

коронавирусной инфекции COVID-19» - ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет МЗ РФ- 04.2020

5. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 7 (03.06.2020).

6. Гончарова Е.В., Донников А.Е., Кадочникова В.В., Морозова С.А., Болдырева М.Н., Галкина И.С., Блинов Д.В. - Диагностика вируса, вызывающего COVID-19, методом ПЦР в реальном времени – Фармакоэкономика – 2020 - № 1 – с.52-63

METHODS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF A NEW CORONAVIRUS INFECTION

Romanova M. A.

Regional clinical hospital, Vladimir

Key words: coronavirus, infection, laboratory diagnostic, methods.

Annotation. This article provides an overview of laboratory methods for detecting a new coronavirus infection. Their specific properties, features and application possibilities for diagnostics of coronavirus-19 are considered.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕВИТОЙ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ МЫШЕЙ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И ДИФFUЗНО-ОТРАЖАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

¹Кандурова К.Ю., ¹Потапова Е.В., ¹Шуплецов В.В., ¹Серёгина Е.С., ^{1,2}Дрёмин В.В., ^{1,3}Жеребцов Е.А.,
⁴Алексеев А.Г., ^{1,5}Мамошин А.В., ¹Дунаев А.В.

¹ Научно-технологический центр биомедицинской фотоники, ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орел, *kandkseniya@gmail.com,

² Aston Institute of Photonic Technologies, Aston University, Birmingham, UK,

³ Optoelectronics and Measurement Techniques Unit, University of Oulu, Oulu,

⁴ Медицинский институт, ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орел,

⁵ БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница», г. Орел

Ключевые слова: оптическая биопсия, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия диффузного отражения, гепатоцеллюлярная карцинома

Аннотация. В статье описаны результаты экспериментальных исследований с использованием специально разработанной системы для оптической биопсии, предназначенной для диагностики *in vivo* при пункционной биопсии диффузных и очаговых новообразований печени. Экспериментальные исследования проводились на лабораторных мышцах с перевитыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы. Используемыми оптическими методами являлись флуоресцентная и диффузно-отражательная спектроскопия. Полученные результаты демонстрируют количественные различия максимальной интенсивности флуоресценции и формы спектров диффузного отражения здоровых и злокачественных тканей, свидетельствующие о наличии метаболических и морфологических изменений. Разработанный многопараметрический подход представляется перспективным для дальнейшего развития, апробации и внедрения в клиническую практику.

Рак печени занимает четвертое место в структуре смертности от онкозаболеваний. Первичные опухоли печени возникают как из гепатоцитов (гепатоцеллюлярный рак), так и из клеток внутрипеченочных желчных протоков (холангиоцеллюлярный рак). Большая часть диагностированных опухолей не являются первичными, а представляют собой метастазы из очагов, расположенных в других частях тела (поджелудочная железа, толстая кишка, желудок, грудь и др.) [1]. Новые подходы к более ранней и точной диагностике рака печени могут положительно сказаться на результатах лечения и прогнозе при данной патологии.

Решение вопросов о показаниях и противопоказаниях к оперативному лечению и его объему в основном зависит от гистологической структуры и распространенности опухолевого процесса. В связи с этим значительно возрастает роль пункционной биопсии (ПБ) для предоперационной верификации объемных образований печени [2]. Во время ПБ игла для биопсии вводится в новообразование под контролем таких методов визуализации, как ультразвуковое исследование, компьютерная или магнитно-резонансная томография. ПБ является миниинвазивной атравматичной процедурой, однако получение результата гистологического исследования занимает 5-10 дней и требует наличия компетентного врача-патоморфолога, в то время как хирурги заинтересованы в скорейшем получении информации о характере изменений в патологическом очаге и состоянии тканей пораженного органа для определения тактики дальнейшего лечения. При выполнении ПБ высоки риски получения неинформативного материала и ложноотрицательных результатов исследования из-за произвольных движений пациента, несовершенства методов визуализации, используемых для локализации опухоли во время введения иглы, неоднородности самой опухоли и др. Указанные факторы обеспечивают уровень получения неинформативных проб, достигающий 29% [3,4]. Отрицательные и неинформативные результаты морфологического исследования биоптата обуславливают

необходимость повторного выполнения ПБ, что приводит к затягиванию обследования пациента во времени, отсрочке начала специализированного лечения, а также требует дополнительного финансирования.

Одним из возможных решений повышения качества диагностики рака печени является использование методов оптической биопсии, которые не требуют изъятия образца ткани из области исследования и ожидания результатов в течение нескольких дней. В частности, использование методов спектроскопии позволяет не только получить информацию о различных параметрах метаболизма и морфологии биологических тканей *in vivo* в режиме реального времени, но и повысить точность выбора области забора образца ткани биопсийной иглой.

Среди оптических методов, используемых для изучения метаболической активности клеток в норме и патологии, можно выделить флуоресцентную спектроскопию (ФС). Этот метод основан на возбуждении флуоресценции в биологической ткани под действием ультрафиолетового или видимого излучения, регистрации полученного спектра, сравнении его формы и интенсивности между здоровыми и патологически изменёнными тканями. ФС позволяет обнаруживать метаболические сдвиги, выражающиеся в изменениях содержания определенных флуорофоров. Важными коферментами, определяющими энергетический метаболизм клеток, являются никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), обладающие спектрами аутофлуоресценции, изменения в которых, можно регистрировать *in vivo* [5]. НАД и ФАД участвуют в синтезе аденозинтрифосфата, обеспечивающего энергией другие биохимические реакции. Оба кофермента подвергаются окислительно-восстановительным реакциям, в результате которых восстановленная форма НАД (НАДН) и окисленная форма ФАД вносят наибольший вклад в спектр флуоресценции ткани. Изменения интенсивности флуоресценции НАДН и ФАД, а также их соотношение, связаны с возникновением и развитием патологических процессов, в том числе онкологических [6].

Другим широко используемым оптическим методом диагностики является спектроскопия диффузного отражения (СДО). СДО используется для оценки архитектурных изменений на клеточном и внутриклеточном уровнях путем анализа поглощения света различными хромофорами ткани. В частности, этот метод чувствителен к содержанию крови в тканях и степени её насыщения кислородом. Недостаток кислорода в крови влияет на обменные процессы, что также отражается на интенсивности флуоресценции. Данные, полученные с использованием метода СДО, можно использовать для компенсации влияния поглощения света на спектры флуоресценции при высоком кровенаполнении [7].

Совместное применение нескольких диагностических методов в одном инструменте представляется перспективным подходом для получения комплексной разносторонней диагностической информации о взаимосвязанных параметрах состояния тканей. Распространённым направлением является сочетание метода СДО именно с ФС, т.к. нарушения кровенаполнения и степени насыщения крови кислородом сопровождаются метаболическими нарушениями [8]. Такой многопараметрический подход используется для диагностических целей, в том числе в онкологии [9,10].

Разработка технологий многопараметрической оптической биопсии для выявления злокачественных новообразований требует предварительного проведения надежных и воспроизводимых оптических измерений параметров нормальных и патологически изменённых тканей. Для дальнейшего внедрения спектроскопических технологий в клиническую практику их можно протестировать с использованием оптических фантомов и тест-объектов [11], клеточных культур и срезов тканей [12], а также проводя измерения на лабораторных животных. В данном исследовании для тестирования ранее разработанных методологии и устройства оптической биопсии были выбраны измерения на смоделированном раке печени у лабораторных мышей.

Таким образом, целью работы являлось изучение возможности проведения оптической диагностики рака печени *in vivo* с использованием специально разработанной системы оптической биопсии во время процедуры ТПАБ у лабораторных животных с привитой опухолью печени.

Измерения проводились с использованием устройства оптической биопсии [13], включающего в себя измерительные каналы ФС и СДО (рис. 1). Для возбуждения аутофлуоресценции НАДН и ФАД в качестве источников излучения использовались светодиод с длиной волны 365 нм и лазерный диод 450 нм. Для регистрации спектров флуоресценции и диффузного отражения в диапазоне 350-1000 нм использовался ПЗС-спектрометр. Фильтры с длинами волн среза 400 нм и 495 нм использовались перед спектрометром для ослабления обратного рассеянного излучения от источников при регистрации спектров флуоресценции. В канале СДО в качестве источника использовалась широкополосная (360-2400 нм) вольфрамовая галогенная лампа.

Доставка излучения от источников к ткани и сбор вторичного оптического излучения от ткани к спектрометру осуществлялись с использованием специально разработанного тонкоигольного оптического зонда диаметром 1 мм, совместимого со стандартной тонкой иглой 17,5G. Зонд содержит 10 оптических волокон с числовой апертурой 0,22. Центральное волокно (200 мкм) используется для сбора излучения и передачи его на спектрометр. 9 волокон (100 мкм), расположенных вокруг центрального (по 3 волокна для каждого источника), обеспечивают освещение области исследования во время измерений. Конец волоконного зонда имеет скос 20° для обеспечения плотного контакта с тканями.

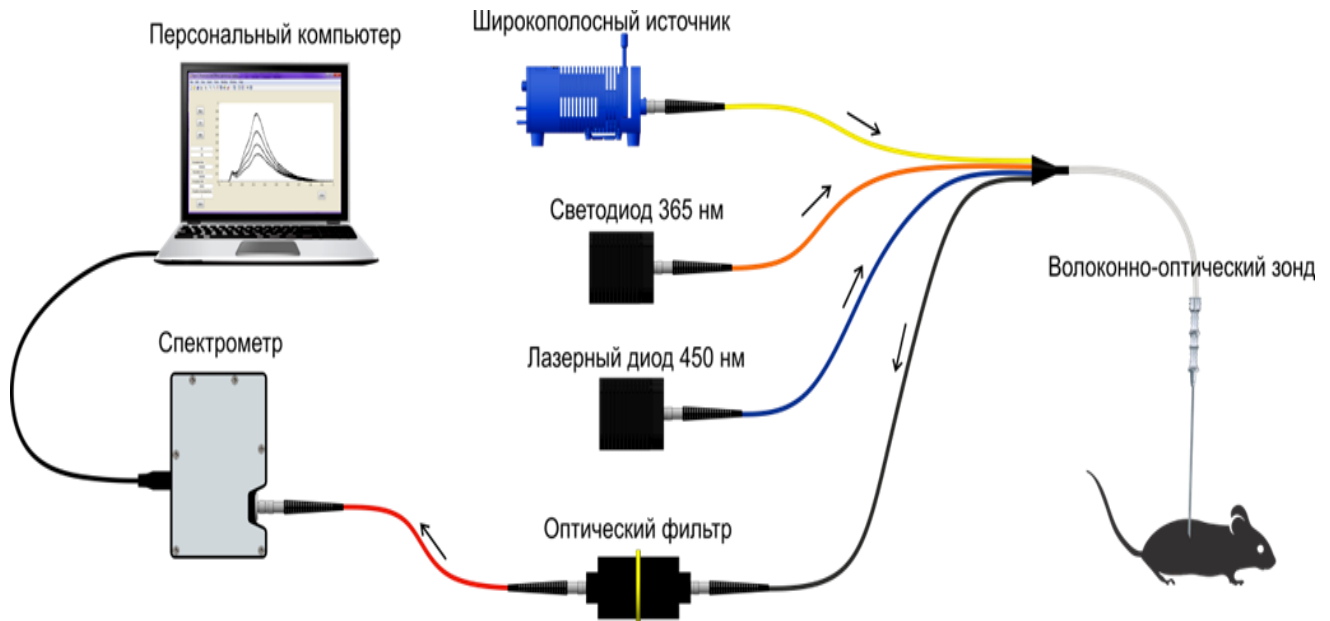


Рисунок 1 – Схематическое изображение экспериментальной установки

Экспериментальные исследования проводились на 3 самцах лабораторных мышей BDF (C57B16xDBA) в возрасте 20 недель. Экспериментальные исследования были одобрены Этическим комитетом Орловского государственного университета (протокол № 10 от 16.10.2017 г.) в соответствии с принципами GLP. Клетки гепатоцеллюлярной карциномы мыши Н33 (100 мкл/мышь, 50000 клеток/мкл) имплантировались путем инъекции суспензии клеток через шприц в среднюю долю печени. Экспериментальные исследования проводились через 3 месяца после операции привития опухоли при увеличении массы тела мыши более чем на 15% от нормы и общем ухудшении состояния животного.

Перед измерениями животное анестезировали Золетилом (Vibgas, Франция) в стандартной дозировке. Животное закреплялось на специальной платформе в положении на спине, затем проводилась лапаротомия, во время которой визуально оценивалось общее состояние брюшной полости и наличие опухолевых узлов в печени и других органах. В дальнейшем проводилась серия оптических измерений (регистрировались 20 спектров флуоресценции и 100 спектров диффузного отражения) в нескольких областях макроскопически неизменных участков печени и опухоли. Спектры диффузного отражения нормировались на спектр, зарегистрированный при освещении эталона диффузного отражения тем же источником.

Полученные спектры флуоресценции и диффузного отражения, усреднённые для дальнейшего анализа, показаны на рисунке 2. В процессе роста опухоли у двух из трех мышей имели место множественные узлы в печени и брюшине. Инокуляция опухолевых клеток у третьего животного привела к формированию крупного опухолевого узла в печени (16x8 мм). Последующее морфологическое исследование показало наличие комплексов низкодифференцированной аденокарциномы. Опухолевые клетки обладают высокой митотической активностью, что привело к значительному инфильтративному росту. Сплотные скопления злокачественных клеток сформировали опухолевые узлы. Таким образом, у двух мышей были показаны сходные различия между спектрами, полученными в тканях печени и опухоли.

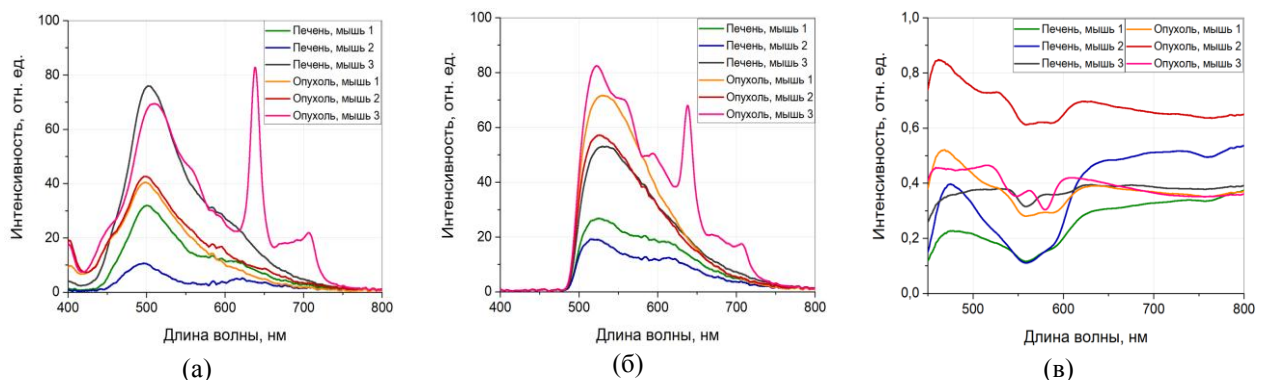


Рисунок 2 – Усредненные спектры флуоресценции при возбуждении излучением 365 нм (а) и 450 нм (б); спектры диффузного отражения (в) тканей печени и опухолей мышей.

Было отмечено, что в целом интенсивность флуоресценции в опухолевых тканях увеличилась по сравнению с нормальной паренхимой печени. Отличительной особенностью спектров флуоресценции, полученных при исследовании третьей мыши, является значительный уровень порфиринов, в частности протопорфирина IX, который обладает максимумом флуоресценции в диапазоне 635-640 нм. Накопление порфиринов может служить одним признаком активного развития опухоли [14]. Спектр флуоресценции представляет собой суммарный вклад спектров ряда флуорофоров помимо НАДН и ФАД (коллаген, билирубин, порфирин, липофусцин и др.), а также зависит от наличия других веществ, поглощающих оптическое излучение, таких как гемоглобин и желчь.

В целом, наблюдаемый результат может быть обусловлен не только атипичной метаболической активностью злокачественных клеток, но и изменениями в условиях кровоснабжения. Спектры диффузного отражения первых двух мышей показывают уменьшение поглощения в опухолевых узлах в диапазоне 500-800 нм, что указывает на повышенное кровенаполнение опухолевой ткани, которое в свою очередь может влиять на значения абсолютных интенсивностей флуоресценции. Обе исследованные области демонстрировали уменьшение коэффициента диффузного отражения на длинах волны 560 и 760 нм, связанных с поглощением света дезоксигемоглобином. На спектрах опухоли также наблюдался пик оксигемоглобина 580 нм, в то время как в тканях печени более выраженным являлся пик дезоксигемоглобина 560 нм, что может свидетельствовать о более низком насыщении кислородом тканей паренхимы печени. Это связано с дополнительным притоком венозной крови из воротной вены от других органов брюшной полости. Наличие злокачественных очагов печени может изменить кровоток и увеличить долю артериальной крови в их тканях за счет роста дополнительных сосудов, питающих опухоль из артерий [15]. Данный эффект наблюдался в большей степени при исследовании третьей мыши, спектры диффузного отражения опухоли которой имеют выраженные пики поглощения оксигемоглобина (540 и 580 нм).

Результаты измерений показали, что изменения в спектрах флуоресценции могут указывать на метаболические изменения, вызванные активным ростом злокачественной опухоли. В свою очередь, спектры диффузного отражения предоставляют информацию о кровенаполнении тканей, что также может служить дополнительным критерием идентификации опухолевых и нормальных тканей благодаря принципиальным различиям в кровоснабжении паренхимы печени без патологии и при наличии злокачественной опухоли. Полученные результаты указывают на то, что процессы канцерогенеза проходили с индивидуальными особенностями у каждого животного. Предположительно, опухоль в случае третьей мыши находилась на более поздней стадии развития. Размеры и степень распространения опухолевых узлов также могут влиять на результаты исследования. Спектры диффузного отражения крупного опухолевого узла показали признаки более значительных морфологических изменений в ходе роста опухоли, для которого потребовалась кровь из артерий, более насыщенная кислородом, в то время как опухолевые узлы в печени других мышей могли не достигнуть такой же степени прогрессирования.

Таким образом, результаты предварительных исследований с использованием методов ФС и СДО на лабораторных животных с перевиваемой опухолью печени демонстрируют возможность дифференциации неизменных и злокачественных тканей на основе многопараметрического подхода. Полученные результаты также указывают на необходимость проведения дальнейших исследований с целью более детального изучения влияния фаз канцерогенеза на данные, регистрируемые обоими методами. Эти измерения вместе с другими методами испытаний разработанной установки будут учтены при планировании и проведении дальнейших экспериментальных исследований, в том числе клинических. Предлагаемый подход планируется принять за основу для сбора базы данных результатов оптической биопсии, включающей результаты гистологического и цитологического исследований, на которых будет базироваться разработка автоматического классификатора для анализа различных стадий и типов опухолей, что позволит повысить качество диагностики онкологических заболеваний, а следовательно, улучшить качество лечения.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 18-15-00201.

Библиографический список

1. Mahvi, D.A. Liver Metastases/ D.A. Mahvi, D.M. Mahvi // *Abeloff's Clinical Oncology*, 2020. – 846–862.
2. Tam, A.L. Image-guided biopsy in the era of personalized cancer care: proceedings from the Society of Interventional Radiology Research Consensus Panel / A.L. Tam, H.J. Lim, I.I. Wistuba, A. Tamrazi, M.D. Kuo, E. Ziv, S. Wong, A.J. Shih, R.J. Webster III, G.S. Fischer, S. Nagrath, S.E. Davis, S.B. White, K. Ahrar // *J. Vasc. Interv. Radiol. JVIR.*, 2016. – 27. - № 1. – 8-19.
3. Al-Marzooq, Y.M. Comparison of specimen adequacy in fine-needle aspiration biopsies performed by surgeons and pathologists / Y.M. Al-Marzooq, R. Chopra, A.T. Al-Bahrani, M. Younis, A.S. Al-Mulhim, M.I. Al-Mommatten // *Ann. Saudi Med.*, 2004. – 24. – №2. – 124–126.
4. Gomez-Macias, G.S. Inadequate fine needle aspiration biopsy samples: pathologists versus other specialists / G.S. Gomez-Macias, R. Garza-Guajardo, J. Segura-Luna, O. Barboza-Quintana // *Cytojournal*, 2009. – 6. – 9.
5. Тучин, В.В. Оптическая биомедицинская диагностика: в 2-х т. / В.В. Тучин. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – Т. 1. – 559 с.

6. Croce, A.C. Autofluorescence spectroscopy and imaging: A tool for biomedical research and diagnosis / A.C. Croce, G. Bottiroli // *Eur. J. Histochem.*, 2014. – 58. – № 4. – 320–337.
7. Dremin, V.V. The development of attenuation compensation models of fluorescence spectroscopy signals / V.V. Dremin, E.A. Zharebtsov, I.E. Rafailov, A.Y. Vinokurov, I.N. Novikova, A.I. Zharebtsova, K.S. Litvinova, A.V. Dunaev // *Proc. SPIE*. 2016. – 9917. – 99170Y.
8. Shi, H. Early identification of acute hypoxia based on brain NADH fluorescence and cerebral blood flow / H. Shi, N. Sun, A. Mayevsky, Z. Zhang, Q. Luo // *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 2014. – 7. – № 2. – 1450033.
9. Du Le, V.N. Dual-modality optical biopsy of glioblastomas multiforme with diffuse reflectance and fluorescence: ex vivo retrieval of optical properties / V.N. Du Le, J. Provias, N. Murty, M.S. Patterson, Z. Nie, J.E. Hayward, T.J. Farrell, W. McMillan, W. Zhang, Q. Fang // *J. Biomed. Opt.*, 2017. – 22. – № 2. – 27002.
10. Volynskaya, Z.I. Diagnosing breast cancer using diffuse reflectance spectroscopy and intrinsic fluorescence spectroscopy / Z.I. Volynskaya, A.S. Haka, K.L. Bechtel, M. Fitzmaurice, R. Shenk, N. Wang, J. Nazemi, R.R. Dasari, M.S. Feld // *J. Biomed. Opt.*, 2008. – 13. – № 2. – 24012.
11. Pogue, B.W. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry / B.W. Pogue, M.S. Patterson // *J. Biomed. Opt.*, 2006. – 11. – № 4. – 41102.
12. Weissig, V. Mitochondrial Medicine / V. Weissig, M. Edeas. – Humana Press, 2015. – Т. 1. – 480 с.
13. Kandurova, K.Y. Approbation of fine needle optical probe for registration of changes in cell respiration coenzymes fluorescence / K.Y. Kandurova, E.V. Potapova, E.A. Zharebtsov, V.V. Dremin, E.S. Seryogina, A.Y. Vinokurov, A.V. Mamoshin, A.V. Borsukov, Y.V. Ivanov, A.V. Dunaev // *Opt. Spectrosc.*, 2020. – 128. – 6.
14. Sachar, M. Protoporphyrin IX: the good, the bad, and the ugly / M. Sachar, K.E. Anderson, X. Ma // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2016. – 356. – № 2. – 267–275.
15. Lewis, M.A. Hepatic artery embolization for neuroendocrine tumors: postprocedural management and complications / M.A. Lewis, S. Jaramillo, L. Roberts, C.J. Fleming, J. Rubin, A. Grothey // *Oncologist*, 2012. – 17. – № 5. – 725-731.

THE STUDY OF INOCULATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN MICE USING FLUORESCENCE AND DIFFUSE REFLECTANCE SPECTROSCOPY

¹Kandurova K.Y., ¹Potapova E.V., ¹Shupletsov V.V., ¹Seryogina E.S., ^{1,2}Dremin V.V., ^{1,3}Zharebtsov E.A.,
⁴Alekseyev A.G., ^{1,5}Mamoshin A.V., ¹Dunaev A.V.

¹Research and Development Center of Biomedical Photonics, Orel State University, Orel, *kandkseniya@gmail.com,

²Aston Institute of Photonic Technologies, Aston University, Birmingham,

³Optoelectronics and Measurement Techniques Unit, University of Oulu, Oulu,

⁴Medical Institute, Orel State University, Orel,

⁵Orel Regional Clinical Hospital, Orel

Keywords: optical biopsy, fluorescence spectroscopy, diffuse reflection spectroscopy, hepatocellular carcinoma

Annotation. The article describes the results of experimental studies using a specially developed system for optical biopsy, designed for in vivo diagnosis of puncture biopsy of diffuse and focal liver neoplasms. Experimental studies were conducted on laboratory mice with intertwined hepatocellular carcinoma cells. The optical methods used were fluorescence and diffuse-reflective spectroscopy. The obtained results demonstrate quantitative differences in the maximum intensity of fluorescence and the form of diffuse reflection spectra of healthy and malignant tissues, indicating the presence of metabolic and morphological changes. The developed multiparametric approach is promising for further development, testing and implementation in clinical practice.



СРАВНЕНИЕ СКОРОСТИ ВЫРАБОТКИ NADH В ТКАНЯХ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

^{1*}Горлин П.М., ^{1**}Палалов А.А., ¹Стельмашук О.А., ¹Жеребцов Е.А., ^{1,2}Абрамов А.Ю.

¹ФГБОУ ВО «ОГУ им. И.С. Тургенева», г. Орёл, *gorlin23@yandex.ru, **d.alexanderpalalov@yandex.ru,

²Department of Clinical and Movement Neurosciences, UCL Queen Square Institute of Neurology, London

Ключевые слова: митохондрии, нейродегенеративные заболевания, NADH, нейрон

Аннотация. Изучение работы митохондрий в нервной ткани является одним из перспективных направлений современной нейробиологии. Дисфункция митохондрий приводит к необратимым патологическим процессам и является ключевым звеном патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Оценить работу митохондрий возможно с помощью определения NADH – субстрата цепи переноса электронов, генерирующей митохондриальный потенциал для синтеза АТФ. При этом интенсивность метаболических процессов и активность митохондрий в клетках различных областей головного мозга отличается. Мы исследовали скорость образования и пул NADH в с помощью флуоресцентной спектроскопии в нервной ткани головного мозга крыс в пяти областях: коре, среднем мозге, гиппокампе, мозжечке и стволе. Согласно результатам исследования,