

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОРФОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА И ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОХШИХ КАПЕЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Зажогин А.П.<sup>1</sup>, Маслова Г.Т.<sup>1</sup>, Булойчик Ж.И.<sup>1</sup>, Мавричев А.С.<sup>2</sup>, Державец Л.А.<sup>2</sup>, Трубецкая А.С.<sup>1</sup>, Титова А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет

*пр. Независимости, д. 4, г. Минск, 220030, Беларусь; e-mail: zajogin\_an@mail.ru*

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии

им. Н.Н. Александровна

*Аэрогородок Лесной, Минский р-н, 223040, Беларусь*

Поступила в редакцию: 29.06.2018

**Аннотация.** Изучена морфология образцов высохшей плазмы крови больных с онкопатологией головного мозга. Выявлены структурные особенности высохших капель плазмы крови пациентов с диагнозом опухоли мозга различной степени. Показана возможность уточнения диагноза по отнесению опухоли к различным типам. Получены полуколичественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохшей капли биологических жидкостей и в слоях с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что метод лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике заболеваний. Полученные экспериментальные данные могут быть 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.

В последние годы обозначился заметный рост заболеваний центральной нервной системы, в том числе опухолей головного мозга (ОГМ). Становится очевидным, насколько особенно важна ранняя диагностика заболеваний такого рода. Первичные опухоли центральной нервной системы (ЦНС) составляют 1,4 % от всех злокачественных опухолей и 2,4 % от онкологической летальности. Высокая летальность и инвалидизация больных, значительный социальный, экономический и моральный ущерб, который эта патология наносит обществу, вызывают вполне обоснованный интерес исследователей к организации медицинской помощи данным больным, к вопросам их реабилитации и социальной адаптации [1-3].

Опухоли головного мозга — гетерогенная группа различных внутричерепных новообразований, доброкачественных или злокачественных, а также возникающих вследствие метастазирования первичной опухоли, находящейся в другом органе. Тип опухоли определяется клетками, её формирующими. В зависимости от локализации и гистологического варианта формируется симптоматика заболевания. Течение заболевания при опухолях мозга зависит не столько от гистологического типа опухоли, сколько от того, в какой области опухоль развилась и какие участки мозга сдавливает.

Опухоли головного мозга встречаются практически в любом возрасте. Наибольшая доля заболевших приходится на возраст от 40 до 69 лет. Если средняя выживаемость больных с анапластическими астроцитомами составляет около 24 мес., то ситуация у пациентов с глиобластомами значительно хуже. Так, по оценкам разных авторов средняя продолжительность жизни больных этой группы редко превышает 12 мес. [1-3].

Лечение больных злокачественными опухолями центральной нервной системы — одна из сложных проблем нейроонкологии, что продиктовано, прежде всего, неоднородностью тканевого генеза и структурно-биологических свойств новообразований. Только хирургическое лечение является единственным жизнеспасающим и увеличивающим выживаемость нейроонкологических больных методом [1-3].

В механизме патогенеза раковых новообразований главнейшим звеном следует считать нарушение порядка самоорганизации белка на клеточном уровне. В клинической практике используют около двух десятков онкомаркеров (ОМ), обладающих достаточной диагностической значимостью, в то же время неизвестно ни одного ОМ, соответствующего идеальным параметрам. Для получения однозначного результата требуется тщательное сравнение многочисленных показателей. Поэтому поиски всестороннего подхода к диагностике ОГМ продолжаются.

Известно, что биологическая жидкость (БЖ) играет роль функционального системообразующего фактора, связывая пространственно-временные структуры внутренней среды организма. Внутренняя среда организма реагирует на изменение пространственного порядка своих химических связей. Любое изменение физико-

химического состояния внутренней среды организма находит свое отражение в специфическом изменении формообразования ее структур.

Механизмам и моделям дегидратационной самоорганизации БЖ посвящено большое количество работ [4]. Морфология твердой фаз используется как метод диагностики в медицине [5]. Подробно изучаются физические основы структурной эволюции высыхающей капли БЖ и факторы, влияющие на ее морфогенез [6].

Анализ формы образующихся структур используют для определения патологических отклонений в системе и устойчивости физиологических процессов организма, поскольку структура БЖ дает сжатую информацию о состоянии организма. Особенности состояния организма сказываются на процессе кристаллизации веществ, содержащихся в БЖ, и проявляются в появлении на изображении фации (высохшая капля) характерных структур. В отличие от здорового человека, который обладает компенсаторно-адаптационными возможностями и сбалансированностью метаболических реакций в организме, для пациентов с патологией характерен иррадиальный тип структуропостроения.

Тем не менее остается ряд проблем в практическом применении морфологии твердой фазы БЖ [7]. В первую очередь это касается перевода данных методов из теории науки в практическую деятельность медицины. Ведь, за исключением отдельных запатентованных способов диагностики заболеваний по особенностям структуризации БЖ, большая часть исследований находится на стадии феноменологического описания вследствие трудности количественного анализа получаемых паттернов, что в свою очередь, затрудняет применение статистических методов анализа. Высокая степень субъективизма в оценке результатов также не способствует решению данной проблемы.

Весомым минусом приведенных методов является недостаточная обоснованность механизмов дегидратационной самоорганизации БЖ, а ведь в данном случае особо ценным является не феноменологическое описание типа «вид патологии – наблюдаемые структуры», а анализ обменных процессов, обуславливающих особенности механизмов формирования структуры твердой фазы БЖ. В конечном счете обилие авторских методик, зачастую не имеющих принципиальных различий, но предлагающих собственные алгоритмы анализа результатов, отнюдь не способствует применению морфологии твердой фазы БЖ в медицине. Тем не менее, очевидны перспективы использования структуризации твердой фазы БЖ в самых разнообразных областях медицины [7].

В ряде работ на основе тщательного анализа высохшей капли БЖ пациентов различной патологии показаны особенности системной организации БЖ, выделены характерные структуры, которые могут служить маркерами не только уже проявившегося заболевания, но и свидетельствовать о самой начальной форме заболевания, когда симптомы заболевания еще практически отсутствуют. В последнее время разрабатываются алгоритмы распознавания конкретных видов маркеров, соответствующих физиологическому (нормальному) и патологическому состоянию организма, исследуется их эффективность [7, 8].

Поскольку при патологических процессах происходит изменение фазового состояния белка, выявлены достаточно четкие зависимости типа «вид наблюдаемых структур - патологический процесс». И хотя в последнее время появилось множество работ, показывающих, что развитие самых разнообразных патологических процессов в организме сопровождается изменением распределения коллоидных частиц и солей БЖ, что сказывается на изменении морфоструктур высохших капель, до сих пор практически отсутствуют количественные оценки образующихся структур. На сегодняшний день нет модели, которая бы одновременно учитывала оба фактора.

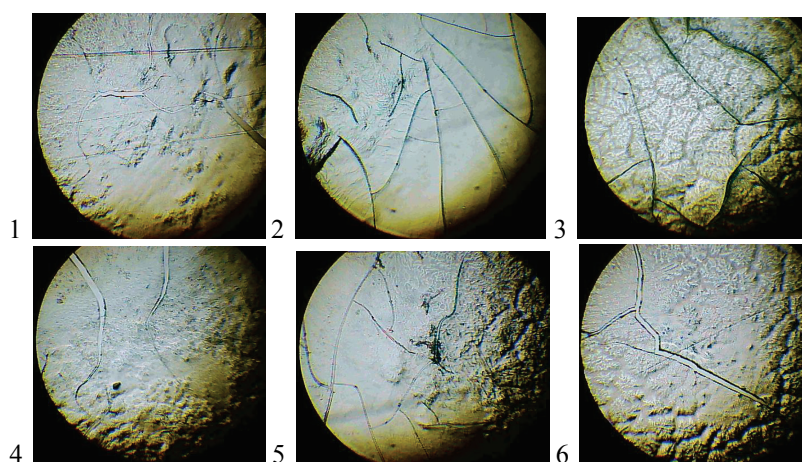
В работах [9, 10] авторами проведен сравнительный анализ уровня нейроспецифических белков и показана возможность их использования в качестве дополнительного биохимического критерия поражения ГМ. Уделяется внимание особым изменениям в морфологической структуре фаций сыворотки крови больных с метастазами, что дополняет число маркеров патологических процессов различного типа [11, 12].

Нами ранее было показано, что изучение динамики структурирования БЖ и пространственного распределения жизненно необходимых элементов в высохшей капле плазмы крови дает возможность уточнять диагноз, оценивать результаты лечения пациентов с онкопатологией [13]. С этой же целью нами продолжены исследования структурирования высохших капель плазмы крови пациентов с ОГМ. Проведена также количественная оценка локального пространственного распределения кальция в высохшей капле.

Для изучения морфологии и пространственного распределения кальция в высохшей капле плазму крови (10 мкл) наносили на обезжиренную пластинку из оргстекла, высушивали при комнатной температуре в открытой системе в течение 90 - 100 минут. Диаметр высохшей капли равен примерно 6 мм.

Снимки высохших капель плазмы крови регистрировали, используя 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.

Изучена морфология высохших капель плазмы крови более 40 пациентов с опухолью головного мозга различной степени и характером патологии. В качестве примера на рисунке 1 приведена морфология центральной части высохшей через 90 минут капли плазмы крови некоторых пациентов с ОГМ, а также с онкологией других органов и метастазами (Мтс) в ГМ (увеличение 120 раз).



**Рисунок 1.** Центральная часть высохших капель плазмы крови. Диагноз пациентов 1 и 2 – диффузная астроцитома ГМ, степень патологии – G II. У пациенток 3 и 4 – метастазы ГМ вследствие онкологии других органов, у 3 – рак молочной железы, 4 – карцинома яичников. Степень патологии пациентов 5, 6 – G IV. Диагноз пациентов: 5 – пинеобластома ГМ, 6 – глиобластома ГМ.

Видно, что при патологических состояниях организма характерны существенные изменения морфологической структуры фации. Проявляются нарушения в виде потери симметрии расположения основных элементов фации (конкреций, отдельностей, морщин, трещин и т. д.) [6-8]. Идентифицируются различные типы фаций, кроме радиального нормотипа.

Объемной структурной деформации наименее всего подвержены высохшие капли плазмы крови пациентов 1 и 2, поверхность которых относительно гладкая, но с аномальным расположением трещин. Согласно имеющейся классификации, для этих больных характерен частично-радиальный и иррадиальный тип фации [12]. Присутствуют трехлучевые трещины (маркер застойных явлений в организме), небольшие жгуты (признак гипоксии ГМ) и бляшки (интоксикация организма) [12].

Структура остальных приведенных высохших капель во многом схожа. Исключительно у больных с глубокой патологией (пациенты 5 и 6 с онкологией 4-ой степени) обильно присутствуют в фации морщины (складчатость), хаотично разбросанные широкие жгутовые трещины, множество бляшек.

Морфотип фации пациентов 3 и 4 с метастазами в ГМ также характеризуется наличием стойких патологических структур, в частности «языков Арнольда» и «ковров Серпинского», которые встречаются в группе больных с метастазами и считаются маркерами воспалительных процессов [11]. Присутствуют «токсические бляшки» и «морщины».

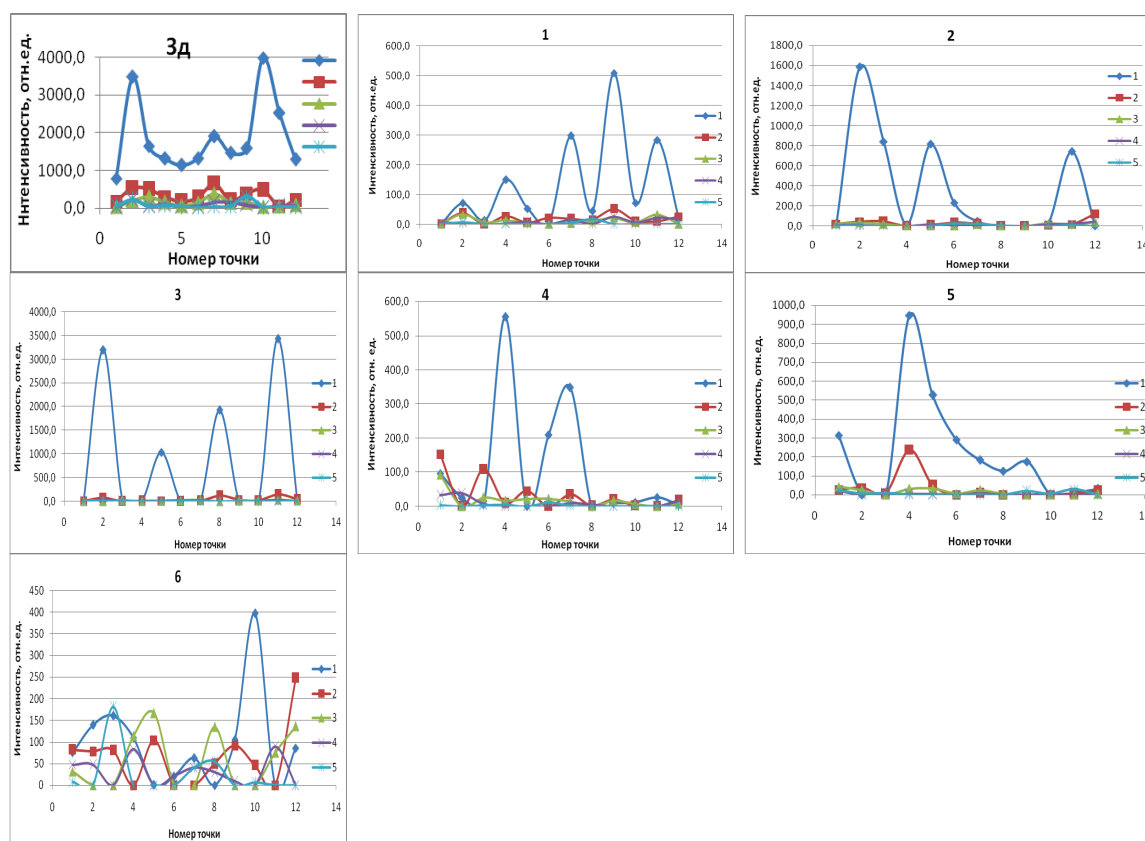
Для конкретизации патологии обследованных больных дополнительная информация получена при определении кальция с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии (ЛАЭМС). Количественную оценку локального пространственного распределения кальция по поверхности и объему всей высохшей капли проводили с помощью лазерного многоканального атомно-эмиссионного спектрометра LSS-1. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 104 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных сдвоенных лазерных импульсов (СЛИ). Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы, соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами – 8 мкс. Аблиция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения 0,10-0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности.

Полученные данные интенсивности линий кальция в спектрах анализируемых высушенных капель плазмы крови приведены на рисунке 2.

Для здорового человека (Зд) характерно уже хорошо изученное равномерное распределение кальция по поверхности высохшей капли с максимальной концентрацией в краевом белковом валике благодаря равномерной диффузии раствора к краям в процессе испарения. При патологии изменение связывающей способности альбумина приводит к аномальной коагуляции белка и увеличению концентрации кальция в более глубоких слоях.

Локальное пространственное распределение кальция имеет минимальное отклонение от нормы у первых двух пациентов. Основное содержание кальция приходится на два верхних слоя с максимальной концентрацией в краевом белковом валике, что характеризует наименьшую степень патологии.

Больные 3 и 4 поступили с онкологией других органов и метастазами ГМ. У пациентки 3 обнаружены одиночные метастазы ГМ. У пациентки 4 метастазами поражены оба полушария ГМ. Пространственное распределение кальция в высохших каплях плазмы крови бессистемно, при этом у пациентки 4 найдено повышенное содержание кальция уже во втором слое.



**Рисунок 2.** Интенсивность линии Ca II (393,239 нм) в атомно-эмиссионных спектрах фаций плазмы крови пациентов

Присутствие кальция в более глубоких слоях высохшей капли характерно и для анализируемых капель пациентов 5 и 6 (G IV). Аномальная коагуляция белка в 4-ом и 5-ом слоях и связанная с этим повышенная концентрация кальция в глубоких слоях вызывает опасения [13]. Полученные результаты хорошо согласуются с найденными новыми маркерами ОГМ, чувствительность которых определяется именно повышенным содержанием кальция связывающих нейроспецифических белков S-100 в сыворотке крови больных с опухолями головного мозга [9].

В частности, в работе [9] проведен сравнительный анализ уровней нейроспецифических белков S-100 в сыворотке крови у больных с первичными и метастатическими опухолями головного мозга, а также у пациентов с неврологическими заболеваниями неопухолевого этиологии и практически здоровых людей. Наиболее выраженные изменения для данного белка отмечены в группе больных с первичными злокачественными опухолями головного мозга, где средний уровень S-100 в 3 раза превышал значение контроля. При этом наиболее высокие уровни белка были характерны для глиобластом с высокой степенью (III-IV) злокачественности.

Подводя итоги, можно отметить некоторые общие закономерности, полученные при изучении фации больных с ОГМ. Иррадиальный морфотип фации характерен для всех больных. Что касается пациентов, находящихся в критическом состоянии, то структурирование высохшей капли плазмы крови этих пациентов, в первую очередь, характеризуется такой особенностью, как ярко выраженная морщинистость поверхности фации, наличие обильного числа бляшек и широких жгутовых трещин. Во-вторых, общее содержание кальция в фации таких больных низкое, а относительная концентрация его более высокая в глубоких слоях.

Отметим, что после операции биохимический анализ крови, как правило, улучшается только у пациентов с легкой степенью патологии, у пациентов (G IV) изменения биохимии крайне редки.

Таким образом, выполненные исследования предлагают доступные оперативные методики оценки структурирования и полуколичественного определения эссенциальных элементов в высохшей капле. Морфологическая картина, определение метаболитов в плазме крови путем оценки локального пространственного распределения кальция в фации являются дополнительным качественным материалом для установления взаимосвязей компонентов анализируемой БЖ и показывают возможность проведения постоянного мониторинга процессов, происходящих в организме. Полученная оперативная информация позволяет уточнить диагноз и скорректировать лечение. Всесторонняя аналитическая информация при обсуждении диагноза будет способствовать более глубокому пониманию характера протекания патологических процессов и далее успешному лечению опухолей головного мозга.

**Список литературы / References:**

1. Коновалов А.Н., Потапов А.А., Лошаков В.А., Олюшин В.Е., Корниенко В.Н. [и др.] *Стандарты, рекомендации и опции в лечении глиальных опухолей головного мозга*. М., 2005, 35 с. [Konovalov A.N., Potapov A.A., Loshchakov V.A., Olyushin V.E., Kornienko V.N. [et al.] *The standards, recommendations, and options in treatment of glial tumors of the brain*. М., 2005, 35 p. (In Russ.)]
2. Коновалов А.Н. Современное состояние проблемы лечения опухолей мозга. *Комбинированное лечение опухолей головного мозга*, Екатеринбург, 2004, с. 56-58. [Konovalov A.N. State-of-the-art in the problematic of the brain tumor treatment. *Combined treatment of the brain tumors*, Ekaterinburg, 2004, pp. 56-58. (In Russ.)]
3. Кoryтова Л.И., Жабина Р.М., Маслюкова Е.А., Мешечкин А.В. Комбинированное лечение опухолей головного мозга различного генеза. *Паллиативная медицина и реабилитация*, 2010, № 4, с. 49-54. [Korytova L.I., Zhabina R.M., Maslyukova E.A., Meshechkin A.V. Combined treatment of the different-genesis brain tumors. *Palliative medicine and rehabilitation*, 2010, no. 4, pp. 49-54. (In Russ.)]
4. Тарасевич Ю.Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей. *УФН*, 2004, т. 174, № 7, с. 779-790. [Tarasevich Yu.Yu. Mechanisms and models of the dehydration self-organization in biological fluids. *Physics-Uspeski*, 2004, vol. 47, no. 7, pp. 771-790. (In Russ.)]
5. Максимов С.А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине. *Бюллетень сибирской медицины*, 2007, № 4, с. 80-85. [Maksimov S.A. Morphology of the solid phase of biological liquids as method of diagnostics in medicine. *Vyulleten' sibirskoy meditsiny*, 2007, vol. 6(4), pp. 80-85. (In Russ.)]
6. Яхно Т.А., Яхно В.Г. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей. *Журнал технической физики*, 2009, т. 79, вып.8, с. 133-141. [Yakhno T.A., Yakhno V.G. Theory of the structural evolution of drying biological fluid drops. *J. of Applied Physics*, 2009, vol. 79, iss. 8, pp. 133-141. (In Russ.)]
7. Крашенинников В.Р., Трубникова Л.И., Албутова М.Л., Копылова А.С., Тарасова А.В. Обнаружение и распознавание маркеров на изображениях фаций биологических жидкостей при ранней медицинской диагностике. *Наукоёмкие технологии*, 2013, т. 14, № 5, с. 36-41. [Krashenninnikov V.R., Trubnikova L.I., Albutova M.L., Kopylova A.S., Tarasova A.V. Detection and recognition of the markers in images of the facies of biological fluids for early medicinal diagnosis. *Science-Intensive Technologies*, 2013, vol. 14, no. 5, pp. 36-41. (In Russ.)]
8. Крашенинников В.Р., Трубникова Л.И., Копылова А.С., Албутова М.Л., Тарасова А.В. Сегментация фрагмента изображения фации биологической жидкости. *Ульяновский медико-биологический журнал*, 2014, № 2, с. 62-66. [Krashenninnikov V.R., Trubnikov L.I., Kopylova A.S., Albutova M.L., Tarasova A.V. Segmentation of the image fragment for facies of a biological fluid. *Ulyanovsk Medical-Biological Journal*, 2014, no. 2, pp. 62-66. (In Russ.)]
9. Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Кушлинский Н.Е. Нейроспецифические белки в сыворотке крови у больных с опухолями головного мозга и неврологическими заболеваниями неопухоловой этиологии. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*, 2016, № 3, с. 90-95. [Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Kushlinsky N.E. Neurospecific proteins in blood serum of the patients with brain tumors and with neurological diseases of nonneoplastic etiology. *Medical-Biological, Social, and Psychological Problems of Safety in the Case of Emergencies*, 2016, no. 3, pp. 90-95. (In Russ.)]
10. Дербенева О.А. Клиническая значимость протеина S -100 как маркера острого церебрального повреждения. *Journal of Siberian Medical Sciences. Медицинские и фармацевтические науки*, 2013, № 2, с. 23-29. [Derbeneva O.A. Clinical significance of S-100 protein as a marker of acute brain damages. *Journal of Siberian Medical Sciences. Medicinal and Pharmaceutical Sciences*, 2013, no. 2, pp. 23-29. (In Russ.)]
11. Шихлярова А.И., Непомнящая Е.М., Машурова С.А., Протасова Т.П., Куркина Т.А. Морфологические особенности твердотельных пленок сыворотки крови у больных с метастазами сарком мягких тканей. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2013, № 7, с. 62-65. [Shikhlyarova A.I., Nepomnyashchaya E.M., Mashurova S.A., Protasova T.P., Kurkina T.A. Morphological features of solid blood serum film of the patients with metastatic tumors of soft-tissue sarcoma. *International Journal of the Applied and Fundamental Research*, 2013, no. 7, pp. 62-65. (In Russ.)]
12. Машурова С.А., Кечеджиева С.М., Салатов Р.Н., Шихлярова А.И., Аушева Т.В. Некоторые особенности системной самоорганизации сыворотки крови у больных с опухолями мягких тканей и молочной железы с отдаленными метастазами. *Известия ВУЗОВ. Северо-кавказский регион. Естественные науки*, 2011, № 4, с. 117-121. [Mashurova S.A., Kechedzieva S.M., Salatov R.N., Shikhlyarova A.I., Ausheva T.V. Some features of the systemic blood serum self-organization for the patients suffering from soft-tissue and mammary gland tumors with distant metastases. *Proceedings of Higher Schools. Northern Caucasian region. Natural sciences*, 2011, no. 4, pp. 117-121. (In Russ.)]
13. Савков А.В., Сергей А.М., 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. *Вестник БГУ*, 2016, сер. 1, № 3, с. 51-62. [Savkov A.V., Sergei A.M., Buloichik 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. *J. of BSU*, 2016, ser. 1, no. 3, pp. 51-62. (In Russ.)]

USING OF THE MORPHOSTRUCTURAL ANALYSIS AND LASER ATOMIC-EMISSION  
SPECTROMETRY OF DRIED BLOOD PLASMA DROPS IN DIAGNOSIS  
OF THE BRAIN TUMORS

Zajogin A.P.<sup>1</sup>, Maslova G.T.<sup>1</sup>, Buloichik J.I.<sup>1</sup>, Mavrichev A.S.<sup>2</sup>, Derzhavets L.A.<sup>2</sup>,  
Trubetskaya A.S.<sup>1</sup>, Titova A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belorussian State University

*Nezalieznasci av., 4, Minsk, 220030, Belarus; e-mail: zajogin\_an@mail.ru*

<sup>2</sup>Republican Research-Practical Center of Oncology and Medical Radiology name N.N. Alexandrov  
*Lesnoy, Minsk district, 223040, Belarus*

**Abstract.** Morphology of the samples of dried plasma drops from the patients with oncopathology of the brain has been studied. The structural features of the dried blood plasma drops of the patients with the diagnosed brain tumors of different grades have been revealed. The possibility to improve diagnosis by attributing tumors to various types has been demonstrated. Semiquantitative results for the spatial distribution of calcium over the surface and within the layers of the dried drops of biological fluids have been obtained using the methods of laser atomic-emission spectrometry. It is shown that laser atomic-emission spectrometry allows for quantitative estimation of the variations in protein centers and is a fast and highly sensitive instrument in diagnosis of various diseases. The obtained experimental data may form the basis for further development of the diagnostic methods aimed at early detection of disturbances in the functional resources of a human organism and for the adequate selection of the needed system of rehabilitation measures.

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