



<https://doi.org/10.21516/2072-0076-2023-16-2-119-123>

Возможности спектрометрической диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей конъюнктивы

С.В. Саакян¹, Д.А. Складнев², А.П. Алексеева¹ ✉, В.В. Сорокин², О.В. Безнос¹

¹ ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

² ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Ленинский пр-т, д. 33/2, Москва, 119071, Россия

Цель работы — сравнить восстановительную активность доброкачественных и злокачественных опухолей конъюнктивы. **Материал и методы.** Исследование проведено на 86 биоптатах опухоли пациентов с клинически установленным диагнозом «новообразование конъюнктивы». Контролем служила здоровая ткань из того же глаза. Проведено спектрофотометрическое определение оптической плотности реакционной смеси, содержащей биогенные наночастицы, сформированные в присутствии опухолей конъюнктивы и соответствующих парных образцов здоровой ткани из группы контроля. Полученные данные позднее подтверждались патогистологическим заключением. **Результаты.** Зафиксирован достоверно более высокий уровень формирования *in situ* биогенных наночастиц серебра в реакционной смеси со злокачественными опухолями конъюнктивы $3,0 \pm 1,1$ ($n = 32$), чем с доброкачественными $1,3 \pm 0,2$ ($n = 54$). Различий между разными типами доброкачественных опухолей не обнаружено. В образцах злокачественных опухолей показатели восстановительной активности у меланомы — $3,4 \pm 1,0$ ($n = 14$) и лимфомы — $2,8 \pm 1,0$ ($n = 7$) были достоверно выше, чем при плоскоклеточном раке — $2,0 \pm 0,6$ ($n = 11$), но достоверных различий между этими двумя типами опухолей не выявлено. **Заключение.** Метод спектрофотометрического определения восстановительной активности опухолей конъюнктивы может быть использован в дооперационной или интраоперационной диагностике благодаря скорости получения результатов, что позволит оперативно определить объем хирургического вмешательства и оптимизировать тактику лечения.

Ключевые слова: опухоль; конъюнктивa; биогенные наночастицы; спектрофотометрия

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Саакян С.В., Складнев Д.А., Алексеева А.П., Сорокин В.В., Безнос О.В. Возможности спектрометрической диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей конъюнктивы. Российский офтальмологический журнал. 2023; 16 (2): 119–23. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2023-16-2-119-123>

Possibilities of spectrometric diagnostics of benign and malignant conjunctival tumors

Svetlana V. Saakyan¹, Dmitry A. Skladnev², Alena P. Alekseeva¹ ✉, Vladimir V. Sorokin², Olga V. Beznos¹

¹ Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

² Research Center of Biotechnology, S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology, RAS, 33/2, Leninsky Prospekt, Moscow, 119071, Russia
chona1.94@mail.ru

Purpose: to compare the regenerative activity of benign and malignant conjunctival tumors. **Material and methods.** The study was performed on 86 tumor biopsies from patients with a clinically diagnosed conjunctival neoplasm. Healthy tissues from the same eye were taken as a control sample. The optical density of the reaction mixture containing biogenic nanoparticles formed in the presence of conjunctival tumors and the corresponding paired healthy tissue samples from the control group was measured by spectrophotometry. The data obtained were later verified by a pathohistological analysis. **Results.** A significantly higher level of *in situ* formation of biogenic silver nanoparticles was recorded in the reaction mixture with malignant tumors of the conjunctiva (3.0 ± 1.1 , ($n = 32$) compared to benign tumors (1.3 ± 0.2 , $n = 54$). No differences were found between various types of benign tumors. In samples of malignant tumors, the indicators of recovery activity in melanoma (3.4 ± 1.0 , $n = 14$) and lymphoma (2.8 ± 1.0 , $n = 7$) were significantly higher than in squamous cell carcinoma (2.0 ± 0.6 , $n = 11$), but no significant differences were found between the two types of tumors. **Conclusion.** The method of spectrophotometric measurement of the regenerative activity of conjunctival tumors can be used in preoperative or intraoperative diagnostics thanks to the fact that the results can be obtained rapidly, which will help to quickly determine the extent of surgical intervention needed and optimize the treatment tactics.

Keywords: tumor; conjunctiva; biogenic nanoparticles; spectrophotometry

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

For citation: Saakyan S.V., Skladnev D.A., Alekseeva A.P., Sorokin V.V., Beznos O.V. Possibilities of spectrometric diagnostics of benign and malignant conjunctival tumors. Russian ophthalmological journal. 2023; 16 (2): 119-23 (In Russ.). <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2023-16-2-119-123>

В структуре опухолей придаточного аппарата глаза у взрослого населения новообразования конъюнктивы по распространенности занимают второе место после опухолей век [1]. Наибольшую опасность для жизни пациента из-за возможности инвазивного роста и метастазирования процесса представляют злокачественные опухоли [2–4]. Несмотря на видимую локализацию опухолей конъюнктивы и возможности современных диагностических методов исследования, их дифференциальная диагностика может представлять значительные сложности [5]. Неправильная постановка первоначального диагноза приводит к неадекватному выбору лечебной тактики и как результат — к рецидиву образования [6]. Развитие рецидивов ухудшает качество жизни и прогноз выживаемости пациентов, особенно при меланомах конъюнктивы. Золотым стандартом установления диагноза «злокачественная опухоль» является патогистологическое исследование после ее удаления [7]. Но, кроме морфологического отличия опухолевых клеток от нормальных, фундаментальным фактором их различия являются изменения в метаболизме. Для сохранения жизнедеятельности, поддержания роста и распространения опухолевые клетки подвергаются метаболическому перепрограммированию [8–11]. Данная особенность проявляется в способности с высокой скоростью восстанавливать катионы с последующим формированием *in situ* биогенных наночастиц металлов [12]. Получение биогенных наночастиц, способных при своем формировании отражать уровень метаболической активности клеток, может использоваться для дифференциальной

диагностики различных типов опухолей. Уточнение характера восстановительной активности доброкачественных и злокачественных новообразований конъюнктивы позволит обеспечить быструю дооперационную или интраоперационную диагностику.

ЦЕЛЬ работы — сравнить восстановительную активность доброкачественных и злокачественных опухолей конъюнктивы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 86 биоптатах опухолей конъюнктивы пациентов с клинически установленным диагнозом «опухоль конъюнктивы», проходивших лечение в отделе офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ РФ в период с 2021 по 2022 г. Все исследования проводились с согласия пациентов и были одобрены локальным этическим комитетом. Результаты исследования позднее подтверждались патогистологическим заключением.

В качестве объекта исследования использовали биоптат опухоли конъюнктивы. Контролем служила здоровая ткань из того же глаза. Образцы тканей брали в условиях операционной. Дальнейшие исследования проводились на базе отдела патофизиологии и биохимии. В каждую из пробирок с образцами тканей добавляли по 500 мкл стерильного раствора аммиака серебра $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$, который выступал в качестве источника катионов серебра. Для оптимизации режима сравнения восстановительных способностей исследуемых тканей использовали концентрации от 1 до 0,031 мг/мл

с последовательным разведением в 2 раза. Реакцию восстановления катионов Ag^+ в присутствии образцов опухолевых и контрольных тканей проводили в термостатируемом шейкере ST-3 (Elmi, Латвия) длительностью от 5 до 20 мин. Для минимизации погрешности исследования из каждой пробирки отбирали по 120 мкл реакционной смеси, содержащей сформировавшиеся биогенные наночастицы, и проводили центрифугирование при 5000 об/мин в течение 5 мин. Далее по 100 мкл реакционной смеси переносили в отдельные лунки микропланшета. Спектрофотометрическое определение восстановительной активности опухолей конъюнктивы проводили путем измерения оптической плотности реакционной смеси на многофункциональном фотометре для микропланшет Synergy MX (Bio-Tek, США). Анализировали показатели при фиксированных длинах волн (λ), близких к специфическим для наночастиц серебра: 395, 400, 405, 410, 415, 420 нм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics 23. Для характеристики статистических рядов распределения использовали средние значения (M) и стандартное отклонение (SD). Для оценки достоверности различия между группами применяли непараметрический U-критерий Манна — Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе представлены результаты сравнительной оценки восстановительной активности доброкачественных ($n = 54$) и злокачественных опухолей конъюнктивы ($n = 32$): плоскоклеточного рака ($n = 11$), меланомы конъюнктивы ($n = 14$) и лимфомы ($n = 7$). Значения оптической плотности (A) реакционных смесей с биогенными наночастицами, сформированными в присутствии доброкачественных или злокачественных опухолей, сравнивали с показателями парных образцов здоровой ткани. В качестве

Таблица 1. Сравнение восстановительной активности доброкачественных и злокачественных опухолей конъюнктивы
Table 1. Comparison of the regenerative activity (A) of benign and malignant tumors of the conjunctiva in terms of their ability to form biogenic silver nanoparticles *in situ*

Тип опухоли Type of tumor	$\frac{A_{\text{опухоли}}}{A_{\text{контроля}}}, \lambda = 400 \text{ нм}$ $\frac{A_{\text{tumor}}}{A_{\text{control sample}}}, \lambda = 400 \text{ nm}$
Доброкачественные опухоли конъюнктивы Benign tumors of the conjunctiva	$1,3 \pm 0,2$
Злокачественные опухоли конъюнктивы Malignant tumors of the conjunctiva	$3,0 \pm 1,1$

Таблица 2. Сравнение восстановительной активности доброкачественных и злокачественных опухолей по происхождению
Table 2. Comparison of the regenerative activity of benign and malignant tumors by origin

Тип опухоли Type of tumor	Эпителиальные Epithelial	Меланоцитарные Melanocytic
Доброкачественные опухоли конъюнктивы Benign tumors of the conjunctiva	$1,2 \pm 0,3$ $n = 14$	$1,17 \pm 0,20$ $n = 35$
Злокачественные опухоли конъюнктивы Malignant tumors of the conjunctiva	$2,0 \pm 0,6$ $n = 11$	$3,4 \pm 1,0$ $n = 14$

характеристики опухоли использовали отношение оптической плотности опытного и контрольного образца. Зафиксирован достоверно более высокий уровень восстановительной активности злокачественных опухолей конъюнктивы, чем доброкачественных ($p < 0,05$), по их способности формировать *in situ* биогенные наночастицы серебра (табл. 1).

Проведена сравнительная оценка восстановительной активности эпителиальных и меланоцитарных доброкачественных и злокачественных опухолей (табл. 2). В обеих группах показатели восстановительной активности злокачественной опухоли были выше, чем при доброкачественных ($p < 0,05$).

Не представилось возможным выявить достоверно значимые различия между разными типами доброкачественных опухолей. Анализ восстановительной активности злокачественных опухолей конъюнктивы (меланомы, лимфомы и плоскоклеточного рака) показал, что при меланоме ($3,4 \pm 1,0$) и лимфоме ($2,8 \pm 1,0$) регистрируются достоверно более высокие показатели восстановительной активности, чем при плоскоклеточном раке ($2,0 \pm 0,6$), но между собой эти опухоли статистически достоверно не различались ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для удовлетворения биоэнергетических, биосинтетических и окислительно-восстановительных потребностей опухолевые клетки подвергаются перепрограммированию своего метаболизма, причем разные типы опухолей характеризуются специфическим метаболическим профилем [10, 13]. Особенностью опухолевых клеток, обладающих высоким уровнем метаболизма, является повышенная способность восстановления катионов благородных и тяжелых металлов до нейтральных атомов с последующей их агрегацией и формированием наноразмерных биогенных частиц [12]. При оценке формирования *in situ* биогенных наночастиц серебра мы регистрировали более высокий уровень восстановительной активности злокачественных опухолей, чем доброкачественных. Применение метода на практике может помочь в установлении первоначального диагноза опухоли до ее гистологической верификации путем определения восстановительной активности, особенно при сложностях дифференциальной диагностики меланоцитарных опухолей (рис. 1, 2).

Показатели восстановительной активности злокачественных опухолей конъюнктивы оказались различными. Это объясняется влиянием на метаболизм опухолевой клетки множества факторов. В литературе высказываются предположения о влиянии на метаболизм опухоли ее размеров и/или активности роста [14]. В биохимических исследованиях описываются способности опухолевых клеток к обратимому переключению от окислительного фосфорилирования к гликолизу в течение всего канцерогенеза в зависимости от меняющихся условий среды, в том числе от наличия гипоксии. Причем метаболический переход от окислительного фосфорилирования к гликолизу может говорить о запуске метастатического поражения: многие авторы указывают на преобладание гликолиза в быстрорастущих и агрессивных опухолях [15]. До настоящего времени не существует дифференциальной диагностики опухолей по метаболическому профилю ввиду сложности биохимических процессов, протекающих в них. Не выявлены также специфические изменения в метаболизме для определенных типов опухолей. Накопленный опыт и продолжающиеся исследования по изучению биохимических процессов, протекающих в опухолях, открывают новые возможности для исследований. Обнаружение соответствующих метаболических, фермента-

тивных, регуляторных изменений служит основой для проектирования новых методов диагностики. Представленный метод диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей конъюнктивы помогает уточнить путем выявления восстановительной активности опухоли конъюнктивы ее доброкачественный или злокачественный характер и может применяться на практике как дополнительный инструментальный метод экспресс-диагностики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный метод диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей конъюнктивы может быть использован в дооперационной или интраоперационной диагностике благодаря быстрой получению результатов, что позволит оперативно определить объем хирургического вмешательства и оптимизировать тактику лечения.

Литература/References

1. Бровкина А.Ф. Офтальмоонкология. Руководство для врачей. Москва: Медицина; 2002. [Brovkina A.F. Ophthalmooncology. Guidelines for physicians. Moscow: Meditsina; 2002 (In Russ.)].
2. Бровкина А.Ф. Особенности клинической картины злокачественной лимфомы орбиты. *Вестник офтальмологии*. 2019; 135 (5): 4–12. [Brovkina A.F. Clinical features of malignant orbital lymphoma. *Vestnik Oftal'mologii*. 2019; 135 (5): 4–12 (In Russ.)]. doi: 10.17116/oftalma20191350514
3. Саакян С.В. Клиническая онкология органа зрения. *Эффективная фармакотерапия*. 2015; 30: 20–7. [Saakyan S.V. Clinical oncology of visual organ. *Effective pharmacotherapy*. 2015; 30: 20–7 (in Russ.)].
4. Семенова Л.Е., Панова И.Е., Мусаева П.И. Клинико-эпидемиологические аспекты злокачественных новообразований конъюнктивы в Челябинской области. *Российский офтальмологический журнал*. 2020; 13 (4): 33–8. [Semenova L.E., Panova I.E., Musaeva P.I. Clinical and epidemiological aspect of malignant neoplasm of conjunctiva in the Chelyabinsk region. *Russian ophthalmological journal*. 2020; 13 (4): 33–8 (In Russ.)]. https://doi.org/10.21516/2072-0076-2020-13-4-33-38
5. Shields CL, Shields JA. Tumors of the conjunctiva and cornea. *Indian J Ophthalmol*. 2019; 67 (12): 1930–48. doi: 10.4103/ijo.IJO_2040_19
6. Енгибарян М.А. К вопросу о рецидивных злокачественных опухолях глаза. *Кубанский научно-медицинский вестник*. 2011; 1 (124): 116–8. [Engibarjan M.A. To the question on eye recurrent malignant tumours. *Kubansky nauchno-meditsinsky vestnik*. 2011; 1 (124): 116–8 (In Russ.)].
7. Grossniklaus HE, Eberhart CG, Kivelä TT. WHO classification of tumours. 2018; 4th ed. vol. 12.
8. Коршунов Д.А., Кондакова И.В., Шашова Е.Е. Современные представления о метаболическом перепрограммировании в злокачественных новообразованиях. *Биохимия*. 2019; 84 (10): 1385–400. [Korshunov D.A., Kondakova I.V., Shashova E.E. Modern perspective on metabolic reprogramming in malignant neoplasms. *Biochemistry*. 2019; 84 (10): 1129–42 (In Russ.)]. doi: 10.1134/S0320972519100026
9. De Berardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016; 2 (5): e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200
10. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
11. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021. 21: 669–80. doi: 10.1038/s41568-021-00378-6
12. Gao S, Chen D, Li Q, et al. Near-infrared fluorescence imaging of cancer cells and tumors through specific biosynthesis of silver nanoclusters. *Scientific Reports*. 2014; 4: 4384. https://doi.org/10.1038/srep04384
13. Pandey N, Lanke V, Vinod PK. Network-based metabolic characterization of renal cell carcinoma. *Sci Rep*. 2020; 10: 5955. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62853-8
14. Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1807 (6): 552–61. doi: 10.1016/j.bbabo.2010.10.012
15. Kang HS, Lee SC, Park YS, et al. Protein and lipid MALDI profiles classify breast cancers according to the intrinsic subtype. *BMC Cancer*. 2011; 11: 465. doi: 10.1016/j.bbabo.2010.10.012



Рис. 1. Невус сложного строения с небольшой воспалительной реакцией в строме, $A_{\text{опухоли}}/A_{\text{контроля}} = 1,3$

Fig. 1. Nevus of complex structure with a slight inflammatory reaction, $A_{\text{tumor}}/A_{\text{control sample}} = 1.3$



Рис. 2. Пигментированная меланома конъюнктивы без изъязвления, $A_{\text{опухоли}}/A_{\text{контроля}} = 4,7$

Fig. 2. Pigmented melanoma of the conjunctiva without ulceration, $A_{\text{tumor}}/A_{\text{control sample}} = 4.7$

Вклад авторов в работу: С.В. Саакян — разработка идеи метода, концепция и дизайн исследования, редактирование текста статьи; Д.А. Складнев — разработка идеи метода, интерпретация данных, редактирование текста статьи; А.П. Алексеева — написание текста статьи, сбор и интерпретация данных, проведение эксперимента, фотосопровождение. В.В. Сорокин — редактирование текста статьи; О.В. Безнос — участие в отработке метода, редактирование текста статьи.

Authors' contribution: S.V. Saakyan — development of the method idea, study concept and design, editing of the article; D.A. Skladnev — development of the method idea, data interpretation, editing of the article; A.P. Alekseeva — writing of article, data collection and interpretation; V.V. Sorokin editing of the article; O.V. Beznos — participation in the development of the method, editing of the article.

Поступила: 26.02.2023. Переработана: 25.03.2023. Принята к печати: 27.03.2023
Originally received: 26.02.2023. Final revision: 25.03.2023. Accepted: 27.03.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ/INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

Светлана Ваговна Саакян — член-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор, начальник отдела офтальмоонкологии и радиологии, ORCID 0000-0001-8591-428X

Алена Павловна Алексеева — аспирант отдела офтальмоонкологии и радиологии, ORCID 0000-0002-7568-3016

Ольга Валерьевна Безнос — врач клинической лабораторной диагностики, ORCID 0000-0001-7557-4955

ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, ул. Ленинский проспект, д. 33/2, Москва, 119071, Россия

Дмитрий Анатольевич Складнев — д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов, ORCID 0000-0001-6929-6397

Владимир Владиславович Сорокин — старший научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов, ORCID 0000-0002-4166-3105

Для контактов: Алена Павловна Алексеева,
chonai.94@mail.ru

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

Svetlana V. Saakyan — corresponding member of RAS, Dr. of Med. Sci., professor, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, head of department of ocular oncology and radiology, ORCID 0000-0001-8591-428X

Alena P. Alekseeva — PhD student, department of ocular oncology and radiology, ORCID 0000-0002-7568-3016

Olga V. Beznos — physician of department of pathophysiology and biochemistry, ORCID 0000-0001-7557-4955

Research Center of Biotechnology, S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology, RAS, 33/2, Leninsky Prospekt, Moscow, 119071, Russia

Dmitry A. Skladnev — Dr. of Biol. Sci., professor, chief researcher, microbial survival laboratory, ORCID 0000-0001-6929-6397

Vladimir V. Sorokin — senior researcher, microbial survival laboratory, ORCID 0000-0002-4166-3105

Contact information: Alena P. Alekseeva,
chonai.94@mail.ru