Развитие методов спектроскопии высокого разрешения для медицинских исследований тканей патологий ЛОР-органов

© В.Л. Вакс [1,2], А.А. Айзенштадт [1,3], Е.Г. Домрачева [1,2], М.Б. Черняева [1,2], В.А. Анфертьев [1], К.А. Глушкова [1,3], А.С. Черняева [1]

[1] Институт физики микроструктур РАН, Нижний Новгород, Россия
[2] Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
[3] Детская городская клиническая больница № 1, Нижний Новгород, Россия
E-mail: elena@ipm.sci-nnov.ru

Поступило в Редакцию 15 апреля 2025 г.
В окончательной редакции 10 июня 2025 г.
Принято к публикации 11 июня 2025 г.

Изучен химический состав продуктов термического разложения первичных метаболитов (больших биологических молекул), специфичных для тканей опухолей органов уха, горла и носа, с помощью терагерцевой спектроскопии высокого разрешения на примере образцов относительно здоровых слизистых оболочек и таких новообразований, как папилломы миндалин и гортани и холестеатомы среднего уха. Выявлен ряд соединений семейства органических кислот, альдегидов, нитрилов, других органических соединений, линии поглощения которых в спектрах относительно здоровых тканей отсутствуют. Показана потенциальная возможность использования терагерцевой спектроскопии высокого разрешения для анализа метаболического состава тканей новообразований.

Ключевые слова: спектроскопия высокого разрешения, терагерцевый диапазон, метаболиты, ЛОР-органы.

DOI: 10.61011/PJTF.2025.18.61078.7817

В настоящее время в мире активно развиваются метаболические подходы для диагностики различных заболеваний и патологий. Среди физико-химических методов, используемых для выявления метаболитов-маркеров патологий в биологических образцах (газовых или жидкостных), можно выделить прежде всего хроматографические методы, часто совмещенные с масс-спектрометрией, а также спектроскопические методы. Однако исследование тканей проводится только с использованием гистологического или химического анализа. Среди патологий тканей органов уха, горла, носа (ЛОР-органов), диагностика которых на ранних стадиях имеет важнейшее значение, можно выделить новообразования (как доброкачественные, так и злокачественные). В одном из последних статистических обзоров по базе данных GLOBOCAN среди 20 миллионов случаев рака, диагностированных за 2022 г., рак гортани встречался в 188 960 случаях (0.9 %), рак носоглотки — в 120 416 случаях (0.6 %), ротоглотки — в 106 316 случаях (0.5 %) [1]. Опухоли ЛОР-органов, хотя и относятся к достаточно редким заболеваниям по сравнению с раком легких, предстательной железы, молочной железы, часто создают трудности в диагностике и лечении. Несмотря на значительный прогресс в хирургии, онкологии и радиотерапии, прогноз при их лечении по-прежнему может быть неблагоприятным.

К современным клиническим методам выявления опухолей в областях ЛОР-органов относятся следующие. Носовая эндоскопия с использованием тонкой трубки с подсветкой и камерой для осмотра внутренней части носа; биопсия, подразумевающая взятие образца клеток из носа или пазух, что может осуществляться во время назальной эндоскопии с помощью инструментов, вводимых в трубку, для забора клеток, а также с использованием тонкой иглы, вставляемой непосредственно в подозрительную область для сбора образца клеток. Образцы отправляются в лабораторию для тестирования. Кроме того, могут проводиться визуализационные тесты, применяемые для опухолей носа и околоносовых пазух, включающие рентген и сканирование, такое как компьютерная томография, магнитно-резонансная томография и позитронно-эмиссионная томография [2,3]. Среди методов визуализации, применяемых в исследованиях тканей ЛОР-органов при патологиях, можно выделить цифровую диафаноскопию и флуоресцентную визуализацию. В цифровой диафаноскопии применяется низкоинтенсивное излучение видимого и ближнего инфракрасного диапазонов для просвечивания пазух и дальнейшей визуализации картины рассеивания света. Для обработки сформированных цифровых изображений, на основе которых возможно выявление и диагностика заболеваний, применяются методы машинного обучения [4]. Визуализация на основе флуоресценции [5] основана на изменениях концентрации собственных флуорофоров ткани (например, ткани слизистой оболочки), происходящих при ее патологическом изменении. К таким флуорофорам относятся, в частности, коллаген, никотинамидадениндинуклеотид (NADH), флавиноадениндинуклеотид (FAD) и порфирин, присутствующие в тканях полости рта человека, содержание которых увеличивается при прогрессировании поражений слизистой оболочки полости рта, например при плоскоклеточном раке полости рта, в сравнении с диспластией и контрольной (нормальной) группой [6]. Эти методы неинвазивны, позволяют

выявить различия между здоровыми и патологически измененными тканями и могут быть использованы как по отдельности, так и в комбинации между собой, а также со спектроскопическими методами.

К перспективным стратегиям уточнения диагноза и улучшения лечения пациентов можно отнести выявление на основе молекулярных и генетических исследований биологических маркеров, таких как генетические аномалии и эпигенетические вариации, изменения в белковых структурах и других биологических молекулах, соответствующие опухолям определенного типа, которые позволяют уточнить диагноз, сделать прогноз и уточнить проводимую терапию.

В обзоре [7] систематизированы типы опухолей придаточных пазух носа (аденоидно-кистозная карцинома, плоскоклеточная карцинома, аденокарциномы кишечного и некишечного типов, обонятельная нейробластома, мультифенотипическая синоназальная карцинома, связанная с вирусом папилломы человека, меланома слизистой оболочки, синоназальная недифференцированная карцинома, синоназальная карцинома с дефицитом комплекса SWI/SNF, NUT-карцинома, тератокарциносаркома, синоназальная нейроэндокринная карцинома, хондросаркома, недифференцированные мелкокруглоклеточные саркомы). Для каждого типа собраны выявленные характерные изменения на генетическом уровне, мутации и генетические аномалии, в частности для некоторых типов опухолей (например, мутации IDH1/2 для хондросаркомы) связанные с более длительной выживаемостью и открытые для терапевтических целевых стратегий. В обзоре [8], посвященном выявлению характерных биомаркеров трех основных гистологических образцов синоназальных опухолей, а именно плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы кишечного типа и обонятельной нейробластомы, целью являются иммуногистохимические маркеры, такие как специфический белок опухолевой клетки (Ki-67), внутриклеточный белок-ингибитор циклинзависимых киназ (p21, p27), белок — транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл (p53), сигнальные белки — фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и др. В обзоре выявлены закономерности в изменении (возрастании или снижении) экспрессии соответствующего белка при наличии злокачественных опухолей или перерождении новообразования из доброкачественного в злокачественное.

Спектроскопические подходы, в частности газовая спектроскопия на нестационарных эффектах терагерцевого (THz) частотного диапазона, обладающая высокой разрешающей способностью и чувствительностью одновременно, позволяют выявлять состав продуктов термического разложения тканей и могут дать важную информацию о различиях химического состава продуктов термического разложения здоровых и патологически измененных тканей, т. е. продуктов распада крупных биологических молекул при нагреве. Работа посвящена изучению химического состава продуктов термического разложения первичных метаболитов для тканей опухолей органов уха, горла и носа с помощью THz-спектроскопии высокого разрешения на примере образцов относительно здоровых слизистых оболочек и таких новообразований, как папилломы миндалин и гортани и холестеатомы среднего уха.

Для проведения исследований и выявления вторичных метаболитов патологически измененных тканей были выбраны такие нозологические единицы, как доброкачественные новообразования (пять папиллом миндалин и гортани и пять холестеатом среднего уха). В исследование включены десять пациентов, которые находились на стационарном лечении в ГБУЗ НО „ДГКБ № 1“ Приокского района“ (Нижний Новгород) в 2024 г. Возраст исследуемых был от 5 до 17 лет. Гендерное распределение: мальчики — 3, девочки — 7. Весь материал для исследования получен с использованием малоинвазивных вмешательств в рамках существующих стандартов Министерства здравоохранения РФ, которые не превышали необходимого оперативного лечения. Всем больным был проведен комплекс диагностических исследований для установления клинического диагноза и обоснования хирургического вмешательства в определенном объеме. С целью верификации диагноза удаленная ткань с оформлением „Направления на прижизненное патолого-анатомическое исследование биопсийного (операционного) материала“ подвергалась гистоморфологическому варианту исследования.

Спектроскопические измерения проводились с использованием разработанного авторами THz-спектрометра высокого разрешения с фазовой манипуляцией воздействующего на газ излучения с рабочим диапазоном 118–175 GHz [9]. Чувствительность спектрометра по регистрируемому коэффициенту поглощения при длине ячейки 1 m составляет от 10^{-8} до $5 \cdot 10^{-9}\,\mathrm{cm}^{-1}$. Такая чувствительность соответствует минимально обнаружимому коэффициенту поглощения (линии обнаружимы над уровнем шумов). Если вещество имеет достаточно сильные линии поглощения в этом диапазоне (с интегральной интенсивностью на уровне 10^{-3}–$10^{-4}\,\mathrm{nm}^2 \cdot \mathrm{MHz}$), то в многокомпонентной газовой смеси, где концентрация компонентов может быть очень мала, оно может быть зарегистрировано при концентрациях порядка 5–100 ppm. Если же соединение имеет более сильные линии в этом диапазоне (например, сероводород), то оно может быть обнаружено и при более низких концентрациях. В настоящей работе не проводились количественные оценки, а проводился только качественный анализ состава продуктов терморазложения образцов. При этом преимуществом данного спектрометра является возможность широкодиапазонных исследований, а следовательно, возможность выявления линий вращательного спектра всех полярных веществ смеси, имеющих спектральные линии необходимой интегральной интенсивности в рабочем диапазоне спектрометра. Процесс пробоподготовки и методов исследования состава смесей продуктов терморазложения

Химический состав продуктов термолиза образцов (N — среднее число линий поглощения в спектрах различных образцов, П — папиллома, Х — холестеатома, З — относительно здоровая слизистая носа)

Вещество	N			Вещество	N		
	П	Х	З		П	Х	З
Ацетон	15	3	0	Метилбутиронитрил	17	18	0
Гидроксиацетон	6	9	0	Пентадиеннитрил	31	24	0
Дигидроксиацетон	3	6	0	Аминопропионитрил	6	10	0
Уксусная кислота	11	9	0	Акрилонитрил	8	7	0
Изоциановая кислота	6	12	0	Аминоацетонитрил	5	4	0
Метанол	14	7	8	Метилмеркаптан	53	51	6
Пропандиол	68	34	3	Глицин	3	6	0
Аланинол	13	6	0	Аланин	5	8	0
Глицерин	9	2	0	Мочевина	7	11	0
Метилформиат	5	9	0	Этиленгликоль	12	5	0
Ацетальдегид	57	76	39	Пиролл	10	13	8
Пропаналь	10	9	1	Пиридин	9	17	0
Бензальдегид	9	9	0	Цианоксиран	3	3	0
Гликольальдегид	6	13	2	Глицинамид	9	4	0
Малоновый диальдегид	3	3	0	Гликольамид	3	5	0
Ацетонитрил	11	19	1	Цианоэтинилбензол	10	14	0
Пропионитрил	21	38	0	Циановинилацетилен	5	3	0
Бутиронитрил	16	20	2	Сероокись углерода	6	11	2
Пентаннитрил	16	13	1	Диоксид серы	12	13	1
Бензонитрил	5	7	2	Сульфид этилена	3	4	3

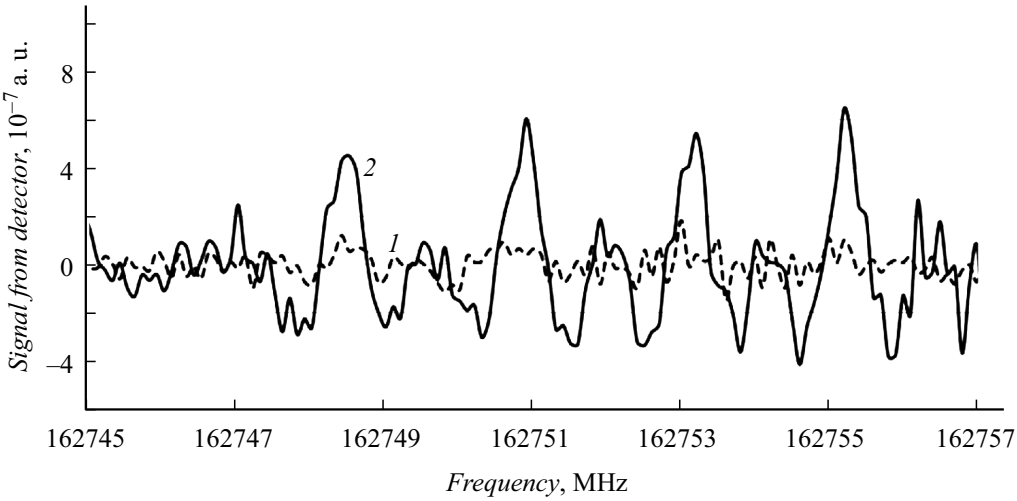
тканей был разработан и описан ранее [10], поэтому здесь мы приводим только краткое его описание. Исследуемые образцы тканей нагревались, смесь продуктов термического разложения напускалась в предварительно вакуумированную измерительную ячейку. По выявленным спектральным линиям с использованием электронных спектроскопических баз данных [11,12] идентифицировались вещества, являющиеся продуктами термораспада более крупных биологических молекул, состав которых различается для здоровых и патологически измененных тканей. Для качественной оценки и сравнения химического состава образцов использовался подход с подсчетом количества линий поглощения для каждого идентифицированного вещества, что при одинаковых условиях измерений позволяет выявить качественное сходство и различие между образцами. Исследуемыми образцами новообразований были образцы папилломы миндалин и гортани и холестеатомы среднего уха. Состав продуктов термического разложения сравнивался с составом относительно здоровых слизистых оболочек.

В ходе исследования состава образцов папиллом миндалин и гортани (пять образцов) и холестеатомы среднего уха (пять образцов) и сравнения их с образцами относительно здоровой слизистой носа (пять образцов) был выявлен ряд веществ, среднее количество выявленных линий для которых представлено в таблице.

В спектрах образцов относительно здоровой слизистой оболочки и в спектрах опухолевых тканей идентифицируются линии поглощения метанола, пропандиола, ацетальдегида, пиррола, сульфида этилена. Однако их относительная концентрация в продуктах термораспада образцов тканей новообразований выше, чем в случае относительно здоровых тканей. Кроме того, выявлен ряд соединений семейства органических кислот, альдегидов, нитрилов, других органических соединений, линии поглощения которых в спектрах относительно здоровых тканей отсутствуют. Пример участка спектров продуктов термолиза тканей для двух образцов (папилломы глотки и относительно здоровой слизистой) приведен на рисунке. Из рисунка видно различие в химических составах продуктов термолиза образца папилломы глотки и относительно здоровой слизистой на примере пиридина.

Представленный подход дает возможность качественного определения состава продуктов терморазложения тканей и потенциально по чувствительности для ряда веществ может быть сопоставлен с таким методом, как газовая хроматография, совмещенная с масс-спектрометрией, однако данных по исследованию тканей ЛОР-органов с использованием последнего в литературе нет.

Идентификация сходных веществ в опухолевых тканях и выявление различий между опухолями разных видов, а также отличия от веществ в здоровых неизмененных тканях может стать первым шагом к определению метаболического профиля тканей при опухолевом процессе в целом, а также метаболического профиля продуктов термического разложения тканей для конкретной патологии. Таким образом, показана потенциальная возможность использования THz-спектроскопии высокого



Запись участка спектров продуктов термолиза тканей для двух образцов (*1* — относительно здоровой слизистой, *2* — папилломы глотки) с линиями поглощения пиридина. Центральные частоты в образце папилломы: $f_{exp} = 162\,748.5$ MHz ($f_{theor} = 162\,748.4937$ MHz), $f_{exp} = 162\,750.9$ MHz ($f_{theor} = 162\,750.8999$ MHz), $f_{exp} = 162\,753.2$ MHz ($f_{theor1} = 162\,753.1032$ MHz, $f_{theor2} = 162\,753.4681$ MHz), $f_{exp} = 162\,755.2$ MHz ($f_{theor} = 162\,755.242$ MHz). f_{exp} — экспериментально измеренная центральная частота линии поглощения, f_{theor} — центральная частота линии поглощения из каталога [9].

разрешения для анализа метаболического состава тканей новообразований.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-19-00623, https://rscf.ru/project/24-19-00623/).

Соблюдение этических стандартов

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От законных представителей каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, I. Soerjomataram, A. Jemal, CA Cancer J. Clin., **74** (3), 229 (2024). DOI: 10.3322/caac.21834

[2] M.G.M. Hunink, R.G.M. de Slegte, G.J. Gerritsen, H. Speelman, Neuroradiology, **32**, 220 (1990). DOI: 10.1007/BF00589116

[3] H. Ninomiya, N. Oriuchi, N. Kahn, T. Higuchi, K. Endo, K. Takahashi, K. Chikamatsu, H. Kamada, N. Furuya, Ann. Nucl. Med., **18** (1), 29 (2004). DOI: 10.1007/BF02985611

[4] E.O. Bryanskaya, V.V. Dremin, V.V. Shupletsov, A.V. Kornaev, M.Yu. Kirillin, A.V. Bakotina, D.N. Panchenkov, K.V. Podmasteryev, V.G. Artyushenko, A.V. Dunaev, J. Biophoton., **16** (9), e202300138 (2023). DOI: 10.1002/jbio.202300138

[5] E.O. Bryanskaya, A.Y. Vinokurov, A.I. Dolgikh, A.V. Dunaev, P.R. Angelova, A.Y. Abramov, Biochim. Biophys. Acta — General Subjects, **1868** (1), 130520 (2024). DOI: 10.1016/j.bbagen.2023.130520

[6] A.N. Sah, P. Kumar, A. Pradhan, J. Fluoresc., **33**, 1375 (2023). DOI: 10.1007/s10895-023-03152-z

[7] M. Turri-Zanoni, G. Gravante, P. Castelnuovo, Current Oncol. Rep., **24**, 55 (2022). DOI: 10.1007/s11912-021-01154-3

[8] D. Lucidi, C. Cantaffa, M. Miglio, F. Spina, M. Alicandri Ciufelli, A. Marchioni, D. Marchioni, Int. J. Mol. Sci., **24**, 2670 (2023). DOI: 10.3390/ijms24032670

[9] В.Л. Вакс, В.А. Анфертьев, В.Ю. Балакирев, С.А. Басов, Е.Г. Домрачева, А.В. Иллюк, П.В. Куприянов, С.И. Приползин, М.Б. Черняева, УФН, **190** (7), 765 (2020) DOI: 10.3367/UFNr.2019.07.038613 [V.L. Vaks, V.A. Anfertev, V.Yu. Balakirev, S.A. Basov, E.G. Domracheva, A.V. Illyuk, P.V. Kupriyanov, S.I. Pripolzin, M.B. Chernyaeva, Phys. Usp., **63** (7), 708 (2020). DOI: 10.3367/UFNe.2019.07.038613].

[10] В.Л. Вакс, В.А. Анфертьев, Е.Г. Домрачева, М.Б. Черняева, А.А. Айзенштадт, К.А. Глушкова, А.С. Черняева, Журн. радиоэлектроники, **11**, 1 (2024). DOI: 10.30898/1684-1719.2024.11.27

[11] H.M. Pickett, R.L. Poynter, E.A. Cohen, M.L. Delitsky, J.C. Pearson, H.S.P. Müller, J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer, **60** (5), 883 (1998). DOI: 10.1016/S0022-4073(98)00091-0a

[12] C.P. Endres, S. Schlemmer, P. Schilke, J. Stutzki, H.S.P. Müller, J. Mol. Spectrosc., **327**, 95 (2016). https://cdms.astro.uni-koeln.de/cgi-bin/cdmssearch