

УДК 616-006.04

DOI 10.34014/2227-1848-2021-3-89-96

МОНИТОРИНГ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА МЕТОДОМ СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА НЕКЛЕТОЧНОЙ ТКАНИ

В.Н. Шабалин¹, С.Н. Шатохина², М.Г. Дедова²

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
г. Москва, Россия;

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского», г. Москва, Россия

Исследован состав биокристаллических структур (анизоморфонов) сыворотки крови больных раком гортани, которые формируются при переходе сыворотки крови в твердую фазу в процессе ее краевой дегидратации. Выявленные анизоморфоны представляют собой три вида маркерных структур: маркер активного роста злокачественной опухоли – агрегация макросферолита и зернистого микросферолита с одинаковой степенью анизотропии; маркер дегенеративно-дистрофического процесса – агрегация макросферолита с низкой степенью анизотропии и микросферолита с высокой степенью анизотропии; маркер прогрессии злокачественного роста – волнистый микросферолит вне агрегации.

Цель – выявить диагностические маркеры активности злокачественного процесса в структурах твердой фазы сыворотки крови больных раком гортани и оценить их значение для выбора эффективного вида лечения.

Материалы и методы. В качестве основного метода исследования использован метод краевой дегидратации сыворотки крови, являющийся разделом диагностической технологии «Литос-система» (Разрешение ФС № 155 от 2009 г. на применение в клинической практике).

Результаты. Показано, что фаза развития рака гортани (активный рост или дегенеративно-дистрофический процесс) служит важным критерием выбора вида лечения: в фазу дегенеративно-дистрофического процесса опухоли наиболее благоприятный эффект дает хирургическое лечение, а в период активной фазы злокачественного роста – лучевая терапия.

Ключевые слова: рак гортани, сыворотка крови, краевая дегидратация биологических жидкостей, маркеры фазы активности опухолевого роста.

Введение. Рак гортани является наиболее частым видом злокачественных опухолей лор-органов [1]. Ежегодно в России первичный рак гортани устанавливают у 6–7 тыс. пациентов [2]. В последние годы разработаны новые подходы к лечению и реабилитации больных раком гортани, как консервативные, так и хирургические. Однако вопрос о выборе метода лечения остается дискуссионным [3]. Успех лечения онкологических больных во многом зависит от стадии выявления опухоли [4]. В связи с тем что в 30–35 % случаев заболевание протекает бессимптомно, диагностика злокачественного роста запаздывает [5, 6]. В то же время опухолевый процесс имеет фазовое течение: активная фаза сменяется фазой покоя. Фаза активности опухолевого роста имеет принципиальное значение для выбора

вида лечения. На сегодняшний день не существует общепризнанного молекулярного маркера, позволяющего с высокой долей вероятности прогнозировать инвазию и метастазирование опухоли у больных раком гортани [7].

Разработанная нами новая технология диагностики различных видов патологических процессов, в т.ч. и злокачественного роста, базирующаяся на морфологических признаках структур неклочных тканей организма – биологических жидкостей, открывает значительные перспективы. При исследовании структур сыворотки крови больных с различной локализацией опухолей (т.е. с помощью нового вида жидкостной биопсии) нами были открыты морфологические маркеры доброкачественной и злокачественной неоплазии [8], показано соотношение процессов пролифера-

ции и дегенерации в течении злокачественного роста [9].

Цель исследования. Выявить диагностические маркеры активности злокачественного процесса в структурах твердой фазы сыворотки крови больных раком гортани и оценить их значение для выбора эффективного вида лечения.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 64 больных раком гортани в возрасте от 47 до 83 лет, среди них было 59 мужчин и 5 женщин. По данным гистологического заключения у всех больных диагностирован плоскоклеточный рак. По стадиям заболевания: T1N0M0 – 4 чел., T2N0M0 – 19, T3N0M0 – 32, T3N2M0 – 5, T4N0M0 – 4.

В качестве основного метода исследования использован метод краевой дегидратации сыворотки крови, являющийся разделом диагностической технологии «Литос-система» (разрешение ФС на применение новой медицинской технологии № 2009/155 от 15 июня

2009 г.). Взятие крови у пациента проводили натошак из локтевой вены в объеме 2 мл. Кровь собирали в сухую пробирку (без стабилизатора), после свертывания центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученная сыворотка крови являлась основным объектом исследования. Полуавтоматической пипеткой-дозатором наносили каплю сыворотки крови (0,02 мл) в аналитическую ячейку тест-карты ТК4 (рис. 1), накрывали покровным стеклом. Далее тест-карты выдерживали в течение 7 сут при температуре 20–25 °С и относительной влажности 55–60 %. При этом в процессе медленного перехода в твердую фазу в сыворотке крови формировались отдельные биокристаллы (морфоны). Морфоны могли иметь изо- или анизотропную структуру. В настоящей работе нас интересовали только анизоморфоны. Их исследование проводили с помощью микроскопа DM2500 фирмы Leica в поляризованном свете при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 800$.

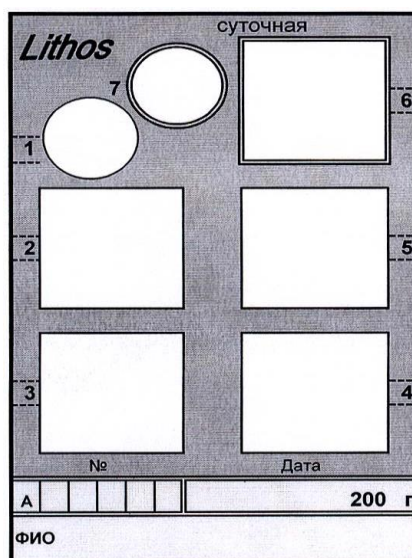


Рис. 1. Тест-карта (ТК4) диагностического набора «Литос-система»

Fig. 1. Test card (TC4), "Litos-system" diagnostic kit

Исследование анизоморфонов сыворотки крови больных раком гортани проводили периодически на протяжении всего периода наблюдения: при поступлении пациента в стационар, в процессе лучевой терапии – после доз 46 и 70 Гр, при хирургическом вмешательстве – до и в послеоперационном периоде, да-

лее при амбулаторном наблюдении – через каждые 1–2 мес. на протяжении двух лет.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы Statistica for windows v.8.0. Для конечных точек (0 и 100 %) применялся t-критерий Стьюдента с поправкой на конечные точки. Для вы-

явления зависимости эффективности лечения от исходного состояния опухолевой ткани (активный рост или дегенеративно-дистрофическое состояние) использовался корреляционный анализ Пирсона (r).

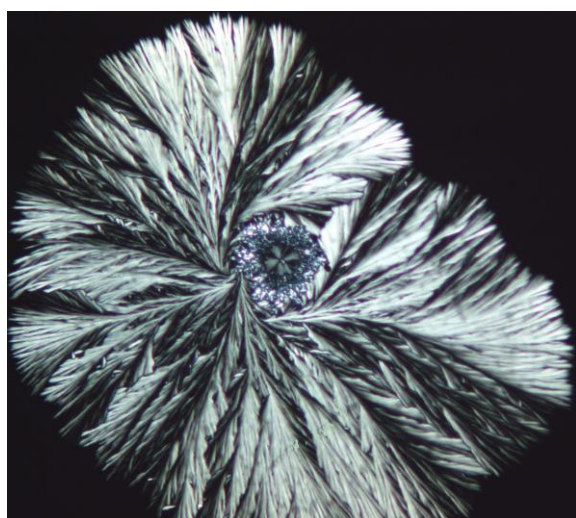
Результаты и обсуждение. При поступлении в стационар анизоморфоны сыворотки крови больных раком гортани были представлены двумя видами: маркером злокачественного роста (МЗР) и маркером дегенеративно-дистрофического процесса (МДД) [10].

МЗР представлял собой агрегацию базисного сферолита, в центре которого располагался микросферолит с зернистой структурой (рис. 2а). Данная агрегация имела равномерную степень выраженности анизотропии. МДД также был представлен агрегацией базисного сферолита с зернистым микросферолитом. Однако отличие этой агрегации от МЗР состояло в более низкой степени анизотропии базисного

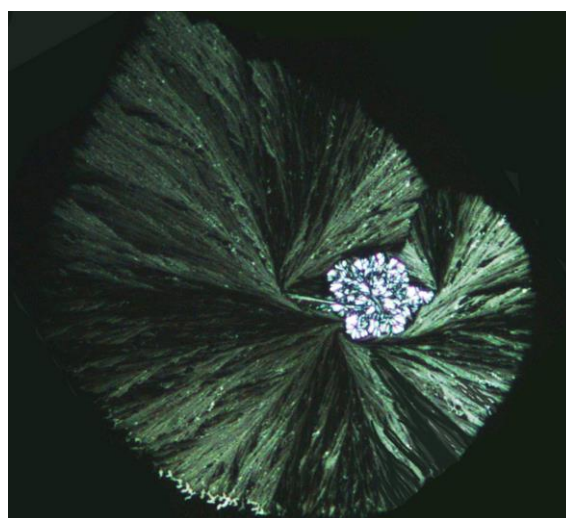
сферолита при резко выраженной анизотропии встроенного в него микросферолита, который имел вид ярко светящегося «глазка» (рис. 2б).

При первичном исследовании 64 больных раком гортани МЗР был выявлен у 36 (56 %), а МДД – у 28 (44 %) чел. На основании клинико-лабораторных показателей 23 больным было проведено хирургическое лечение, а 41 больной получил курс лучевой терапии по радикальной программе. В ходе дальнейших исследований в сыворотке крови наблюдаемых больных была отмечена смена видов анизоморфонов на этапах лечения и в процессе последующего амбулаторного наблюдения.

Сопоставление клинических данных и результатов морфологических исследований показало, что эффективность определенного вида лечения зависела от стадии развития опухолевого процесса, которая устанавливалась по онкомаркерам: МЗР и МДД (табл. 1).



а



б

Рис. 2. Анизоморфоны сыворотки крови:
а) маркер злокачественного роста; б) маркер дегенеративно-дистрофического процесса.
Ув. $\times 200$. Микроскопия в поляризованном свете

Fig. 2. Blood serum anisomorphone:
a) malignant growth marker; b) marker degenerative-dystrophic process marker.
Zoom $\times 200$. Polarized light microscopy

Данные табл. 1 показывают значительные различия результатов хирургического лечения и лучевой терапии в зависимости от вида онкомаркеров в сыворотке крови больных раком гортани. Так, из 23 пациентов, которым было проведено хирургическое лечение, 14 пациентов имели МЗР. Из них 9 чел. после операции

оставались живыми в течение двух лет наблюдения, а 5 погибли (трое – через 2 мес. после операции, 2 – через 4 и 6 мес.). Больные, в сыворотке крови которых выявлялся МДД (9 пациентов), оставались в живых в течение всего срока наблюдения.

Таблица 1
Table 1

Результаты лечения больных раком гортани в зависимости от вида структурных онкомаркеров в сыворотке крови

Treatment outcomes of laryngeal cancer patients depending on structural tumor markers in blood serum

Результат лечения Treatment outcomes	Хирургическое лечение Surgical treatment (n=23)		Лучевая терапия Radiotherapy (n=41)	
	МЗР Malignant growth marker (n=14)	МДД Degenerative- dystrophic process marker (n=9)	МЗР Malignant growth marker (n=22)	МДД Degenerative- dystrophic process marker (n=19)
Положительный Positive	9	9	22	8
Летальный исход Mortality	5	0	0	11

В группе больных, получивших курс радикальной лучевой терапии (41 чел.), у 22 пациентов до начала лечения в сыворотке крови был выявлен МЗР. После проведенной лучевой терапии все они оставались в живых в течение всего срока наблюдения. У 19 пациентов до начала лечения был выявлен МДД. Здесь наблюдался значительно худший результат лечения: только 8 больных оставались живыми на конец срока наблюдения, а остальные 11 погибли: 7 – через 1–2 мес., 4 – через 5–7 мес. после проведенного курса лечения.

При исследовании морфологической картины сыворотки крови 11 больных раком гортани после курса лучевой терапии с последующим летальным исходом у всех были выявлены особые, не обнаруживаемые до лечения маркеры в виде волнистых микросферолитов (ВМС). Они располагались изолированно, т.е. не были встроены в базисные сферолиты, а вместо зернистости (рис. 3а) в них определялись волнообразные структуры (рис. 3б). Следует отметить, что у двух пациентов данный маркер обнаруживался одновременно с выявлением клинических признаков прогрессии злокачественного роста, а у девяти – на два месяца раньше их клинической манифестации. Появление ВМС в сыворотке крови больных после курса лучевой терапии указывает на продолженный рост опухоли. То есть используемая доза лучевого воздействия на опухольную клетку, находящуюся в фазе покоя

(МДД) и имеющую резистентность к любым внешним воздействиям, оказывает не угнетающий, а стимулирующий эффект. Это вызывает мутацию исходного пула клеток с последующим возникновением более злокачественного клона. Структура ВМС формируется специфическими белковыми молекулами, которые вырабатываются клетками нового злокачественного клона. Наши исследования показали, что появление ВМС указывает на неблагоприятное течение онкологического процесса ($p=0,043$).

При сопоставлении результатов лечения больных с наличием МЗР выявлено, что эффективность лучевой терапии по сравнению с хирургическим лечением достоверно выше ($p=0,02$).

При сравнении результатов лечения больных с МДД установлена обратная зависимость: эффективность лучевой терапии оказалась достоверно ниже, чем при хирургическом лечении ($p=0,01$).

При помощи корреляционного анализа Пирсона в группах хирургического лечения выявлена прямая умеренная зависимость между фазой процесса в опухоли (злокачественный рост или дегенеративно-дистрофический процесс) и эффективностью лечения ($r=0,447$; $p=0,013$). В группе лучевой терапии установлена прямая зависимость между активностью опухоли и эффективностью лечения ($r=0,247$; $p<0,05$).

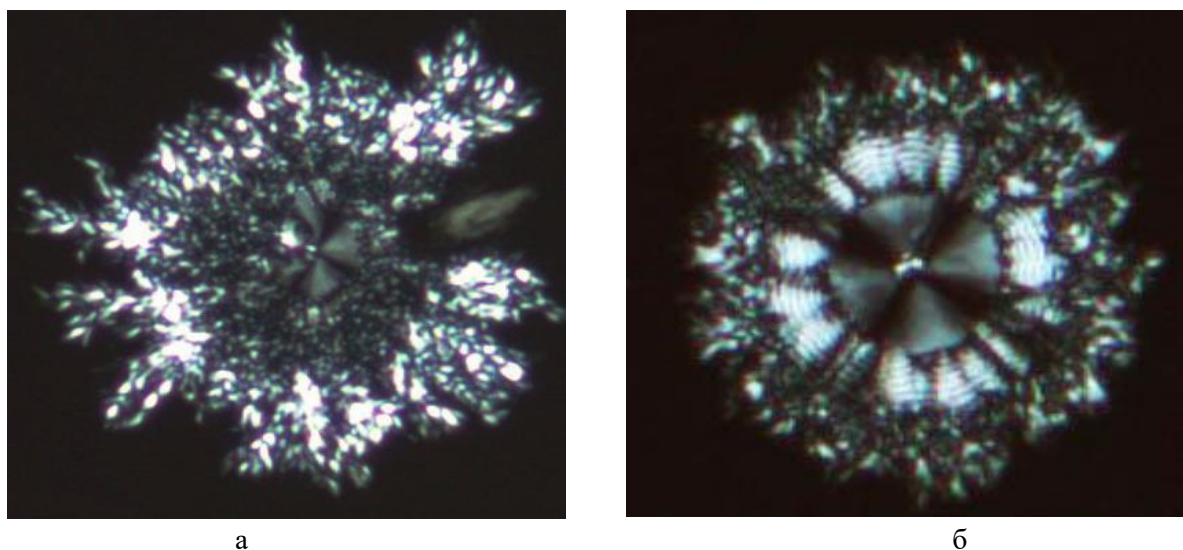


Рис. 3. Анизоморфоны сыворотки крови:
а) зернистый микросферолит; б) волнистый микросферолит.
Ув. $\times 800$. Микроскопия в поляризованном свете

Fig. 3. Blood serum anisomorphone:
a) granular microspherulite; b) wavy microspherulite. Zoom $\times 800$. Polarized light microscopy

Таким образом, среди анизоморфонов сыворотки крови больных раком гортани выявлены три вида маркерных структур: маркер активного роста злокачественной опухоли (патологическая агрегация базисного сферолита и зернистого микросферолита с одинаковой степенью анизотропии); маркер дегенеративно-дистрофического процесса (аналогичная агрегация, но с низкой степенью анизотропии базисного сферолита при высокой анизотропии встроенного микросферолита); маркер прогрессии злокачественного роста (волнистый микросферолит вне агрегации).

Полученные результаты показывают, что состояние активности опухоли (активный рост или дегенеративно-дистрофический процесс) служит важным критерием выбора вида лечения: в фазу дегенеративно-дистрофического процесса рака гортани наиболее благоприятный эффект достигается при хирургическом лечении, а в период активной фазы зло-

качественного роста – при помощи лучевой терапии.

Выводы:

1. Морфологическое исследование сыворотки крови больных раком гортани методом краевой дегидратации позволяет выявить специфические маркеры злокачественного роста, указывающие на фазу его активности.

2. При наличии в сыворотке крови больных раком гортани маркера дегенеративно-дистрофического состояния опухоли показано хирургическое лечение, а выявление маркера активности злокачественного роста указывает на необходимость применения лучевой терапии.

3. Выявление в сыворотке крови больного раком гортани в процессе лучевой терапии маркерной структуры в виде волнистого микросферолита указывает на отрицательный результат лечения – продолженный рост опухоли.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Раджабова З.А., Котов М.А., Эберт М.А., Митрофанов А.С., Раджабова М.А., Левченко Е.В. Распространенный рак гортани: обзор литературы. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (5): 97–107. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-97-107.

2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.; 2019. 250.
3. Кожанов А.Л. Современные аспекты лечения и реабилитации больных при раке гортани. Опухоли головы и шеи. 2016; 6 (2): 17–26.
4. Edge S.B., Bynd D.R., Compton C.C., Fritz A.L., Trotti A. Laryngs AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer; 2010: 57–62.
5. Медведева А.А., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Фролова И.Г., Чижевская С.Ю., Чойнзонов Е.Л., Черемисина О.В., Гольдберг А.В. Радионуклидные методы исследования в диагностике рака гортани и гортаноглотки. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (6): 57–66.
6. Paget-Boilly S., Cyr D., Luce D. Occupational exposures and cancer of the laryngs-systematic review and meta analysis. J. Occup. Environ. Med. 2012; 54 (1): 71–84.
7. Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярно-биологические маркеры в практической онкологии. Лабораторная служба. 2014; 3 (1): 14–22.
8. Шатахина С.Н., Шабалин В.Н. Атлас структур неклочечных тканей человека в норме и патологии (в 3 томах). Т. II. Морфологические структуры сыворотки крови. М.; 2013. 238.
9. Шатахина С.Н., Шабалин В.Н. Маркеры злокачественного роста в морфологической картине биологических жидкостей человека. Вестник онкологии. 2010; 3 (56): 293–300.
10. Шабалин В.Н., Шатахина С.Н. Функциональная морфология неклочечных тканей человека. М.: РАН; 2019. 360.

Поступила в редакцию 06.07.2021; принята 16.07.2021.

Авторский коллектив

Шабалин Владимир Николаевич – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: shabalin.v2011@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1861-759X>.

Шатахина Светлана Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского». 129110, Россия, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2; e-mail: sv_n@list.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9441-4383>.

Дедова Мария Георгиевна – научный сотрудник отделения оториноларингологии, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского». 129110, Россия, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2; e-mail: dedova.marica@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3835-1119>.

Образец цитирования

Шабалин В.Н., Шатахина С.Н., Дедова М.Г. Мониторинг динамики активности злокачественного роста методом структурного анализа неклочечной ткани. Ульяновский медико-биологический журнал. 2021; 3: 89–96. DOI: 10.34014/2227-1848-2021-3-89-96.

MONITORING OF MALIGNANT GROWTH DYNAMICS BY STRUCTURAL ANALYSIS OF NON-CELLULAR TISSUE

V.N. Shabalin¹, S.N. Shatokhina², M.G. Dedova²

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia;

² Moscow Regional Clinical Research Institute named after M.F. Vladimirovsky, Moscow, Russia

The authors examined the composition of biocrystalline structures (anisomorphones) of blood serum in patients with laryngeal cancer. Such structures are formed when blood serum becomes solid, i.e. during its marginal dehydration. The revealed anisomorphones represent three types of marker structures: a marker of a malignant tumor active growth (the aggregation of macroferolite and granular microspherolite with

the same degree of anisotropy); a marker of a degenerative-dystrophic process (the aggregation of a microspherulite with a low degree of anisotropy and microspherulite with a high degree of anisotropy); a marker of a malignant growth progression (a wavy microspherulite without aggregation).

The aim of the study is to identify diagnostic markers of the malignant process activity in the solid phase structures of the blood serum in patients with laryngeal cancer and to assess their importance for choosing an effective therapy.

Materials and Methods. Marginal dehydration of blood serum was used as the main research method. It is a part of the "Litos-system" diagnostic technology (Marketing authorization FS No. 155, of 2009).

Results. It has been shown that the developmental phase of laryngeal cancer (active growth or degenerative-dystrophic process) is an important criterion for choosing treatment options. Surgical treatment is the most effective during the degenerative-dystrophic tumor process, while radiation therapy is preferable during the active phase of malignant growth.

Key words: laryngeal cancer, blood serum, marginal dehydration of biological fluids, markers of tumor growth activity.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Radzhabova Z.A., Kotov M.A., Ebert M.A., Mitrofanov A.S., Radzhabova M.A., Levchenko E.V. Rasprostranennyy rak gortani: obzor literatury [Advanced laryngeal cancer: Literature review]. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2019; 18 (5): 97–107. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18--5-97-107 (in Russian).
2. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., red. *Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 godu (zabolevaemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2018 (Morbidity and mortality)]. Moscow; 2019. 250 (in Russian).
3. Kozhanov A.L. Sovremennyye aspekty lecheniya i rehabilitatsii bol'nykh pri rake gortani [Current aspects of treatment and rehabilitation of patients with laryngeal cancer]. *Opukholi golovy i shei*. 2016; 6 (2): 17–26 (in Russian).
4. Edge S.B., Bynd D.R., Compton C.C., Fritz A.L., Troiti A. *Laryngs AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010: 57–62.
5. Medvedeva A.A., Chernov V.I., Zel'chan R.V., Sinilkin I.G., Frolova I.G., Chizhevskaya S.Yu., Choynzonov E.L., Cheremisina O.V., Gol'dberg A.V. Radionuklidnye metody issledovaniya v diagnostike raka gortani i gortanoglotki [Nuclear medicine imaging in the detection of locally advanced laryngeal and hypopharyngeal cancer]. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2017; 16 (6): 57–66 (in Russian).
6. Paget-Boilly S., Cyr D., Luce D. Occupational exposures and cancer of the larynx-systematic review and meta analysis. *J. Occup. Environ. Med.* 2012; 54 (1): 71–84.
7. Nemtsova M.V., Kushlinskiy N.E. Molekulyarno-biologicheskie markery v prakticheskoy onkologii [Molecular biological markers in practical oncology]. *Laboratornaya sluzhba*. 2014; 3 (1): 14–22 (in Russian).
8. Shatokhina S.N., Shabalin V.N. *Atlas struktur nekletochnykh tkaney cheloveka v norme i patologii (v 3 tomakh)* [Atlas of structures of human non-cellular tissues in health and disease (in 3 volumes)]. T. II. Morfologicheskie struktury syvorotki krovi. Moscow; 2013. 238 (in Russian).
9. Shatokhina S.N., Shabalin V.N. Markery zlokachestvennogo rosta v morfologicheskoy kartine biologicheskikh zhidkostey cheloveka [Malignant growth markers in the morphological pattern of human biological fluids]. *Vestnik onkologii*. 2010; 3 (56): 293–300 (in Russian).
10. Shabalin V.N., Shatokhina S.N. *Funktsional'naya morfologiya nekletochnykh tkaney cheloveka*. Moscow: RAN; 2019. 360 (in Russian).

Received July 06, 2021; accepted July 16, 2021.

Information about the authors

Shabalin Vladimir Nikolaevich, Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Science (Medicine), Chief Researcher, Institute of General Pathology and Pathophysiology. 125315, Russia, Moscow, Baltiyskaya St., 8; e-mail: shabalin.v2011@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1861-759X>.

Shatkhina Svetlana Nikolaevna, Doctor of Science (Medicine), Professor, Head of the Chair of Clinical Laboratory Diagnostics, Moscow Regional Clinical Research Institute named after M.F. Vladimirsky. 129110, Russia, Moscow, Shchepkin St., 61/2; e-mail: sv_n@list.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9441-4383>.

Dedova Mariya Georgievna, Researcher, Department of Otorhinolaryngology, Moscow Regional Research Clinical Institute named after M.V. M.F. Vladimirsky. 129110, Russia, Moscow, Shchepkin St., 61/2; e-mail: dedova.marica@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3835-1119>.

For citation

Shabalin V.N., Shatkhina S.N., Dedova M.G. Monitoring dinamiki aktivnosti zlokachestvennogo rosta metodom strukturnogo analiza nekletchnoy tkani [Monitoring of malignant growth dynamics by structural analysis of non-cellular tissue]. *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskij zhurnal*. 2021; 3: 89–96. DOI: 10.34014/2227-1848-2021-3-89-96 (in Russian).