.
2. Подымова С. Д. Болезни печени. – М. : Медицина, 1993. – 544 с.
3. Dimitriev Y., Ivanova Y., Iordanova R. History of sol-gel science and technology (review) // Journal of the University of Chemical technology and Metallurgy. – 2008. – V. 43. – No. 2. – P. 181–192.
4. Vorotilov K., Petrovsky V., Vasiljev V. Spin coating process of sol-gel silicate films deposition: effect of spin speed and processing temperature // Journal of Sol-Gel Science and Technology. – 1995. – V. 5. – P. 173–183.
5. Воевода М. И., Пельтек С. Е., Кручинина М. В., Курилович С. А., Кручинин В. Н., Могильников К. П., Рыхлицкий С. В. Исследование тонких пленок, полученных центрифугированием сыворотки крови человека, методами спектральной эллипсометрии и ИК-спектроскопии // Автометрия. – 2010. – Т. 46. – № 4. – С. 106–120.
6. Кручинина М. В. Структурно-функциональные свойства эритроцитов при соматической патологии алкогольного генеза : автореф. дис ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 1994. – 26 с.
7. Козинец Г. И., Макаров В. А. Исследование системы крови в клинической практике. – М. : Триада-Х, 1997. – 480 с.
8. Manoharan R., Wang Y., Feld M. S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy // Spectrochimica Acta Part A. – 1996. – V. 52. – P. 215–249.
9. Schut T. C. B., Puppels G. J., Kraan Y. M., Greve J., van der Maas L. L. J., Figdor C. G. Intracellular carotenoid levels measured by Raman microspectroscopy: comparison of lymphocytes from lung cancer patients and healthy individuals // Int. J. Cancer (Pred. Oncol.). – 1997. – V. 74. – P. 20–25.

© М. В. Кручинина, С. Е. Пельтек, В. А. Володин, С. В. Рыхлицкий,
Г. В. Шувалов, И. В. Минин, О. В. Минин, 2019