

А.И. Арсеньев, А.В. Нефедова, А.А. Ганеев, А.О. Нефедов, С.Н. Новиков, А.А. Барчук, С.В. Канаев, И.Э. Джагацпанян, А.Р. Губаль, А.С. Кононов, С.А. Тарков, Н.Ю. Аристидов

Комбинированная ранняя диагностика рака лёгких определением состава выдыхаемого воздуха неселективным методом анализа летучих органических соединений с использованием металлооксидных сенсоров с перекрестной чувствительностью и цитологическим исследованием мокроты

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

В статье проведен анализ данных литературы и обобщен собственный опыт использования комбинированного метода диагностики рака легкого с помощью определения состава выдыхаемого воздуха неселективным методом с использованием металлооксидных хеморезисторных газовых сенсоров с перекрестной чувствительностью и цитологического исследования мокроты. Летучие органические соединения выдыхаемого воздуха изменяют проводимость сенсора, возникающий импульс отображается как пик на графике, площадь которого используется при математических расчетах. Такое сочетание диагностических методик у 204 участников продемонстрировало возможность неинвазивно выявлять заболевание на ранней стадии. Показатели чувствительности, специфичности и точности при анализе проб выдыхаемого воздуха составили 91,2%, 100% и 93,4% соответственно. Совместное использование определения состава выдыхаемого воздуха и цитологического исследования мокроты по сравнению с изолированным использованием анализа ЛОС, позволяет статистически значимо ($p=0,03$) повысить чувствительность до 96,8% (95% CI: 80,9%-99%), с некоторым допустимым снижением специфичности — 93,4% (95% CI: 88%-96%). Быстрота выполнения анализа и проведение измерений в реальном времени позволяют использовать метод в ранней диагностике.

Ключевые слова: скрининг, рак легкого, газоанализатор, выдыхаемый воздух, цитологическое исследование мокроты

Введение

Ежегодно в мире регистрируется более 1 300 000, а в России — более 50 000 случаев рака лёгкого (РЛ), который является одним из наиболее часто встречающихся и характеризующихся обычно неблагоприятным прогнозом он-

кологическим заболеванием. Несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики и лечения РЛ, пятилетняя выживаемость и в настоящее время сохраняется на уровне 70-х годов XX века, не превышая 15-20% [2, 4]. Внедрение программ профилактики и скрининга при определенных локализациях опухолей может стать ключевым фактором в снижении онкологической смертности. Скрининг рака должен быть приемлемым для массового использования, недорогим, обладать высокой чувствительностью и специфичностью, высокой положительной и отрицательной предсказательной ценностью, а также быть безболезненным и безопасным для пациента.

Именно этап первичной диагностики опухоли на основе современных, высокотехнологичных методов является ключевым моментом, позволяющим выявить РЛ на ранней стадии и обоснованно рассчитывать на улучшение отдаленных результатов лечения. К нелучевым методам, которые используются при ранней диагностике РЛ традиционно относится стандартное цитологическое исследование мокроты (ЦИМ), а в последнее осуществляются попытки анализа газового состава выдыхаемого воздуха.

ЦИМ основано на поиске при микроскопии опухолевых клеток, метаплазии и дисплазии в образцах мокроты и позволяет нередко установить не только злокачественную природу процесса, но и конкретную морфологическую разновидность РЛ. ЦИМ считается легко воспроизводимым, неинвазивным и недорогим методом ранней диагностики РЛ, имеет высокую специфичность, достигающую 98% [3, 5, 6]. При центральном раке опухолевые клетки в мокроте удается обнаружить у 52-88% больных: при периферическом у 33-61%. Впервые возможность использования цитологического исследования мокроты в качестве скрининга РЛ была описана в 1960-х годах. Совершенствование методов цитологической диагностики в 80-х годах прошлого века привело к появлению новых подходов

к анализу клеточного материала — принципа автоматизированной цитометрии, подразумевающего количественный анализ ряда характеристических отдельных клеток препарата [1, 7].

М.К. Nakhleh et al. в 2017 г. описали способ скрининга злокачественных опухолей органов грудной полости, базирующийся на использовании электронного носа «NaNose» с массивом сенсоров на основе наночастиц золота (Au) с различными поверхностными модификаторами и сетей углеродных нанотрубок. Неорганические наноматериалы этих датчиков обеспечивают электропроводность, а органический слой функционирует как чувствительный элемент для распознавания адсорбированных низкомолекулярных летучих органических соединений (ЛОС). Адсорбция ЛОС органической пленкой влияет на туннелирование электронов путем обратимого набухания или агрегации слоев, что увеличивает или уменьшает расстояние между частицами и приводит, соответственно, к увеличению или уменьшению электрического сопротивления пленки. Диэлектрическая проницаемость органической матрицы, окружающей металлические сердечники, увеличивается. Химическое разнообразие как проводящих неорганических наноматериалов, так и органических слоев приводит к тому, что датчики реагируют по-разному на ЛОС выдыхаемого воздуха, что создает уникальные «отпечатки дыхания». Недостатком способа является недостаточная чувствительность: 57-86%, при специфичности 43-84% для каждого классификатора [3].

Материал и методы

Для отбора проб выдыхаемого воздуха применялся газоанализатор «электронный нос» (E-nose) на базе массива высокочувствительных сенсоров с перекрестной чувствительностью к широкому спектру неорганических газов и паров ЛОС. Анализ осуществлялся с использованием 7 металлоксидных хеморезисторных газовых сенсоров при последовательно устанавливаемых температурах 350, 400 и 450 °С. При выявлении в отклике сенсоров на состав выдыхаемого воздуха статистически значимых отличий от контрольных значений и одновременном обнаружении в микропрепаратах дисплазии и клеток рака диагностировали злокачественную опухоль. Способ применён у 204 участников — 121 (59,3%) мужчин и 83 (40,7%) женщин; средний возраст составил 51 год. Разброс амплитуды откликов (пиков) при каждой температуре составил от 2 до 15% в зависимости от типа сенсора. При попадании ЛОС выдыхаемого воздуха на поверхность чувствительного слоя сенсора происходят процессы окисления/восстановления, в результате чего изменяется проводимость сенсора и возникает импульс, что отображается как пик на графике. В качестве аналитического сигнала берется интеграл пика и усредняется среди двух измерений для каждого из 7 сенсоров, в итоге для каждого пациента получается 21 значение, формирующее «отпечаток выдоха».

Металлоксидные сенсоры относятся к хеморезисторным газовым сенсорам, принцип действия которых ос-

нован на детектировании изменения сопротивления слоя оксида металла (SnO_2 , WO_3 , ZnO) в результате окисления или восстановления на его поверхности различных газов. Рабочая температура сенсоров такого типа находится в диапазоне 200-500 °С. При различных температурах один и тот же сенсор обладает различной относительной чувствительностью к анализируемым соединениям, что позволяет виртуально увеличить количество используемых сенсоров. Каждый сенсор представляет собой многослойную структуру, состоящую из полупроводникового газочувствительного слоя (собственно сенсора), диэлектрической подложки из оксида алюминия и слоя нагревателя. Полупроводниковый слой и слой нагревателя наносятся на разные стороны диэлектрической подложки методом трафаретной печати. Полупроводниковый газочувствительный слой состоит из наночастиц диоксида олова с различными каталитическими добавками платины и/или палладия. Во время измерений температуры всех сенсоров ступенчато изменяли до 350, 400 и 450 °С. На каждой из 3 температурных площадок дожидались установления показаний сенсоров. Преимущества разработанного метода определяются двумя основными факторами: 1) при трех различных температурах один и тот же сенсор меняет чувствительность, позволяя виртуально втрое увеличивать количество детекторов (с 7 до 21); 2) анализ выдыхаемого воздуха осуществляется путем непосредственных одновременных одномоментных «online» измерений, предотвращая появление неконтролируемых систематических погрешностей и существенно увеличивая производительность метода. Для оценки параметров измерения и характеристик мультисенсорной системы были проведены градуировки сенсоров по 3 веществам: этанол, 1-пропанол, аммиак.

Сбор мокроты для цитологического исследования осуществляли без индукции в контейнеры объемом 50 мл, содержащие 25 мл фиксатора. Затем образцы помещают в холодильник (температурный режим от +2 до +8 °С) на срок не более 4 часов перед дальнейшей обработкой. Из полученных образцов готовили 4 препарата, которые окрашивали гематоксилином-эозином, затем производили морфологическую оценку материала, с последующим распределением по диагностическим группам «Системы общества Папаниколау цитоморфологической оценки респираторной патологии», 2019 г. Статистическая обработка материала проведена с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA v.10.0 © STATSOFT, USA».

Результаты

Изначально (n=38) среднее время диагностики при использовании предлагаемого способа составляло 14,5 минут (от 8 до 27 мин.), в связи с тем, что анализировалось 6 выдохов в течение 10 секунд при скорости выходного потока из ячейки 2 л/мин (по 2 параллельных измерения на 3 температурных режима). Однако, статистически не значимый разброс значений откликов параллельных измерений (2-15%; $p > 0,5$) в последующем позволил сократить число измерений при каждой температуре до 1 раза, тем самым уменьшив время анализа до 6,3 мин (5-7 мин).

Усредненные показания 7 сенсоров при 3 разных температурах анализировали как 21 информативный признак. Поскольку распределение разброса среди каждой группы имело

логнормальный характер, измеренные значения показаний сенсоров перед анализом по методу главных компонент предварительно логарифмировались. График счетов первых двух главных компонент (PC1 и PC2), описывающих более 83% объясненной дисперсии продемонстрировал статистически значимое разделение группы больных и участников контрольной группы по второй главной компоненте (PC2). Наибольшим вкладом в вариацию значений PC2 обладали сенсоры на предельные углеводороды (S1, S2) и сенсоры на –ОН группы (S5, S6, S7) при всех трех температурах. В пространстве первых трех главных компонент, объясняющих 90,8% дисперсии, была построена модель-классификатор с помощью метода линейного дискриминантного анализа (ЛДА).

Была проведена процедура перекрестной проверки для тестового набора, таким образом, каждый из образцов тестового набора был классифицирован, чтобы определить, является ли результат истинным положительным (ИП), ложно положительным (ЛП), истинно отрицательным (ИО) или ложно отрицательным (ЛО). Качество полученного классификатора проверялось путем расчета чувствительности $(ИП / (ИП + ЛО) * 100\%)$, специфичности $((ИО / ИО + ЛП) * 100\%)$ и точности $((ИП + ИО) / \text{размер выборки} * 100\%)$.

Показатели чувствительности, специфичности и точности при анализе проб выдыхаемого воздуха составили 91,2%, 100% и 93,4% соответственно.

При цитологическом исследовании образцов мокроты результаты сведены в 5 групп: 1) без патологии — 11,7% участников; 2) гиперплазия (базально-клеточная и бокаловидных клеток) — 13,6% участников; 3) метаплазия (плоскоклеточная метаплазия без атипии клеток и атипическая плоскоклеточная метаплазия бронхиального эпителия) — 10,7% участников; 4) дисплазия подозрительная в отношении перехода в рак — 34% участников; 5) обнаружены клетки рака — 30,1% участник. Таким образом, обоснованные подозрения на рак лёгкого, по сумме 4 и 5 групп, при цитологическом исследовании высказаны у 64,1% участников. После сопоставления результатов метода цитологического исследования мокроты с окончательными данными диагностики и морфологической верификации чувствительность его составила 38,2%, при высокой специфичности — 97,2%. Было показано, что совместное использование определения состава выдыхаемого воздуха и цитологического исследования мокроты по сравнению с изолированным использованием анализа ЛОС, позволяет статистически значимо ($p=0,03$) повысить чувствительность до 96,8%

(95%CI:80,9%-99%) против 91,2% (95%CI:84%-96%), с некоторым допустимым снижением специфичности — 93,4% (95%CI:88%-96%) против 100% (95%CI:98%-100%).

Заключение

Используемый в исследовании способ, включающий определение состава выдыхаемого воздуха неселективным методом анализа летучих органических соединений с использованием металлооксидных сенсоров с перекрестной чувствительностью и цитологическое исследование мокроты, может быть использован для ранней диагностики рака лёгкого. Доказаны статистически значимые различия показателей чувствительности и специфичности между больными раком лёгкого и здоровыми участниками при использовании онлайн режима анализа. Быстрота выполнения анализа проб выдыхаемого воздуха и проведение измерений в реальном времени являются ключевыми моментами возможности использования метода в ранней диагностике РЛ. Для принятия решения о возможности использования метода в качестве скринингового продолжается сбор материала, отработка стандартизация и оптимизация диагностического алгоритма.

Конфликт интересов. Авторы не имеют партнерских отношений и не принимают финансового участия, в каких бы то ни было организациях или юридических лицах, имеющих финансовую заинтересованность или финансовые разногласия в отношении предмета или материалов, рассматриваемых в настоящей рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барчук А.А., Арсеньев А.И., Левченко Е.В. и др. Автоматизированная количественная цитометрия в диагностике рака лёгкого // Вопросы онкологии. — 2011. — Т. 57. — № 1. — С. 36-42.
2. Мерабишвили В.М. Онкологическая служба в Санкт-Петербурге и районах города (заболеваемость, смертность, выживаемость) / Ежегодник Популяционного ракового регистра. — СПб.: ИПК Коста, 2017. — 240 с.
3. Nakhleh M.K., Amal H., Jeries R. Diagnosis and Classification of 17 Diseases from 1404 Subjects via Pattern Analysis of Exhaled Molecules // ACS Nano. — 2017. — Vol. 11(1). — P. 112–125.
4. Nardi-Agmon I., Abud-Hawa M., Liran O. et al. Exhaled Breath Analysis for Monitoring Response to Treatment in Advanced Lung Cancer // J. Thorac. Oncol. — 2016. — Vol. 11. — P. 827–837.
5. Wu G., Wang E., Li J. Clinical value of liquid-based cytologic test in sputum examination of patients with lung cancer // ZhongguoFei Ai ZaZhi — 2006. — Vol. 9(2). — P. 192-195.
6. Wu G.X., Raz D.J. Lung Cancer Screening // Cancer Treat. Res. — 2016. — Vol. 170. — P. 1-23.

7. Zhang Y., Gao G., Liu H. et al. Identification of Volatile Biomarkers of Gastric Cancer Cells and Ultrasensitive Electrochemical Detection Based on Sensing Interface of Au-Ag Alloy Coated MWCNTs // *Theranostics*. — 2014. — Vol. 4. — P. 154–162.

Поступила в редакцию 12.04.2020 г.

*A.I. Arseniev, A.V. Nefedova, A.A. Ganeev,
A.O. Nefedov, S.N. Novikov, A.A. Barchuk,
S.V. Kanaev, I.E. Jahatspanian, A.R. Gubal,
A.S. Kononov, S.A. Tarkov, N.Y. Aristidov*

Combined diagnostics of lung cancer using exhaled breath analysis and sputum cytology

FSBI «N.N. Petrov NMRC of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russia, St.Petersburg

In this article we summarize our own experience of lung cancer diagnostics using exhaled breath analysis with a non-selective method using metal oxide chemoresistor gas sensors with cross-sensitivity combined with the sputum cytology. Volatile organic compounds of exhaled breath change the conductivity of the sensor, the resulting pulse is displayed as a peak on the graph, the area of which is used as test results. The combination of two diagnostic techniques in 204 participants demonstrated the possibility of non-invasively detecting the disease at an early stage. The sensitivity, specificity and accuracy of the breath analysis was 91.2%, 100% and 93.4%, respectively. The combination of the breath test and the sputum cytology compared to the breath test alone showed statistically significant ($p = 0.03$) increase in sensitivity to 96.8% (95% CI: 80.9% -99%) with acceptable decrease in specificity to 93.4% (95% CI: 88% -96%). The convenience of analysis and real-time measurements show some promise for the early detection.

Key words: screening, lung cancer, gas analyzer, exhaled breath, sputum cytology