

**ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКИХ С ПОМОЩЬЮ ПРЯМОГО
АНАЛИЗА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗОВЫХ
СЕНСОРОВ ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО ЭЛЕКТРОННОГО НОСА**

А.В. Нефедова¹, А.И. Арсеньев¹, А.О. Нефедов²,

А.С. Барчук¹, А.А. Ганеев¹, С.Н. Новиков¹, А.А. Барчук¹, К.Э. Гагуа¹,

С.А. Тарков¹, Н.Ю. Аристидов¹

¹*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова,
Санкт-Петербург, Россия*

²*ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
фтизиопульмонологии» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия*

Реферат

Введение. Изучена возможность применения неинвазивных методов диагностики рака легкого посредством прямого анализа выдыхаемого воздуха.

Цель. Показать, что предложенный метод диагностики рака легкого с помощью определения состава выдыхаемого воздуха неселективным методом с использованием металлооксидных хеморезисторных газовых сенсоров с перекрестной чувствительностью позволяет неинвазивно выявлять заболевание на ранней стадии.

Материал и методы. Способ применён у 204 участников. Летучие органические соединения выдыхаемого воздуха изменяют проводимость сенсора, возникающий импульс отображается как пик на графике, площадь которого используется при математических расчетах.

Результаты: Показатели чувствительности, специфичности и точности при анализе проб выдыхаемого воздуха составили 91,2%, 100% и 93,4% соответственно. Быстрота выполнения анализа и проведение измерений в реальном времени позволяют использовать метод в ранней диагностике.

Ключевые слова: скрининг, рак легкого, газоанализатор, выдыхаемый воздух.

LUNG CANCER DETECTION USING DIRECT ANALYSIS OF EXHALED BREATH WITH SEMICONDUCTOR ELECTRONIC GAS SENSORS OF ELECTRONIC NOSE

Nefedova A.V.¹, Arseniev A.I.¹, Nefedov A.O.², Barchuk A.S.¹, Ganeev A.A.¹, Novikov S.N.¹,
Barchuk A.A.¹, Gagya K.E.¹, Tarkov S.A.¹, Aristidov N.Y.¹

¹*N.N. Petrov NMRC of Oncology, Saint-petersburg, Russia*

²*St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Saint-Petersburg, Russia*

Abstract.

Introduction: The possibility of using non-invasive methods of lung cancer diagnosis by direct analysis of exhaled air.

Aim: The study aimed to evaluate the performance of exhaled breath analysis with non-selective methods using cross-sensitivity metal oxide chemiresistor gas sensors in early-stage lung cancer non-invasive detection.

Materials and methods: The method was applied in 204 individuals. The conductivity of the sensor is following the concentration of the volatile organic compounds of exhaled breath. The resulting impulse is displayed as a peak on the graph and the area under curve is used as a value of the test.

Results: The sensitivity, specificity and accuracy of the analysis of exhaled breath was 91.2%, 100% and 93.4%, respectively. Real-time measurements provide perspectives to use the method for early diagnostics.

Key words: screening, lung cancer, gas analysis, exhaled breath

Введение

Ежегодно в мире регистрируется более 1 300 000, а в России – более 50000 случаев рака лёгкого (РЛ), который является одним из наиболее часто встречающихся и характеризующихся обычно неблагоприятным прогнозом онкологическим 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% [5,7]. 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 и гистогенетическую разновидность РЛ. ЦИМ считается легко воспроизводимым, неинвазивным и недорогим методом ранней диагностики РЛ, имеет высокую специфичность, достигающую 98% [6,8,9]. 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 характеристик отдельных клеток препарата [1,10]. Появляются работы, посвященные поиску различных биологических опухолевых маркеров в мокроте [4].

М.К. Nakhleh et al. в 2017г. 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 [6].

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, разработанный в лаборатории ФГАОУВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики». Анализ осуществлялся с использованием 7 металлоксидных хеморезисторных газовых сенсоров при последовательно устанавливаемых температурах 350, 400 и 450С⁰. Всем участникам проводился забор образцов мокроты с последующим изготовлением и микроскопическим исследованием 4 микропрепаратов, которые окрашивали гематоксилином и эозином [2,3].

При выявлении статистически значимых отличий от контрольных значений в отклике сенсоров на состав выдыхаемого воздуха и одновременном обнаружении в микропрепаратах дисплазии и клеток рака диагностировали злокачественную опухоль.

Таким образом, участникам исследования проводился отбор 1) проб выдыхаемого воздуха и 2) образцов мокроты. Пациентам рекомендовалось не принимать пищу и не курить как минимум за час до обследования. Непосредственно перед обследованием пациент полоскал ротовую полость теплой водой.

1) При получении проб воздуха участник проводил каждый выдох в течение 10 секунд через стерильный загубник. Вначале температуры сенсора устанавливали равной 350 и регистрировали массив установившихся показаний сенсоров при 3 кратном повторе выдоха. Аналогично проводили измерения при температурах сенсоров 400 и 450 (по 2 параллельных измерения на 3 температурных режима). Таким образом, пациент выдыхал 9 раз по 10 секунд, общее время анализа составляло порядка 10-15 минут. 2) Вторым этапом осуществлялся сбор мокроты без индукции для цитологического исследования в контейнеры объемом 50мл, содержащие 25 мл фиксатора. Затем образцы помещали в холодильник (температурный режим от+2 до +8) на срок не более 4 часов перед дальнейшей обработкой. Из полученных образцов готовили 4 препарата, которые окрашивали гематоксилином-эозином, затем производили морфологическую оценку материала. Цитологическое исследование производилось в световом поле на объективах 10х, 20х и 100х.

Критериями включения пациента являлось: 1) возраст участника от 30 лет и старше; 2) возможность перенести при необходимости дополнительное обследование в полном объеме, в рамках ОМС, для постановки окончательного диагноза (компьютерной томографии органов

грудной полости, фибробронхоскопия, трансторакальной трепан- биопсии); 3) курящие в настоящее время или бросивших курить менее 10 лет назад; 4) параллельное проведение цитологического исследования образцов мокроты; 5) подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

В качестве критериев исключения пациентов использовались: 1) наличие опухолевого заболевания в анамнезе, выявленного менее 5 лет назад, за исключением рака кожи, рака шейки матки *in situ*; 2) тяжелые сопутствующие заболевания (наличие декомпенсированной патологии сердечно-сосудистой, дыхательной или эндокринной системы, декомпенсированная и субкомпенсированная полиорганная недостаточность, некорригируемая коагулопатия, нарушение мозгового кровообращения, нестабильная стенокардия); 3) ожидаемый срок жизни менее 1 года; 4) рак легкого и операции на легких в анамнезе.

Способ применён у 222 участников – 132 (59,5%) мужчин и 90 (40,5%) женщин. В первой группе было – 141 доброволец с морфологически верифицированным раком легких на различных стадиях распространения процесса. Средний возраст этой группы испытуемых составил $64 \pm 9,5$ лет, мужчин в неё вошло - 89 (63,1%), женщин - 52 (36,9%). Вторая группа включала 81 добровольца, не имеющих симптомов и патологии легких по результатам последней флюорографии за последний год, среди которых было – 43 (53,1%) мужчины и 38 (46,9%) женщины. Средний возраст во второй группе добровольцев составил 55 ± 13 лет. В целом группы были репрезентативны. Образцы проб выдыхаемого воздуха были собраны согласно хельсинскому этическому протоколу, выданному ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, после подписания согласия каждого из участников.

Для анализа выдыхаемого воздуха использовалась неселективная мультисенсорная система «электронный нос (E-nos)», на основе массива из 7 металлоксидных сенсоров, разработанная в лаборатории ФГАОУВО «Санкт- Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики». Металлоксидные сенсоры относятся к хеморезисторным газовым сенсорам, принцип действия которых основан 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 $200\text{--}500^\circ\text{C}$. 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°C. На каждой из 3 температурных площадок дожидались установления показаний сенсоров.

Отклик сенсоров представляет собой графический пик. Площадь пика используется при математических расчетах для анализа состава выдыхаемого воздуха. 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».

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 единовременных 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. 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 ($\text{ИП}/(\text{ИП} + \text{ЛО}) \cdot 100\%$), специфичности ($(\text{ИО}/\text{ИО} + \text{ЛП}) \cdot 100\%$) и точности $((\text{ИП} + \text{ИО}) / \text{размер выборки} \cdot 100\%)$.

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%.

В итоге 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%

Заключение

Используемый в исследование 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.

Список литературы/ References:

1. Барчук А.А., Арсеньев А.И., Беляев А.М. Эффективность скрининга онкологических заболеваний // Вопросы онкологии – 2017. - № 4 (63). – С. 557-567.
1. Barchuk A.A., Arsenev A.I., Belyaev A.M. Effectiveness of cancer screening // Voprosy onkologii – 2017. -№4 (63). – S. 557-567 (in Russian)
2. ГОСТ Р 57003-2016 Диагностика в онкологии. Алгоритм диагностики. Солидные опухоли внутригрудной локализации. Лабораторный этап. // АНО "ЦИТО".-2016.- С. 3-14
2. GOST R 57003-2016 Diagnostika v onkologii. Algoritm diagnostiki. Solidnye opuholi vnutrigrudnoj lokalizacii. Laboratornyj etap. // ANO "CITO".-2016.- S. 3-14
3. Lester J. Layfield, Zubair Baloch, Editors The Papanicolaou Society of Cytopathology System for Reporting Respiratory Cytology//Springer.-2019.-С. 7-12
4. Liu D.,Peng H., Sun Q. et al. The Indirect Efficacy Comparison of DNA Methylation in Sputum for Early Screening and Auxiliary Detection of Lung Cancer: A Meta- Analysis// Int. J.Environ. Res. Public Health.- 2017.- 14(7).- p.679.
5. Мерабишвили В.М. Онкологическая служба в Санкт-Петербурге и районах города (заболеваемость, смертность, выживаемость) // Ежегодник Популяционного ракового регистра – СПб.: ИПК Коста, 2017. - 240 с.
5. Merabishvili V.M. Oncology service in St. Petersburg and city districts (incidence, mortality, survival) // Population Cancer Register Yearbook - SPb.: IPK Kosta, 2017. - 240 s. (in Russian)
6. 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. - 11(1). – P. 112–125

7. Nardi-Agmon I., Abud-Hawa M., Liran O., Gai-Mor N., Ilouze M., Onn A., Bar J., Shlomi D., Haick H., Peled N. Exhaled Breath Analysis for Monitoring Response to Treatment in Advanced Lung Cancer // J. Thorac. Oncol. – 2016. – 11. - P. 827–837.
8. 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. - 9(2). – P. 192-195;
9. Wu G.X., Raz D.J. Lung Cancer Screening // Cancer Treat. Res. – 2016. – 170. – P. 1-23.
10. Zhang Y., Gao G., Liu H., Fu H., Fan J., Wang K., Chen Y., Li B., Zhang C., Zhi X., He L., Cui D. Identification of Volatile Biomarkers of Gastric Cancer Cells and Ultrasensitive Electrochemical Detection Based on Sensing Interface of Au-Ag Alloy Coated MWCNTs // Theranostics. – 2014. – 4. – P. 154–162.