

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*

Авраамова София Таризеловна

**Дооперационная и интраоперационная диагностика рака предстательной  
железы с использованием раман-люминесцентной спектроскопии**

14.03.02 - Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент

Кириллов Юрий Александрович

Москва - 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение .....</b>	<b>5</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>	<b>10</b>
1.1.1. Современное состояние проблемы диагностики рака предстательной железы .....	10
1.1.2. Роль гистологического исследования в диагностике рака предстательной железы на дооперационном этапе .....	12
1.1.3. Применение иммуногистохимического исследования в диагностике рака предстательной железы .....	17
1.2. Раман-люминесцентная спектроскопия как новый метод оптической диагностики опухолей .....	21
<b>Глава 2. Материалы и методы исследования .....</b>	<b>28</b>
2.1. Материал исследования .....	28
2.2. Методы исследования .....	30
2.2.1. Гистологическое исследование .....	30
2.2.2. Гистохимическое исследование .....	31
2.2.3. Иммуногистохимическое исследование .....	31
2.3. Раман-люминесцентная спектроскопия .....	33
2.4. Статистические методы исследования .....	36
<b>Глава 3. Результаты исследования .....</b>	<b>38</b>
3.1. Результаты морфологического исследования образцов рака предстательной железы .....	38
3.2. Результаты спектроскопического исследования образцов рака предстательной железы .....	44
3.3. Результаты морфологического исследования образцов доброкачественной гиперплазии предстательной железы .....	53
3.4. Результаты спектроскопического исследования образцов доброкачественной гиперплазии предстательной железы .....	56
3.5. Результаты морфологического и спектроскопического	

исследований образцов группы контроля .....	61
3.6. Анализ эффективности метода раман-люминесцентной спектроскопии в диагностике рака предстательной железы .....	67
<b>Глава 4. Обсуждение результатов собственного исследования .....</b>	<b>71</b>
<b>Выводы .....</b>	<b>82</b>
<b>Практические рекомендации .....</b>	<b>82</b>
<b>Список сокращений .....</b>	<b>83</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>84</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Разработка новых и усовершенствование существующих методов и технологий диагностики злокачественных новообразований предстательной железы является одним из приоритетных направлений современной онкоурологии. Повышенный интерес к данной проблеме обусловлен ежегодным увеличением показателя заболеваемости раком предстательной железы (РПЖ) (свыше 600 тыс. новых случаев) во всем мире, а также увеличением его частоты среди мужчин работоспособного возраста [13]. Сложность ранней диагностики РПЖ объясняется преимущественной локализацией очагов карциномы в периферических отделах железы, что при небольших размерах образования не приводит к сдавлению уретры и появлению первичной симптоматики в виде затруднения мочеиспускания [12]. Кроме того, применение стандартных методов диагностики, включающих пальцевое ректальное исследование ПЖ, определение в сыворотке крови больного простатспецифического антигена (ПСА) и проведение трансректального ультразвукового исследования ПЖ, часто бывает недостаточным для распознавания РПЖ, и единственным методом, с помощью которого представляется возможность поставить диагноз РПЖ, остается традиционное гистологическое исследование биоптата. Другие методы дооперационной диагностики, в частности, магнитно-резонансная томография, компьютерная томография органов малого таза, не обладают высокими показателями специфичности, что связано с низкой интенсивностью сигнала при сочетании РПЖ с дистрофическими и воспалительными заболеваниями [25]. В связи с этим проблема разработки новых технологий ранней до- и интраоперационной диагностики РПЖ продолжает оставаться актуальной.

### **Цель исследования**

Разработать алгоритм дооперационной и интраоперационной морфоспектроскопической диагностики рака предстательной железы с использованием технологии раман-люминесцентной спектроскопии.

### **Задачи исследования:**

1. Дать морфологическую оценку изменениям предстательной железы при доброкачественной гиперплазии и ацинарной аденокарциноме, определить степень её дифференцировки по градации Глисона.
2. Провести спектроскопическое исследование образцов ткани предстательной железы и оценить особенности и степень выраженности опухолевых и предопухолевых процессов на основании идентификации специфических оптических маркеров, выявляемых при помощи раман-люминесцентной технологии.
3. Изучить корреляционную зависимость между морфологическими характеристиками доброкачественной гиперплазии и рака предстательной железы и показателями, полученными при их спектральном исследовании.

### **Научная новизна исследования**

В результате проведенного исследования впервые установлено, что как опухоли, возникающие в предстательной железе, так и предшествующие им предопухолевые и фоновые заболевания обладают рядом специфических особенностей, выявляемых посредством люминесценции, либо рамановской спектроскопии. Метод раман-люминесцентной диагностики, сочетающий в себе обе упомянутые технологии, позволяет не только выявить в ткани железы оптические маркеры опухолей и предшествующих им патологических состояний, но и определить их гистогенез, степень дифференцировки и сделать вывод о распространенности новообразования. Эти сведения полностью соответствуют результатам морфологического исследования образцов ткани предстательной

железы, проводимого в соответствии со Стандартом ведения больных с данным видом патологии.

### **Практическая значимость**

Полученные результаты имеют важное значение для онкологии, урологии и патологической анатомии, поскольку вносят существенный вклад в расширение представлений о канцерогенезе опухолей данной локализации. Использование метода раман-люминесцентной спектроскопии позволяет существенно дополнить данные, полученные в ходе традиционного морфологического исследования. Возможность использования данных технологий в режиме реального времени расширяет перспективы его применения в качестве дополнения или альтернативы существующему алгоритму патогистологической диагностики опухолей различных локализаций.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Между морфологическими характеристиками доброкачественной гиперплазии и раке предстательной железы и показателями, полученными при их спектроскопическом исследовании, выявляется чёткая корреляционная зависимость.
2. Спектральные характеристики образцов предстательной железы при доброкачественной гиперплазии и раке, существенно отличаются, как по значениям уровней инициальной, максимальной и остаточной флуоресценции, так и наличию рамановских пиков, обусловленных рассеянием маркеров, специфичных для опухоли и предопухолевого процесса. В случае ацинарной аденокарциномы представляется также возможным определить степень её дифференцировки по градации Глисона.
3. Возникновение и прогрессирование опухоли, реализация в ней вторичных изменений усиливает гетерогенность ткани предстательной железы, что обуславливает необходимость, как и в случае традиционного морфологического исследования, изучения спектров из разных участков железы для оптимизации

диагностики опухоли.

### **Апробация диссертационного материала**

Материалы диссертации доложены на научно-практической конференции «Применение лазерной рамановской спектроскопии в медицине, народном хозяйстве и промышленности» (Москва, 2014), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016), Международной конференции «Annual International Conference on Research, Education and Teaching by Russian Academics» (Афины, 2016), XXVIII Европейском патологическом конгрессе (Кёльн, 2016), Научно-практической конференции с международным участием «Применение лазеров в медицине. Фотодинамическая терапия» (Москва, 2016), V съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, 2017), Международной научно-практической конференции молодых ученых «Горизонты медицинской науки» (Москва, 2017), Интернациональном обществе оптики и фотоники (Страсбург, 2018), международной конференции «Информационные технологии и нанотехнологии» (Самара, 2018), Российском обществе патологоанатомов (Москва, 2018), научно-практической конференции «Многопрофильная больница современного города: вчера, сегодня, завтра» (Москва, 2018), XXXI Европейском патологическом конгрессе (Ницца, 2019), международной конференции «Информационные технологии и нанотехнологии» (Самара, 2019), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2020).

Апробация диссертации состоялась на научной конференции кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова ИКМ имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) «24» августа 2020 года.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследований используются в практической работе при анализе биопсийного материала, чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре патологической анатомии имени академика А.И. Струкова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова ФГАОУ ВО Минздрава России (Сеченовский Университет).

### **Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации**

Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе Авраамовой С.Т., получены ей самостоятельно на кафедре патологической анатомии имени акад. А.И. Струкова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Автором проведен анализ историй болезни пациентов в исследуемых группах. Автор принимала участие в заборе и вырезке материала, самостоятельно проводила гистологическое, гистохимическое, иммуногистохимическое, спектроскопическое исследования. Автором была проведена статистическая обработка и интерпретация результатов как морфологического, так и спектроскопического исследований. Результаты перечисленных выше исследований были обработаны с помощью статистических программ и интерпретированы автором.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02–патологическая анатомия, а также области исследования согласно пунктам 1-«Распознавание и характеристика этиологических факторов, определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний, на основании прижизненных и постмортальных морфологических исследований при использовании

современных технических возможностей патологической анатомии», 2 - «Прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов, научный анализ патологического процесса, лежащего в основе заболевания», 3 - «Исследование патогенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ патогенетической терапии».

### **Публикации результатов работы**

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 1 в международной базе данных Scopus.

### **Объем и структура исследования**

Диссертация построена по монографическому типу и изложена на 98 страницах машинописи, содержит 6 таблиц, 32 рисунка, 5 диаграмм. Диссертация состоит из введения, глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 30 отечественных и 91 иностранных источников.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1.1 Современное состояние проблемы диагностики рака предстательной железы

Стабильно высокий уровень заболеваемости раком предстательной железы в трудоспособном возрасте позволяет отнести разработку технологий его диагностики и лечения в число наиболее актуальных проблем онкоурологии. Увеличение количества новых случаев РПЖ, как правило, обусловлено улучшением его ранней выявляемости среди мужской части населения [39]. Среди мероприятий первичного обследования, на сегодняшний день, наиболее доступным методом является определение уровня простат-специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови пациента. За пороговый уровень нормы этого показателя в сыворотке крови принимается 4 нг/мл. Повышение концентрации общего-ПСА в сыворотке крови свыше 10 нг/мл уже является показанием для проведения детального исследования ПЖ, включая биопсию, с целью исключения РПЖ даже при её нормальных размерах [27]. Специалистами разных стран было отмечено, что в клинической практике РПЖ (особенно в случаях латентных форм) встречается даже при нормальных значениях ПСА [6, 70]. Крупнейшее рандомизированное исследование, проведенное в 2009 году, показало, что более 70% биопсий, выполненных при повышенном уровне ПСА у 1178 мужчин, были отрицательны [91]. Таким образом, выявление повышенного уровня ПСА в сыворотке крови не всегда является исключительным показателем РПЖ, и может быть использован только как один из этапов его комплексной диагностики.

Основным инструментальным методом дооперационной диагностики РПЖ является трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) предстательной железы. Метод позволяет оценить размеры опухоли, установить ее распространение на семенные пузырьки, перипростатическую клетчатку, мочевого пузырь [91]. Несмотря на широкое применение ТРУЗИ в клинической практике, диагностическая ценность метода остается невысокой. По данным некоторых

авторов, в 50% случаев опухолевый узел при ТРУЗИ имеют изоэхогенную структуру и не отличаются не только от нормальной ткани ПЖ, но и от окружающих её структур, особенно при локализации опухолевого узла в переходных зонах [8, 105].

В последнее время активно внедряется более чувствительный и специфичный метод по сравнению с ТРУЗИ – гистосканирование. В основе технологии лежит компьютерный анализ отраженных нативных ультразвуковых-сигналов от всей объемной площади ткани предстательной железы, на основе которого можно дифференцировать и пространственно локализовать опухоль в 3D-изображении [56]. В настоящее время «положительным» считается образование ПЖ, выявленное с помощью гистосканинга, объемом более 0,2 мл, что однако, не исключает принадлежность таких образований к узлам доброкачественной гиперплазии или участков простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН). Основными задачами исследования являются повышение эффективности анализа качества и информативности материала, получаемого с помощью пункционной биопсии простаты под контролем гистосканинга, и, как следствие, улучшение показателей ранней выявляемости рака простаты [23, 64]. К недостаткам метода ряд авторов относит низкую эффективность метода, что имеет место при оценке вовлеченности в опухолевый процесс семенных пузырьков и окружающих тканей, в том числе при новообразованиях объемом более 0,5 мл [104, 105].

Получение более детальной информации о вовлечении в опухолевой процесс прилежащих тканей и лимфатических узлов возможно с помощью метода магнитно-резонансной томографии (МРТ) органов малого таза. К несомненным преимуществам МРТ относят получение пространственного изображения ткани простаты при сочетании различных проекций томографии, с помощью которых возможно обнаружить даже небольшие по объему образования. Однако в случаях расположения опухоли в центральных отделах простаты, визуализация фокуса патологического образования затруднительна из-

за накопления контрастного вещества в данной области и в норме [28]. В связи с этим, все чаще на смену стандартной МРТ приходит метод мультипараметрической магнитно-резонансной томографии (мпМРТ) ПЖ, сочетающий в себе анатомические изображения (T1-взвешенные изображения (ВИ) и T2-ВИ) и функциональные последовательности (диффузионно-взвешенные изображения (ДВИ) с построением карт измеряемого коэффициента диффузии (ИКД) (ДВИ-ИКД)), динамическую МРТ с контрастным усилением после внутривенного введения магнитно-резонансного (МР) контрастного средства (МРКС), а также в ряде случаев протонную МР-спектроскопию *in vivo*[16]. В основе анализа изображений мпМРТ ПЖ лежит концепция последовательного сопоставления одного и того же подозрительного участка ПЖ на T2-ВИ, ДВИ-ИКД и при динамической МРТ с контрастным усилением. Полученные данные позволяют определить наличие РПЖ, его агрессивность, локализацию и перспективы его дальнейшего метастазирования [20]. Анализ полученных данных достаточно сложен и требует участия высококвалифицированных специалистов лучевой диагностики.

Все эти диагностические методы и технологии, несмотря на высокую информативность, не являются основными и исключительными для постановки диагноза РПЖ, а представляют собой звенья одного диагностического алгоритма, направленные, прежде всего, на осуществление «навигации» при выполнении пункционной биопсии предстательной железы с последующим гистологическим исследованием. В настоящее время ни один из современных неинвазивных методов диагностики по чувствительности и специфичности не может быть альтернативой биопсии предстательной железы (ПЖ), необходимость проведения которой общепризнана (уровень доказательности II)[12].

### **1.1.2 Роль гистологического исследования в диагностике рака предстательной железы на дооперационном этапе**

Ведущую роль в морфологической верификации диагноза играют различные варианты осуществления пункции предстательной железы –

секстантная, сатурационная, прицельная под контролем ТРУЗИ. Однако способ выбора участков-мишеней для выполнения пункции как для первичной верификации РПЖ у пациентов с отрицательными результатами первичной биопсии, так и при подозрении на наличие рецидива РПЖ после проведения радикальной простатэктомии (РПЭ) остается сложной диагностической проблемой [75].

Методику секстантной биопсии, по которой материал получали трансректально из 6 точек - верхушке, в средней части, ближе к основанию в парасагиттальных плоскостях в обеих долях ПЖ, впервые предложил К. Hodge и соавт (1989) [69]. Несмотря на то, что секстантная биопсия неоднократно претерпевала модификации вследствие недостаточного охвата периферической зоны ПЖ, методика продолжает применяться в урологической практике.

Значительная часть исследователей считает оптимальным для улучшения выявляемости РПЖ получение материала из 6 - 12 точек ПЖ. [81, 97, 109]. В масштабной работе Eichler К. и соавт., провели сравнительный анализ различных схем биопсий более чем у 20 тыс. пациентов, и получили убедительные доказательства наилучшей диагностики РПЖ, при использовании 12-точечной схемы. Кроме того именно при применении этой схемы было выявлено минимальное количество осложнений [53]. Несмотря на высокие показатели эффективности 12-точечной схемы в сравнении с другими вариантами, вероятность установления диагноза РПЖ колеблется от 52 до 71% [19, 97]. Наиболее вероятным объяснением этого, является тот факт, что ввиду небольшого объема ткани предстательной железы, получаемой с помощью пункционной биопсии, идентификация опухолевых клеток может быть затруднена. В частности, при гетерогенности опухоли, в биоптате ПЖ выявляются признаки предопухолевых изменений, в виде простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) или атипической мелкоацинарной пролиферации (АМАП), а признаки классической аденокарциномы могут отсутствовать, что является показанием к проведению повторной пункционной

биопсии [81]. Таким образом, заключение гистологического исследования операционного материала после радикальной простатэктомии нередко не соответствуют результатам биопсии и в случаях сличения показателей шкалы Глисона биопсийного и операционного материала у больных с индексом РПЖ 2-4 балла, совпадение выявляется лишь в 48,3%, а при значениях свыше 5 баллов – в 77,2- 80,5% случаев [5]. Как и любой инвазивный метод, метод пункционной биопсии ПЖ сопряжен с риском развития осложнений, таких как кровотечение, гематурия, острая задержка мочеиспускания, а также возникновение инфекционных процессов.

Возможности трансперинеальной сатурационной биопсии ПЖ под контролем трансректального ультразвука с использованием решетки для брахи/криотерапии в настоящее время широко изучаются во всем мире. К несомненным преимуществам этого доступа относят возможность его применения в группе пациентов с высоким риском развития сепсиса (сахарный диабет и др.), а также при наличии устойчивости к противомикробным препаратам. В то же время использование промежностного доступа требует больших финансовых и временных затрат, адекватного обезболивания и специального оборудования [31, 44].

В настоящее время все чаще в клинической практике стал применяться один из наиболее перспективных способов пункционной биопсии – Fusion-биопсия. Fusion-биопсия является прицельным вариантом биопсии ПЖ, проводимая после предварительного совмещения результатов МРТ и ТРУЗИ с последующим созданием трехмерного изображения органа на экране ультразвукового аппарата, оснащенного специализированным программным обеспечением. Основное преимущество методики – возможность получения материала из областей ПЖ, неопределяемых при ТРУЗИ, в частности в её передних отделах. M. Siddiqui и соавт. отметили, что при применении Fusion-биопсии диагностируется на 67% больше опухолей с клинически значимыми показателями шкалы Глисона ( $\geq 4+3$ )[106].

Исследования последних лет [40, 49] доказывают, что с увеличением числа точек взятия биопсии выявляемость рака предстательной железы возрастает, однако, до сих пор остается не решенным вопрос трактовки прогноза течения заболевания. Однозначный ответ в этом вопросе может дать лишь гистологическое исследование. Общепринятая гистологическая шкала градации Глисона, по этому поводу, неоднократно претерпевала изменения. Согласно последнему консенсусу онкоурологов совместно с онкопатологами (2016), было достигнуто соглашение - наряду с традиционной гистологической градацией указывать прогностическую группу [89]. Особое значение такое положение имеет для скрытых форм РПЖ, к которым относится латентный рак, выявленный при морфологическом исследовании ткани предстательной железы, удаленной во время трансуретральной резекции (ТУР) или открытой аденомэктомии по поводу доброкачественной гиперплазии простаты (ДГПЖ). В подавляющем большинстве случаев РПЖ, сопутствующий ДГПЖ, клинически не диагностируется и распознается лишь при гистологическом исследовании удаленной части предстательной железы с гиперплазированной тканью. Данную форму рака относят к "случайно обнаруженному", частота диагностики которого составляет 5-22% [85, 99]. В большинстве случаев элементы рака обнаруживаются преимущественно в периферических зонах узла. Сравнительно редко отмечается непосредственная малигнизация аденоматозных узлов, при этом опухолевые элементы выявляются внутри узлов гиперплазии. При всех вариантах озлокачествления иногда выявляются менее дифференцированные участки опухоли с наличием структур типа анапластической аденокарциномы, солидного и скirrosного рака[2].

По мнению ряда специалистов, серьезную проблему морфологической диагностики для патологоанатомов, представляет дифференцировка атипических предраковых изменений ПЖ, объединенных в понятие простатической интраэпителиальной неоплазии, с её злокачественной трансформацией [79]. Очаги ПИН представлены различной степенью пролиферации клеточных

элементов протоков и альвеолярно-трубчатых желез. Высокая степень ПИН по зональному расположению в подавляющем большинстве случаев выявляется в периферической зоне ПЖ, что соответствует частоте распределения рака в этой же области. Участки ПИН нередко обнаруживаются совместно с участками карциномы, но могут встречаться изолированно или на расстоянии от очага карциномы [32, 41]. По данным Юрмазова З.А. (2009), частота встречаемости ПИН высокой степени при пункционной биопсии с подозрениями на опухоль ПЖ, составляет 41,6% на фоне различной патологии, в 19,7% - выявлено сочетание РПЖ и ПИН [31]. Результаты масштабного исследования 62537 биопсий с подозрением на РПЖ, американскими учеными Ogozco R. и соавт., показали лишь 4,1% встречаемости ПИН высокой степени при первичной биопсии ПЖ [93]. Однако, при повторной биопсии простаты, от лиц с ранее обнаруженной изолированной высокой степенью ПИН, признаки аденокарциномы определялись в 29-50% случаях [92, 120].

Приравненной по прогностическому значению к ПИН высокой степени является группа гиперпластических или атрофических морфологических изменений объединенных в термин «атипическая мелкоацинарная пролиферация» [111]. Сходство гистоархитектоники с мелкоацинарной аденокарциномой требует применения дополнительных методов морфологического исследования для верификации диагноза [99]. От 1,5 до 5,3% всех биоптатов предстательной железы содержат единичные очаги из мелких ацинарных структур, вызывающих подозрение на рак, но не достигающих диагностического «порога». Эти очаги атипической мелкоацинарной пролиферации (АМАП) при дальнейшем исследовании в 43% оказываются участками аденокарциномы [95].

### 1.1.3 Применение иммуногистохимического исследования в диагностике рака предстательной железы

Для повышения эффективности диагностики и проведения в дальнейшем таргетной терапии, обязательным условием для гистологической диагностики является проведение и иммуногистохимического (ИГХ) исследования.

Отсутствие базальных клеток является основным критерием для подтверждения РПЖ. Учитывая тот факт, что чаще всего РПЖ гистологически имеет вид ацинарной аденокарциномы, при световой микроскопии особое внимание должно уделяться их идентификации. Следует отметить, что не только при разных случаях, но и в одном образце, внешний вид базальных клеток может варьировать (тангенциальные, «раздробленные», «вытянутые»). К иммуногистохимическим маркерам, способным подтвердить наличие или отсутствие базальных клеток относят различные виды цитокератинов, а также белок p63 [97].

К наиболее широко применяемым «базальноклеточным» маркерам относятся моноклональное антитело 34βE12, более известное как антиген для высокомолекулярного цитокератина (HMWCK). Оценка экспрессии HMWCK, хотя и используется в качестве подтверждения для РПЖ, однако, некоторые авторы склоняются к мнению о «переоценке» его эффективности [117]. Связано это, прежде всего, с тем, что отсутствие базальноклеточной экспрессии не всегда является основным критерием для верификации РПЖ, в частности, отсутствие базальных клеток может наблюдаться в некоторых железах малого размера [55]. К более чувствительным маркерам для обнаружения базальных клеток относится белок p63, локализованный в их ядрах [65, 101]. Однако, в работе Osunkoya A.O. и соавт. (2012) отмечено, что в 6% случаев определяется положительная экспрессия неопластическими клетками p63[85].

Первоочередным маркером РПЖ в линейке диагностических является альфа-метил-КоА-рацемаза (AMACR). AMACR является продуктом экспрессии

гена p504S, относится к цитоплазматическим белкам, участвующим в  $\beta$ -окислении жирных кислот и локализованным в митохондриях и пероксисомах. Высказывается мнение, что избыточное накопление АМАСР связано с изменением баланса клеточных оксидантов, что, в свою очередь, приводит к продукции активных форм кислорода, вызывающих повреждение ДНК [84]. В клинической практике маркер АМАСР зарекомендовал себя незаменимым для дифференциальной диагностики аденокарциномы простаты и преопухолевых процессов [71]. Высокоположительная экспрессия АМАСР достигает значений до 90-100% в малых очагах РПЖ и участках ПИН высокой степени даже в материалах пункционных биопсий, и, напротив, характеризуется низкими показателями (10-17%) в случаях с АМАП [10, 42]. На сегодняшний день для улучшения диагностики РПЖ все чаще применяется тройной коктейль маркеров, в состав которого входят АМАСР и маркеры базальных клеток – p63 и высокомолекулярный цитокератин. В работе Летковской Т.А., и соавт. (2011 г.), для морфологической диагностики случаев мелкоацинарной пролиферации ПЖ с переменными признаками цитологической атипии и сомнительными признаками инвазии в биоптатах ткани ПЖ был использован тройной коктейль ИГХ маркеров (АМАСР+p63+НМWSC). Результатом исследования явилось снижение числа неясных диагнозов до 8,1% [17]. Сочетание базальноклеточных маркеров и АМАСР используется не только для дифференциальной диагностики аденокарциномы простаты, но и оценки рецидива РПЖ после проведения гормональной терапии. Исследование Ming-Tse Sung и соавт. (2007), подтвердило, что применение тройного коктейля маркеров способствуют обнаружению отрицательной экспрессии НМWSC и p63 во всех случаях аденокарциномы ПЖ, при сохранении переменных значений экспрессии маркера АМАСР (71%) в этих же участках. Примечательно, что в 29% случаев были обнаружены участки ткани ПЖ с сочетанной экспрессией как маркера АМАСР, так и базальноклеточных маркеров, что также убедительно свидетельствовало в пользу наличия опухоли [104]. Однако, следует отметить, что существуют также редкие формы аденокарциномы, к которым относится пенистоклеточный,

муцинозный и перстневидноклеточные формы, в 25-38% случаях не экспрессирующие AMACR [119].

В современной литературе практически отсутствуют сведения о роли нейроэндокринных (NE/ НЭК) клеток в развитии РПЖ. Эти клетки широко распространены в ацинарных и протоковых структурах предстательной железы, и очевидно влияют на её формирование и осуществляют секреторные процессы в зрелом возрасте [51, 66]. При РПЖ нейроэндокринные клетки выявляются в 3-х гистологических вариантах опухоли: при низкодифференцированной мелкоклеточной нейроэндокринной карциноме, карциноидной опухоли, или ацинарной аденокарциноме с локальной нейроэндокринной дифференцировкой. РПЖ, состоящий только из НЭК, выявляется примерно в 1% случаев РПЖ. При световой микроскопии ему соответствует характерная мелкоклеточная недифференцированная морфологическая картина аналогичная мелкоклеточному раку легкого [24]. Оптимальными маркерами выявления этих клеток методом ИГХ являются хромогранин А и серотонин [34].

К молекулярно-биологическим маркерам, позволяющим оценить потенциал злокачественности опухоли, в настоящее время относят факторы роста (VEGF, IGF, EGFR), маркеры пролиферативной активности (Ki-67), и регуляторы апоптоза (p53, bcl-2). С их помощью возможно прогнозирование течения РПЖ, оценки риска отдаленных метастазов и вероятности послеоперационного рецидива [10].

Влияние плотности сосудистой сети на интенсивность роста РПЖ достоверно подтверждено многочисленными исследованиями [29, 87, 113]. Наиболее известный сигнальный белок, стимулирующий процесс васкуляризации - Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), способствует пролиферации эндотелиальных клеток в условиях физиологического и патологического ангиогенеза [85]. Интенсивная экспрессия VEGF при РПЖ отмечена всеми клетками опухоли - как базальными, так и клетками стромы, а также выявлена зависимость уровня экспрессии VEGF от степени дифференцировки опухоли по

шкале Глисона ( $R_s=0,78$ ) [29]. Рассчитать показатель плотности васкуляризации с целью прогнозирования экстрапростатического распространения также возможно с помощью окрашивания на CD34 для визуализации эндотелия, с последующим подсчетом среднего количества сосудов в  $1 \text{ мм}^2$  площади среза [38]. К. А. Gautam и соавторы в своем исследовании отметили, что уровень экспрессии VEGF и CD34 значительно отличается от ДППЖ. Однако к более перспективным прогностическим маркерам авторы отнесли VEGF, в виду прямой корреляции уровня его экспрессии и степени атипичности по шкале Глисона в изучаемых образцах [60].

Показатель пролиферативной активности опухоли - важнейший фактор, оказывающий влияние на скорость роста новообразования. Критерием оценки пролиферативной активности опухоли является показатель экспрессии ядерного антигена Ki-67, обычно определяемый в активной фазе клеточного цикла. По данным Coetzee L.J и соавт., (1997г) применение Ki-67 позволяет определить количество опухолевых клеток в исследуемом образце и разграничить локальные и метастатические формы РПЖ [45].

Набирающий популярность в практической деятельности, маркер ERG рекомендован многочисленными исследователями в качестве прогностического, позволяющего определить вероятность биохимического рецидива опухоли [ 57, 58, 59]. Продукт гена ERG (ETS-related gene) задействован в регуляции клеточной пролиферации, гемопоэза, а также сохранении целостности сосудистых стенок. При РПЖ ERG определяется в слиянии с геном TMPRSS2, кодирующим сериновую протеазу, секретлируемую эпителием простаты в ответ на действие андрогенов. Такая перестройка приводит к образованию химерного гена TMPRSS2-ETS, через который ERG гиперэкспрессируется под контролем андрогенов. В мировой литературе достаточно часто сообщается о прямой коррелятивной связи между экспрессией ERG и степенью атипичности опухоли [15, 77, 107]. Ученые Suh и соавт. (2012) в своем исследовании показали, что уровень экспрессии ERG в образцах ацинарной аденокарциномы с значениями шкалы

Глисона  $\leq 7$  значительно ниже относительно подгруппы с более низкой степенью дифференцировки (значения по Глисон  $\geq 8$ ) ( $p=0,011$ ).

Учитывая большое многообразие иммуногистохимических маркеров, постоянное внедрение и разработку новых антител для диагностики РПЖ, метод иммуногистохимического исследования позволяет не только с высокой точностью диагностировать РПЖ, но и прогнозировать дальнейшее течение заболевания. Вместе с тем, в связи с постоянной модификацией существующих классификаций, новых достижений в изучении онкогенеза, оценить течение болезни и установить окончательный диагноз по одному маркеру невозможно. Особенно сложным для патологоанатома является выбор панели антител в случаях с редкими гистологическими формами РПЖ, а также «мимикрирующими» процессами в виде ПИН и АМАП, что подразумевает необходимость в проведении масштабных исследований в этой области.

## **1.2. Раман-люминесцентная спектроскопия как новый метод оптической диагностики опухолей**

Трудности дифференциальной диагностики рака предстательной железы и предопухолевых процессов являются постоянным стимулом для разработки и внедрения в клиническую практику новейших диагностических методов, основанных на применении высокотехнологичной и чувствительной аппаратуры. В настоящее время в мировой литературе все чаще появляются сообщения об использовании лазерной оптической спектроскопии в диагностике широкого числа заболеваний [37, 43, 63, 114]. По сравнению с вышеперечисленными методами визуализации (МРТ, ТРУЗИ) оптические методы обладают рядом уникальных преимуществ. Во-первых, оптическое излучение является неионизирующим, поэтому не представляет опасности здоровью, даже в течение длительного воздействия. Во-вторых, оптические измерения основываются на биохимических и морфологических изменениях исследуемой ткани. В-третьих,

технический прогресс в разработке источников света и их детекторов позволил достичь высокого воспроизведения результатов исследования при глубине измерений тканей от нескольких сотен микрометров до нескольких сантиметров путем настройки длины волны света и изменения конфигурации детектора. Кроме того, разработка волоконно-оптических зондов и миниатюрных детекторов позволила использовать оптическую спектроскопию в эндоскопическом оборудовании [109].

Основу оптической спектроскопии для характеристики ткани составляют различные взаимодействия между светом и тканью, включая рассеяние и люминесценцию.

Рассеяние относится к явлению, при котором фотон отклоняется от направления падения после взаимодействия с молекулой в ткани, при этом рассеяние может происходить как без изменения частоты от падающего фотона к рассеянному фотону (упругое рассеяние), так с изменением (неупругое рассеяние). В зависимости от того, уменьшается или увеличивается частота рассеянных фотонов, неупругое рассеяние называется Рамановским рассеянием или антистоксовым комбинационным рассеянием (часто просто комбинационным рассеянием) [72]. Процесс рассеяния монохроматического света происходит совместно с процессом его поглощения - фотолюминесценцией, линии которой обычно значительно интенсивнее линий рамановского рассеяния. Люминесцентный анализ базируется на высвечивании квантов света различными молекулами - флуорофорами, входящими в состав исследуемой ткани. Природные флуорофоры принято делить на три класса: аминокислоты, коферменты и пигменты [100].

К Рамановским рассеивателям в тканях относят цитоплазму клетки, клеточное ядро, жир, коллаген, холестериноподобные липидные отложения и воду [83]. Спектр большинства органических молекул состоит из линий, отвечающих деформационным валентным колебаниям химических связей углерода (C) с

другими элементами, как правило, водородом (H), кислородом (O) и азотом (N), а также характеристическим колебаниям различных функциональных групп (гидроксильной OH, аминогруппы NH<sub>2</sub> и т.д.). Эти линии проявляются в диапазоне от 600 см<sup>-1</sup> (валентные колебания одинарных C-C связей) до 3600 см<sup>-1</sup> (колебания гидроксильной группы) [14].

Таким образом, при помощи рамановского спектрометра можно одновременно получать спектр рамановского рассеяния и спектр люминесценции исследуемого образца.

Впервые эффект комбинационного рассеяния света (рамановского рассеяния света) был открыт при изучении рассеяния света в жидкостях, с использованием в качестве источника возбуждающего излучения солнечный луч, индийскими учёными Ч. В. Раманом и К. С. Кришнаном в 1928 году. Применяя определенные комбинации абсорбционных светофильтров, авторы пришли к выводу, что в жидкостях происходит рассеяние света, сопровождаемое сдвигом частоты, позже подобное явление было выявлено не только на жидкостях, но и газах и твердых телах и названо «Эффектом Рамана». Еще каких-то 20 лет назад стандартная установка для исследования рамановского рассеяния обычно включала в себя мощный лазер, тройной спектрометр и охлаждаемый матричный фотодетектор. Высокая стоимость таких установок и их большие размеры препятствовали широкому применению рамановского метода для экспресс-анализа объектов медицинского назначения. В последние годы ситуация на рынке научных приборов радикально изменилась, что позволило значительно уменьшить и удешевить все компоненты рамановской установки. Для анализа *in vivo* применяется гибкий ультратонкий волоконно-оптический кабель, встраиваемый в стандартную иглу, предназначенную для проведения пункционной биопсии.

Возможности использования рамановского эффекта для диагностики опухолей различных локализаций отражены в работах многих специалистов, большая часть из которых посвящена дифференциальной диагностике

рака молочной железы, шейки матки, опухолей кожи и головного мозга [33, 62, 90, 116, 118, 121 ].

Применение рамановской спектроскопии в качестве дифференциально-диагностического метода РПЖ, предложили Crow P., и соавт. В своей работе 2003 года авторы отметили изменения в соотношении гликогена и ДНК в тканях с доброкачественной гиперплазией и аденокарциномой предстательной железы. Так, при РПЖ было отмечено снижение интенсивности рамановского рассеяния гликогена и увеличение интенсивности рассеяния ДНК, и обратная зависимость их спектральных характеристик в тканях с ДГПЖ [48]. В 2005 году теми же авторами [47] было проведено исследование культуры клеток рака простаты, выделенных у человека, высокой (DU145) и низкой (MDApcsa2b) степени дифференцировки. Целью работы явилось подтверждение изменений концентрации гликогена и нуклеиновых кислот на разных стадиях развития РПЖ, основываясь на интенсивности рамановского рассеяния этих веществ в каждом случае. Это исследование не только подтвердило закономерность, установленную в более ранних работах, но и позволило максимально точно идентифицировать каждую клеточную линию согласно полученным спектрам. Позже, в 2009 г. Шарма и соавт. [102] сообщили о разработке ультратонкого волоконно-оптического зонда для проведения *in vivo* рамановской спектроскопии путем комбинации его с пункционной иглой.

В недавнем исследовании Corsetti и соавт. (2018 г) провели дифференциальную диагностику на клеточных линиях образцов андрогензависимого и андрогеннезависимого РПЖ в трех спектральных диапазонах (330–1350 см<sup>-1</sup>), (1400–1800 см<sup>-1</sup>) (2800–3100 см<sup>-1</sup>). Спектральные данные были проанализированы с использованием PCA и последующего LDA в области «отпечатков пальцев» исследуемых образцов, что привело к дифференцировке клеточных линий с чувствительностью 95% и специфичностью 88%, при этом наибольшая разница определялась по содержанию фенилаланина, тирозина, ДНК, амида III и l-аргинина [46].

Изучение спектральных характеристик непосредственно тканей ПЖ при доброкачественной гиперплазии, ПИН высокой степени и РПЖ провели S. Devurigaа и соавт (2010). Авторы отмечают, что рамановские пики ДНК и триптофана, различия в значениях интенсивности во всех трех группах позволили добиться их точной дифференцировки. При этом, совпадение спектральных характеристик рамановского рассеяния с результатами патологоанатомического исследования в случаях с доброкачественной гиперплазией составило 86%, в случаях с ПИН высокой степени и РПЖ – 95,8% и 96,6%, соответственно [51].

Постоянное усовершенствование аппаратного и программного обеспечения рамановской спектроскопии открывает большие перспективы использования данной технологии в качестве неинвазивного инструмента диагностики рака простаты. В частности, стало возможным проводить анализ химических веществ в ультра малой концентрации (вплоть до нескольких молекул) при применении, так называемых, SERS-подложек, инициирующих эффект гигантского поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния (SERS – Surface Enhanced Raman Scattering). В настоящее время SERS-подложки успешно используются в диагностике циркулирующих опухолевых клеток в крови с целью раннего выявления рецидива и метастазов опухоли, а также мониторинга его терапевтического ответа. В работе Kamińska A. и соавт. (2019) опухолевые клетки у пациентов с РПЖ были идентифицированы с их помощью с точностью 98% [73].

Другая разновидность спектроскопии основана на явлении флуоресценции - излучению света, которое происходит в результате возвращения молекулы из возбужденного в основное состояние. Из-за потери энергии в процессе длина волны излучения всегда больше, чем длина волны возбуждения. Флуорофор относится к тем молекулам, которые проявляют флуоресценцию при освещении светом на определенных длинах волн. Флуоресцентный свет, излучаемый молекулами флуорофора, подвержен поглощению и рассеянию при распространении в тканях, что может вызвать затруднения при интерпретации

спектров флуоресценции. Наиболее широко изученными молекулами флуорофоров являются восстановленный никотинамид-адениндинуклеотид (NADH) и флаavin-адениндинуклеотид (FAD). Эти две молекулы являются метаболическими коферментами, участвующими в окислительно-восстановительных реакциях для получения энергии, обеспечивающей для клеточную деятельность. Флуоресценция, вносимая этими двумя флуорофорами, была исследована для оценки окислительно-восстановительных отношений, чтобы отразить изменение скорости метаболизма тканей [11].

В работе Каллаева К. К. (2012) подъем показателя интенсивности эндогенной флуоресценции ПЖ в норме и при раке отмечается при длине волны в диапазоне 645-655 нм, при том, что наименьшее значение его наблюдается в нормальной ткани, а наибольшее – в опухолевой. [11].

При применении лазерной установки с меньшим значением длины волны (340 нм) исследователями Yang Pu и соавт. (2010) на образцах узловой гиперплазии и ацинарной аденокарциномы, наилучшим образом на спектре выявлялись три ключевых биохимических компонента – коллаген, эластин и НАДН. При этом спектры люминесценции тканей с РПЖ по сравнению с образцами, полученными у больных с нодозной гиперплазией ПЖ, характеризовались более низкими показателями интенсивности флуоресценции коллагена и, наоборот, высокими значениями НАДН [96].

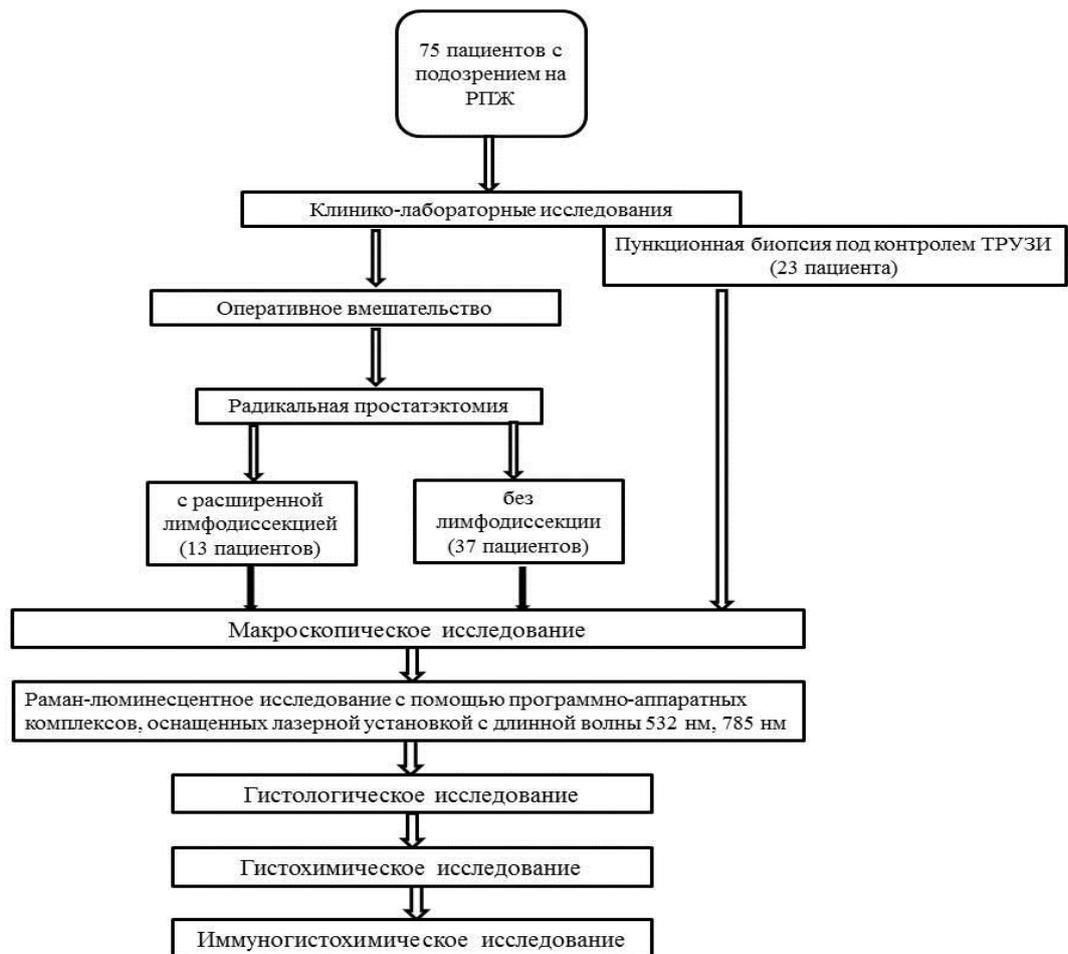
В качестве альтернативы для повышения результативности диагностики Lindahl и соавт. предложили двойной зонд рамановского спектроскопа и датчик жесткости, предназначенные для обнаружения положительного хирургического края во время радикальной простатэктомии. Зонд состоит из полого датчика жесткости, в который вмонтирована волоконная оптика, и подключается к рамановскому спектроскопу с длиной волны 785 нм (KaiserOptical), что дает возможность специалисту использовать как режимам «флуоресценции», так и «рамановской спектроскопии». При сочетании параметров жесткости, автофлуоресценции и рамановской спектроскопии авторы смогли достичь 100%

чувствительности и 91% специфичности в диагностике рака предстательной железы, демонстрируя потенциальную полезность комбинации зондов [82].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

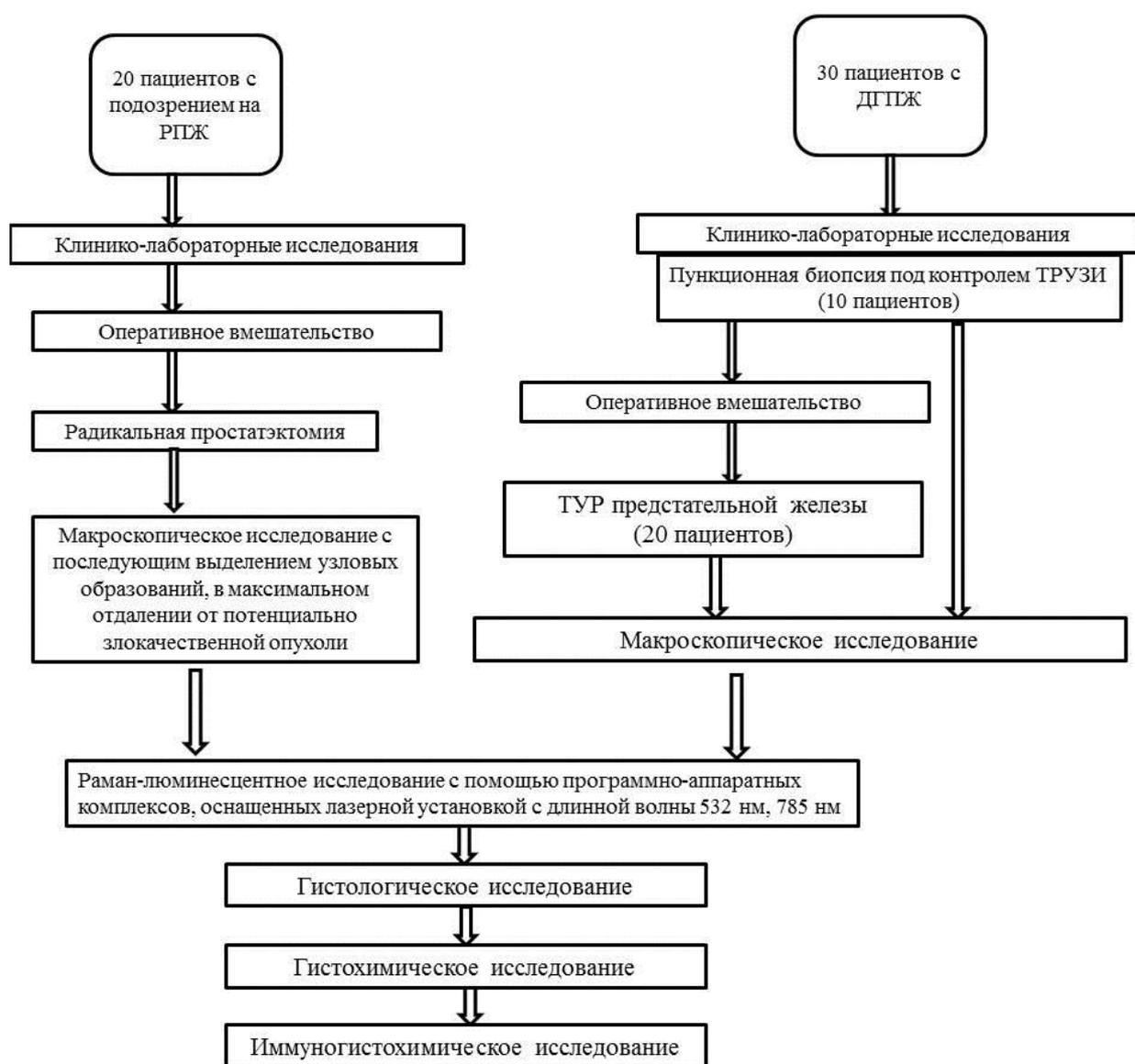
### 2.1. Материал исследования

Для решения поставленных задач были исследованы предстательные железы или их фрагменты, удаленные в ходе операции радикальной простатэктомии без (N=37) или с расширенной лимфодиссекцией (N=13), или при трансректальной мультифокальной пункционной биопсии под контролем УЗИ из 12 точек (N=25) у 75 больных по поводу рака предстательной железы в НИИ Уронефрологии и репродуктивного здоровья человека Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России. Средний возраст пациентов составил 65 лет (от 48 до 73 лет) (Рисунок 1).



**Рисунок 1. Дизайн проспективного исследования случай-контроль группы пациентов с РПЖ.**

Группу сравнения составили 50 образований, полученных от больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ), которым в связи с затрудненным мочеиспусканием была выполнена трансуретральная резекция (20 образцов) или пункционная биопсия железы (10 образцов), кроме того исследованию подверглись 20 узловых образований, в максимальном отдалении от потенциально злокачественного образования, удаленного в ходе радикальной простатэктомии. Средний возраст пациентов составил 66 лет (от 38 до 75 лет) (Рисунок 2).



**Рисунок 2. Дизайн проспективного исследования случай-контроль группы пациентов с ДГПЖ.**

Контрольную группу составили предстательные железы, полученные при аутопсиях от 10 мужчин, умерших в возрасте до 40 лет от других заболеваний, клинически и морфологически не имевшие признаков патологии предстательной железы, проведенных в ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница № 40 Департамента здравоохранения города Москвы». Образцы были изъяты из периферической области ПЖ. Средний возраст умерших составил 36 лет.

## **2.2. Методы исследования**

### **Морфологические методы исследования**

Морфологическое исследование проводилось на кафедре патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет)» и в Централизованном патологоанатомическом отделении Клинического центра ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет)».

При исследовании операционного материала ПЖ применяли стандартную методику обработки макропрепарата с отдельным иссечением семенных пузырьков, апикальной, базальной и средней части железы. Оставшуюся ткань ПЖ рассекали пошаговыми разрезами длиной 4-5 мм перпендикулярно длинной оси ПЖ (верхушка – основание) и дальнейшем разделением на правую и левую части. Далее полученные срезы заливали в парафин для последующего проведения гистологического исследования.

#### **2.2.1. Гистологическое исследование**

Гистологическое исследование проводилось на операционном материале предстательных желез с подозрением на рак после радикальной простатэктомии (n=375 блоков) и биоптатах ПЖ (n=300 блоков), полученных при мультифокальной пункционной биопсии. При стандартном гистологическом исследовании с окрашиванием гематоксилином и эозином во всех наблюдениях устанавливали тип опухоли, степень дифференцировки согласно шкале Глисона в

модификации J.Epstein et al (2016), при возможности (в образцах, полученных в ходе радикальной простатэктомии) - наличие положительных хирургических краев и экстрапростатическое распространение. Положительными хирургические края резекции считали в случаях, при которых комплексы аденокарциномы контактировали с краем простаты, при этом измеряли число положительных блоков, линейный размер края в миллиметрах. Экстрапростатическое распространение включало в себя наличие опухолевых клеток в перипростатической жировой клетчатке, перинеуральных пространствах сосудисто-нервного пучка, регионарных лимфатических узлах. Стадия опухолевого процесса оценивалась в соответствии с классификацией TNM UICC 8-го пересмотра (2017 г.).

Гистологическое исследование ПЖ, содержащих гиперплазированную ткань, проводилось на окрашенных гематоксилином и эозином операционном материале (n=256 блоков) и биоптатах ПЖ (n=120 блоков). В гистологическом заключении указывалась локализация гиперплазированных участков, морфологическая разновидность.

### **2.2.2. Гистохимическое исследование**

Для выявления соединительной ткани и дифференцировки её элементов проводили гистохимическую реакцию с трихромом по Массону.

### **2.2.3. Иммуногистохимическое исследование**

Иммуногистохимическое исследование материала проводили на парафиновых срезах с использованием авидин-биотиновым метода с докрасиванием гематоксилином. Используются моноклональные антитела (разведение 1:100) к высокомолекулярному цитокератину (HMWCK, клон 34βE12),  $\alpha$ -метилацил CoA рацемазе – AMACR (p504s). (Таблица 1). Интенсивность экспрессии оценивали визуально (0, 1+, 2+, 3+). Каждое иммуногистохимическое исследование проводилось с постановкой

положительного и отрицательного контроля для исключения вероятности получения ложнонегативных и ложнопозитивных результатов.

**Таблица 1. Панель антител, использованная в исследовании**

Маркер	Локализация	Характеристика
HMWCK (клон 34βE12)	Цитоплазма	В норме экспрессия осуществляется в базальных клетках эпителия ПЖ. При разрушении базального слоя клетки-продуценты ВЦК утрачиваются, и иммуногистохимическое исследование обнаруживает негативное окрашивание ткани ПЖ к цитокератину 34βE12.
AMACR	Цитоплазма	Продукт экспрессии гена p504B и участвует в β-окислении жирных кислот. AMACR образуется в митохондриях и пероксисомах малигнизированных клеток и в настоящее время расценивается как перспективный маркер аденокарциномы предстательной железы.

Окончательный результат определяли по следующим критериям:

- отрицательная реакция (0) – отсутствие окрашивания или экспрессия менее чем в 10% опухолевых клеток;
- слабоположительная реакция (+) - экспрессия в  $\geq 10\%$  опухолевых клеток;
- умеренноположительная реакция (++) - экспрессия в 10 – 50% опухолевых клеток;
- выраженная реакция (+++) -  $\geq 50\%$  опухолевых клеток

### 2.3. Раман-люминесцентная спектроскопия

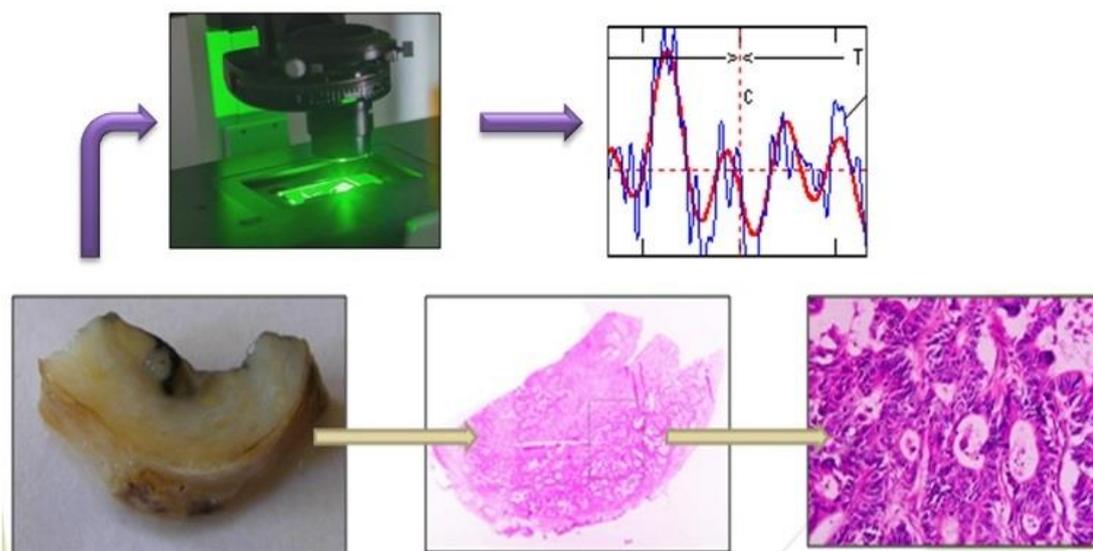
При выборе раман-люминесцентного анализатора одним из основных параметров является длина волны излучения лазера, встроенного в спектрометр. И хотя рамановский сдвиг любого материала зависит только от его химических свойств и не зависит от длины волны возбуждения, различные длины волн лазеров все же имеют свои сильные и слабые стороны. Так, Александров Н.С. (2019), изучил спектральные характеристики различных вариантов почечно-клеточного рака с помощью лазерной установки с длиной волны 532 нм, и доказал, что каждой гистологической форме рака почки присущи свои специфические оптические признаки, среди которых наибольшее значение имеют конфигурация спектра, количество локальных максимумов, их положение на шкалах рамановского сдвига и интенсивности, а также наличие или отсутствие пиков рамановского рассеяния [3]. Несомненным плюсом применения лазера длины волны 532 является простота «визуальной» интерпретации результатов исследования, в частности за счет преобладания люминесцентной составляющей в спектральной картине. Данный прибор оказался единственным лазером, имеющим рабочий диапазон 175 – 4000 см<sup>-1</sup>, что позволило использовать его для анализа веществ, содержащих –NH и –ОН функциональные группы. Вместе с тем, глубина проникновения лазерного луча составила лишь 1-3 мм, что ограничило вероятность эффективной диагностики образований с помощью данного лазера

лишь поверхностно расположенными, либо на их ступенчатых срезах [4]. Лазерная установка с длиной волны 785 нм характеризуется большей специфичностью полученных результатов, обусловленной идентификацией индивидуального набора специфических рамановских пиков, характерных для определенной ткани. Кроме того, лазер с длиной волны 785 нм характеризуется значительно большей глубиной проникновения в ткани (1 см), что способствует улучшению интраоперационной диагностики новообразований, выявлению метастазов даже при локализации их в лимфатических узлах, заключенных в жировую клетчатку. Учитывая, что каждый вариант лазерной установки позволяет получить различную информацию об исследуемой ткани, спектроскопическое исследование в настоящей работе проводили с помощью двух программно-аппаратных комплексов:

1. ИнСпектр R532, состоящего из микроскопа Olympus и спектрометра, разработанного ООО «ИнСпектр» (РУ №РЗН 2015/2419 от 18.05.2015). Длина волны лазерного излучения - 532 нм, размер лазерного пятна в фокусе - 10 мкм в диаметре, мощность лазера 10 мВт. Управление прибором, регистрацию и запись спектров производили с помощью специальной компьютерной программы ИнСпектр, также разработанной сотрудниками ООО «ИнСпектр» (г. Черноголовка). Программа осуществляла идентификацию химических веществ, соединений и отдельных молекул, регистрировала изменения их количественного и качественного состава в изучаемых группах по спектрам, сочетающим явления рамановского рассеяния и флуоресценции.
2. Измерительная система, состоящая из узкополосного источника возбуждения – лазера LML-785.0RB-04 (мощность излучения на выходе из пробника 200 мВт, длина волны излучения 785 нм), оптический модуль фильтрации RPB785 (InPhotonics) и регистрирующий приемник – спектрограф Sharmrock SR-500i с интегрированной камерой ANDOR DV-420A-OE.

Алгоритм применения раман-люминесцентной спектроскопии в настоящем исследовании состоял из нескольких этапов (Рисунок 3):

1. Исследуемый операционный образец ткани предстательной железы, полученный в ходе операции радикальной простатэктомии или ТУР, предварительно фиксированный в 10% растворе формалина, подвергали стандартной методики обработки макропрепарата [23], но без маркировки поверхности красителями для исключения артефактов спектроскопического исследования.
2. Перед проведением морфологических методов исследования объект исследования (операционный или биопсийный материал ПЖ) поочередно располагали на предметном стекле, локализованном на движущейся подложке раман-люминесцентного спектрометра с длиной волны 532 нм, затем рамановского спектрометра с длиной волны 785 нм со всей площади образца.
3. Спектры рамановского рассеяния света и сигнала флуоресценции с исследуемого объекта записывали на компьютер с помощью специального программного обеспечения, благодаря чему не только регистрировали спектр, но и автоматически сравнивали полученный спектральный сигнал с эталонными спектрами веществ, хранящимися в базе данных. Результаты регистрации спектра представляли в виде графика, на оси ординат которого фиксировали интенсивность рамановского излучения, и на оси абсцисс – сдвиг рамановского излучения, выражающийся в волновых числах ( $\text{см}^{-1}$ ). При необходимости перевода « $\text{см}^{-1}$ » рамановского сдвига в «нм» применяли онлайн-конвертер электронного ресурса <http://photonetc.com/>.
4. В последующем исследуемый объект в неизменном виде направляли на последующее морфологическое исследование.



**Рисунок 3. Алгоритм проведения морфологического и спектроскопического исследований.**

#### **2.4. Статистические методы исследования**

Статистическую обработку данных выполняли на персональном компьютере с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica for Windows 10,0 (Stat.Softinc.США). Все полученные количественные, анамнестические, клинические, лабораторные и инструментальные данные обрабатывали с помощью метода вариационной статистики.

Оценивали нормальность распределения полученных данных с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, в зависимости от чего использовали параметрические или непараметрические методы оценки. Производили вычисление средних значений показателей и стандартной ошибки ( $M \pm SE$ ), а также t-критерия Стьюдента при нормальном распределении, в противном случае определяли U-критерий Манна-Уитни. Для анализа связи между признаками применяли вычисление коэффициентов корреляции и детерминации. Уровень вероятности не менее 95% считали статистически значимым ( $p \leq 0,05$ ).

Полученные данные, будучи по своей сути многомерными и многопараметровыми (длина волны рассеянного излучения, интенсивность флуоресценции и рамановского рассеяния) анализировали с использованием

метода дискриминантного анализа с помощью проекции на латентные структуры (PLS-DA). Суть метода состояла в том, что дискриминационные правила для классов были заданы линейными регрессионными уравнениями. Из регистрируемых данных, интенсивности раман-флуоресцентных спектров на определенных сдвигах волн, составляли матрицу, где каждому образцу присваивали значение 0 или 1, в зависимости от принадлежности классу сохранной (0) или опухолевой ткани (1). Регрессионную задачу решали методом проекций на латентные структуры, что позволило в дальнейшем предсказывать принадлежность новых образцов. Также PLS-DA позволил выявить спектральные особенности для классов, связанных с наличием соединений и молекул, определяемых в качестве опухолевых маркеров, находившихся в ткани почки. Перед применением метода PLS-DA регистрируемые данные были избавлены от шума методом Савицкого-Голея [98] и фонового излучения методом коррекции опорной линии с использованием ассиметричных наименьших квадратов [36]. Все методы предобработки и многомерный анализ были реализованы в онлайн программном обеспечении TPtcloudbeta.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Результаты морфологического исследования образцов рака предстательной железы

При макроскопическом исследовании образцов с РПЖ в 74,7% опухолевые узлы выявили в периферической области железы, 21,3 % - в периуретральной, и в 4% установили диффузное прорастание. Результаты анализа клинических и лабораторных характеристик 75 пациентов с РПЖ представлены в таблице 2. При исследовании гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, во всех случаях была диагностирована ацинарная аденокарцинома, образованная железистыми структурами различными по размерам и конфигурации, с наличием признаков ядерной атипии. Распределение наблюдений по степени дифференцировке согласно шкале Глисона в модификации 2016 года представлено в таблице 3. Согласно приведенным данным, большую долю наблюдений (85,3%) составляли случаи с умереннодифференцированным вариантом ацинарной аденокарциномы, относящиеся к 1 и 2 прогностическим группам (Рисунок 4). В некоторых случаях встречались редкие варианты ацинарной аденокарциномы: атрофический – 4 случая (5,3%), пенистоклеточный – 3 случая (4%), псевдогиперпластический – 2 случая (2,7%) (Рисунок 5). При оценке суммы Глисона в операционном материале перинеуральная инвазия выявлена в 7 наблюдениях (14%), инвазия в капсулу без её прорастания выявлена в 5 случаях (10%), поражение семенных пузырьков – 4 случая (8%) (Рисунок 6). Ни в одном случае не было выявлено распространения опухоли на соседние структуры, а также метастазирования в регионарные лимфоузлы. Таким образом, распределение случаев по стадиям согласно классификации TNM сложилось следующим образом: pT2a - 10 (20%), pT2b - 12 (24%), pT2c – 17 (34%), pT3a - 0 (0%), pT3b - 4 (8%). На светооптическом уровне опухоль во всех случаях имела неоднородную структуру, и помимо тяжей из атипичных клеток, выявлялись гиперпластические или пренеопластические процессы (Диаграмма 1). С целью подтверждения наличия или отсутствия

опухолевой трансформации в подозрительных участках, было проведено ИГХ-исследование, по результатам которого во всех 75 образцах были идентифицированы участки, характеризующиеся отсутствием маркера базальных клеток – HMWCK, и выраженной экспрессией AMACR, что подтвердило диагноз ацинарной аденокарциномы, а также позволило исключить в 8% случаев очаговую простатическую атрофию (ОПА) от атрофической формы аденокарциномы.

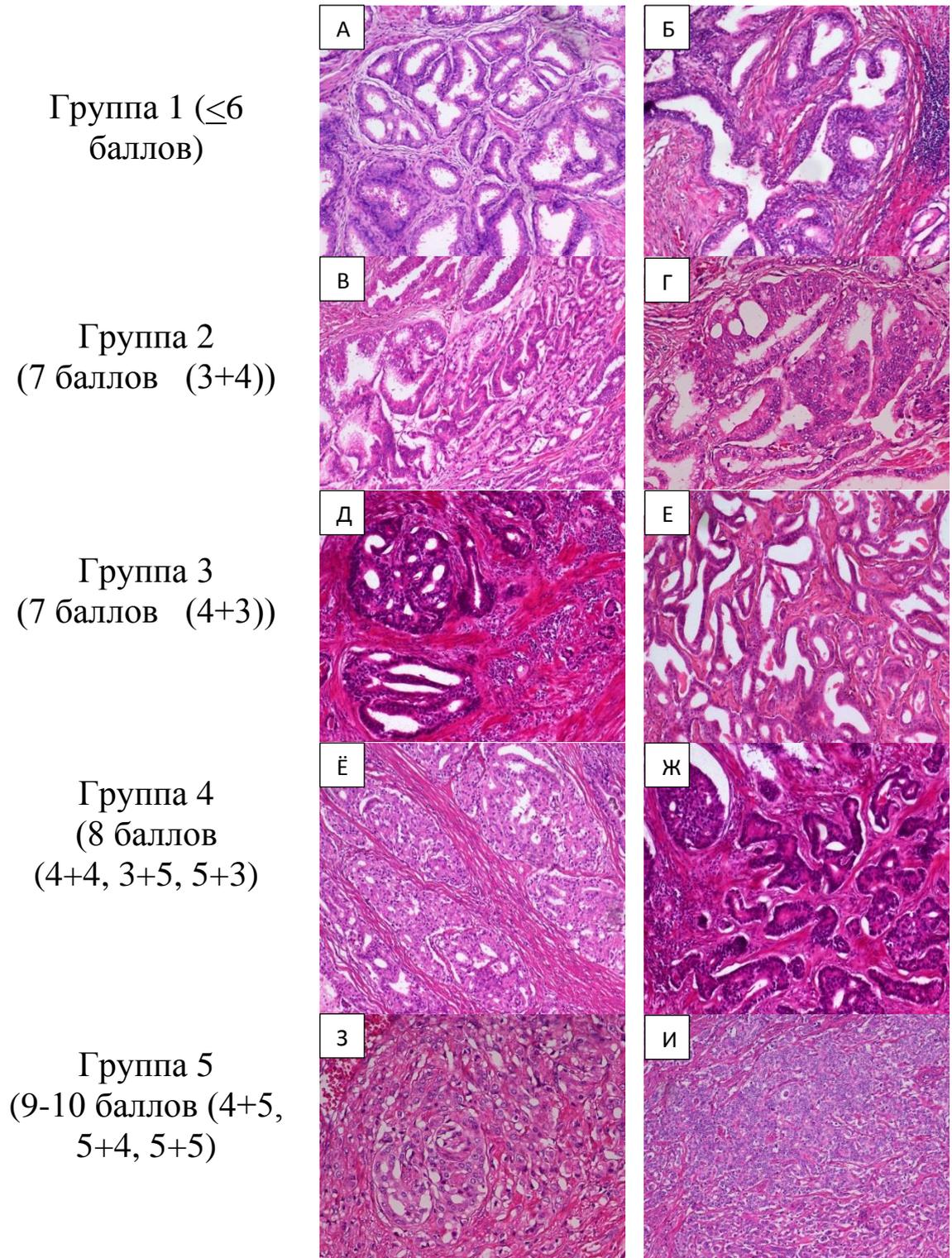
**Таблица 2. Клинико-лабораторные показатели основной группы исследования**

Показатель	РПЖ n, (%)
<b>Возраст</b>	
< 50 лет	8 (10,7)
51-55 лет	10 (13,3)
56-60 лет	7 (9,3)
61-65 лет	24 (32)
66-70 лет	18 (24)
>71 лет	8 (10,7)
<b>Жалобы</b>	
Странгурия	75 (100)
Гематурия	7 (9,3)
Поллакиурия	73 (97,3)
Боли в костях	1 (1,3)
<b>Уровень ПСА общ, нг/мл</b>	
≤2,5	0
2,5 – 4,0	2 (2,7)
4,1 – 10,0	48 (64)
10,1 – 20,0	19 (25,3)
20,1 – 30,0	2 (2,7)
>30,1	4 (5,3)
<b>Объем ПЖ по данным ТРУЗИ</b>	
≤ 30 см <sup>3</sup>	7 (9,3)
> 30 см <sup>3</sup>	68 (90,7)

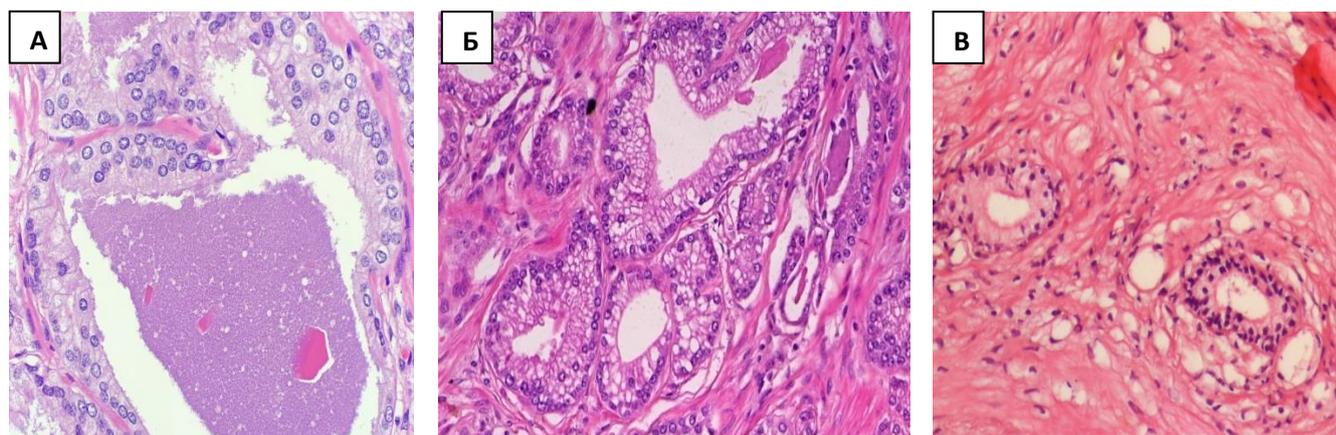
**Таблица 3. Распределение случаев РПЖ по степени дифференцировки согласно шкале Глисона в модификации J.Epstein et al (2016) и прогностическим группам ISUP (2016).**

Сумма показателей по шкале Глисона	≤6	7	7	8	9-10
		3+4	4+3		
Количество, n (%)	42 (56%)	22 (29,3%)	5 (6,7%)	3 (4%)	3 (4%)
Прогностическая группа (Grade)	I	II	III	IV	V

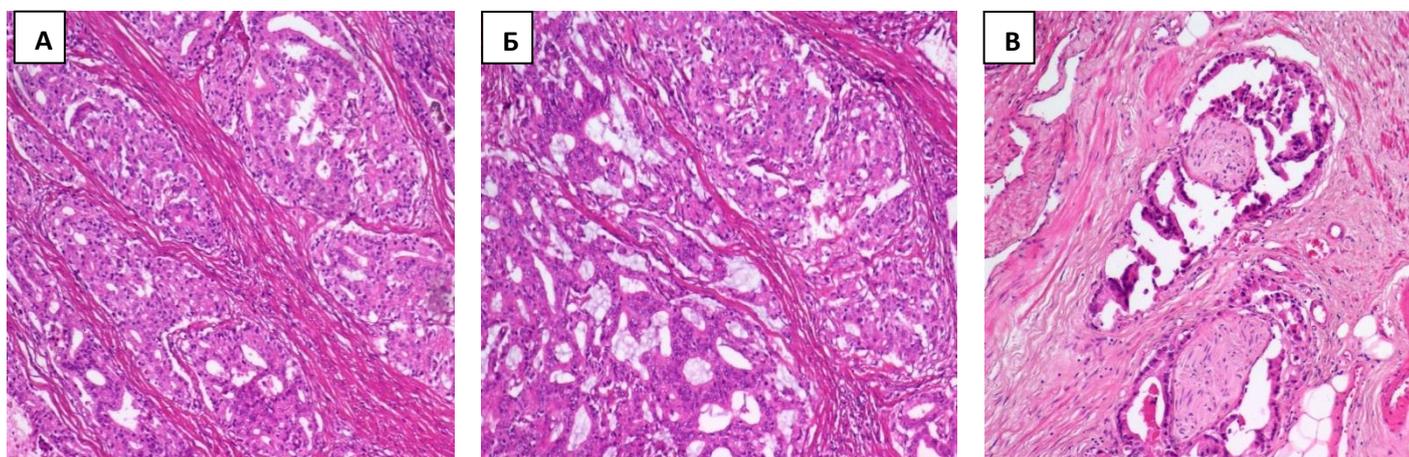
В 30% выявлены очаги ПИН высокой степени с положительной экспрессией АМАСР с сохранением базальноклеточной экспрессии при использовании маркера НМWSC. Среди сопутствующей патологии практически в половине случаев (47%) были определены фокусы гиперплазированных желез, с выраженной базальноклеточной экспрессией НМСК и отсутствием реакции с АМАСР. При исследовании гистологических препаратов, окрашенных ГЭ, в 12 наблюдениях операционного и биопсийного материала помимо опухолевого узла аденокарциномы были выявлены фокусы атипической микроацинарной протиферации (АМАП). После проведенного иммуногистохимического исследования во всех случаях АМАП нами выявлена экспрессия АМАСР от умеренной до выраженной степени. Базальноклеточную экспрессию при применении антител к НМWSC выявили в 4 (33%) случаях, что исключило диагноз ацинарной аденокарциномы и процесс был отнесен к ПИН высокой степени. В оставшихся 8 (66,7%) наблюдениях отсутствовала базальноклеточная реакция с НМWSC, а комплексы АМАП отнесли к ацинарной аденокарциноме (Рисунок 7). Таким образом, суммарно ПИН высокой степени выявлено в 26 случаях (34 %).



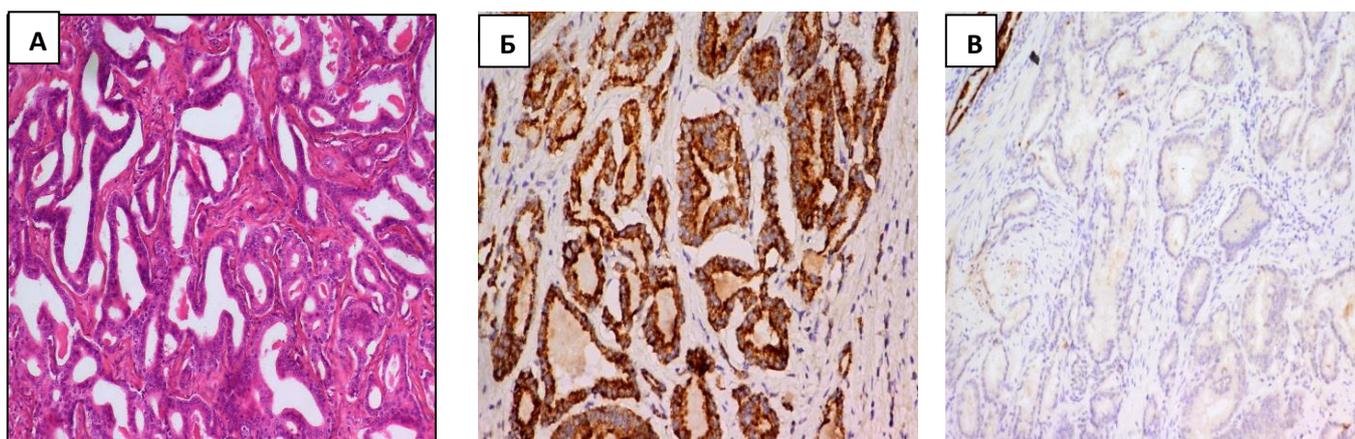
**Рисунок 4. Распределение образцов ацинарной аденокарциномы согласно шкале градации Глисона по прогностическим группам ISUP (2016). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х20.**



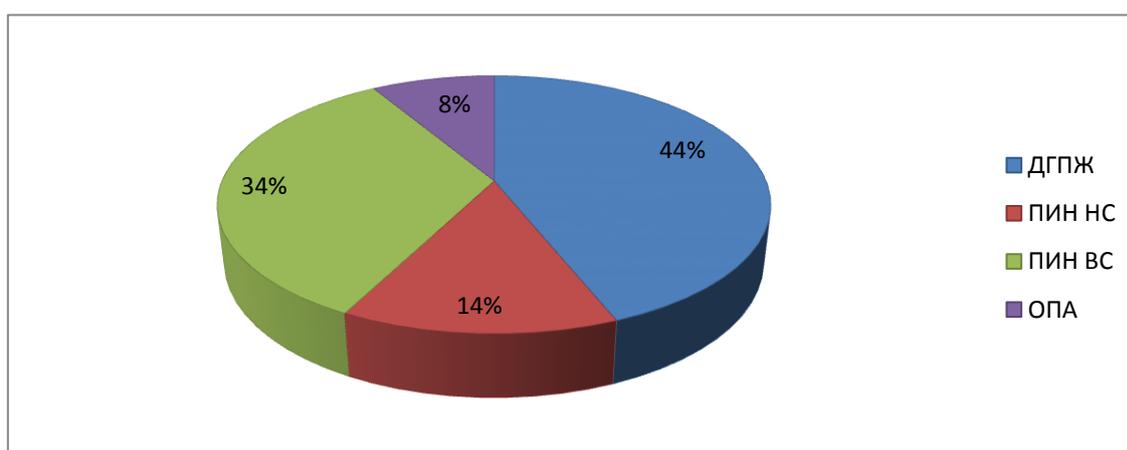
**Рисунок 5. Редкие варианты ацинарной аденокарциномы. А. Псевдогиперпластический вариант - железы с папиллярными складками, внутрипросветными выступами и разветвлениями, а также кистозным расширением желез. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х20.. Б. Пенистоклеточный вариант с наличием внутрицитоплазматических везикул. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х20. В. Атрофический вариант. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х20.**



**Рисунок 6. Ацинарная аденокарцинома, 8(4+4) по Глисон. Окраска гематоксилином и эозином. А. Б. Слившиеся мелкоацинарные железы. Нечетко отграниченные железы с плохо сформированным просветом. Ув.х20. В. Периневральная инвазия. Ув.х40.**



**Рисунок 7. Образец ацинарной аденокарциномы, 7 баллов по Глиссону (4+3). А. Вариабельность форм и размеров желез. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х20. Б. Выраженная реакция ИГХ окрашивания опухолевых клеток к АМАСР. Ув.х20. В. Отрицательная реакция опухолевых клеток к НМWСК. Ув.х10.**

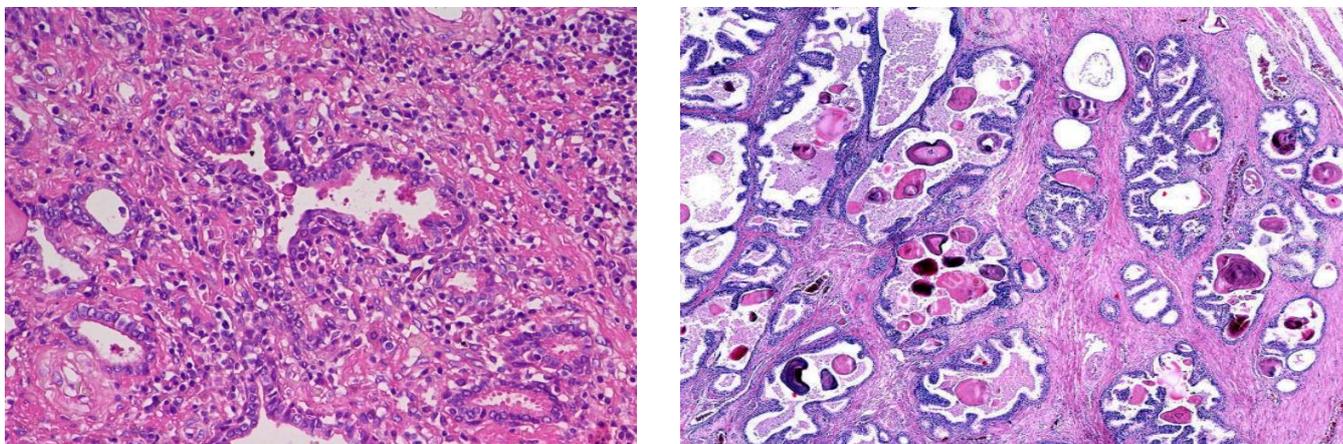


**Рисунок 1. Структура сочетанной патологии в операционном и биопсийном материале образцов с РПЖ.**

**ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия предстательной железы; ПИН НС – простатическая интраэпителиальная неоплазия низкой степени; ПИН ВС – простатическая интраэпителиальная неоплазия высокой степени; ОПА – очаговая простатическая атрофия**

В непосредственной близости к опухолевому узлу в 29,3% случаев выявили очаги хронического воспаления, представленного полиморфноклеточной инфильтрацией стромы и вовлечением ацинарных структур, вариабельной

степенью фиброза. Железы компактно расположены, некоторые с кистознорасширенными просветами, содержащие амилоидные тельца разного размера (Рисунок 8).



**Рисунок 8. Перитуморозная зона. А. Диффузный лимфоплазмочитарный инфильтрат в строме. Окр. ГиЭ. x20. Б. Атрофичные кистознорасширенные железы, разделенные полями грубоволокнистой соединительной ткани. Окр. ГиЭ. x10.**

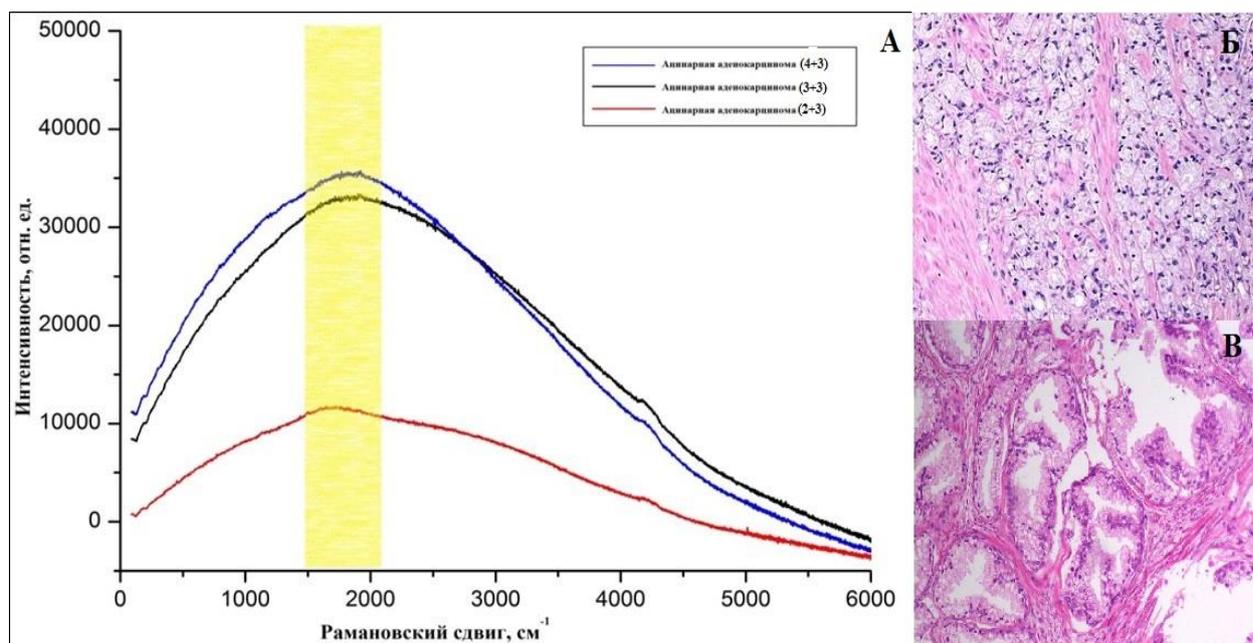
### **3.2. Результаты спектроскопического исследования образцов рака предстательной железы**

#### ***Спектроскопическое исследование образцов ацинарной аденокарциномы с помощью лазерной установки длинной волны 532 нм.***

При анализе спектральных характеристик образцов опухолевой ткани, полученных при использовании данной установки, здесь и далее нами были учтены следующие параметры: внешний вид и конфигурация спектра, значения интенсивности локальных максимумов, инициальной и остаточной флуоресценции (люминесценции), выражающиеся в относительных единицах на оси ординат, а также значения специфического «рамановского» сдвига, регистрируемого на оси абсцисс в относительных сантиметрах.

Раман-люминесцентные спектры образцов ацинарной аденокарциномы разных градаций Глисона, зарегистрированные с помощью спектрометра длиной

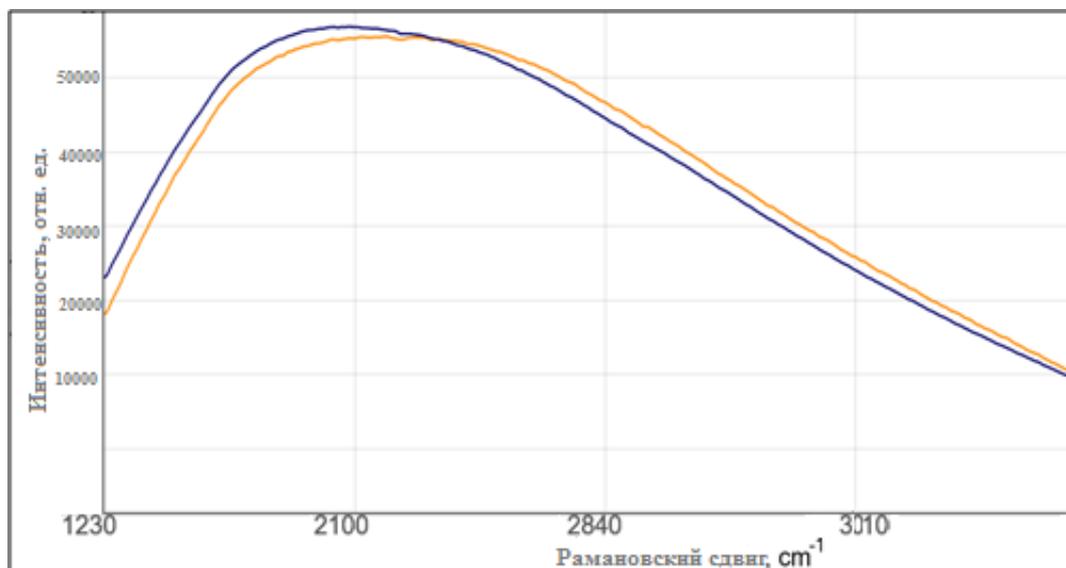
волны 532 нм в 96,7% имели одинаковую конфигурацию в виде параболы, значительно растянутой по оси абсцисс. При этом в подавляющем большинстве наблюдений Рамановские пики отсутствовали. Вместе с тем, набор остальных параметров во всех случаях был достаточен для отнесения исследуемого образца к той или иной градации Глисона. Так, несмотря на то, что значения интенсивности начальной (инициальной) люминесценции варьировали в диапазоне от 1 до 12 тыс. отн. ед., удалось выявить определенную закономерность: образцам с высокой степенью дифференцировки соответствовали умеренные показатели люминесценции, как правило, не превышающие  $1000 \pm 100$  относительных единиц и, наоборот, для образцов опухолей с низкой степенью дифференцировки были характерны показатели значительно большей интенсивности – 9000-12000 относительных единиц. Хотя локальный максимум люминесценции для образцов всех градаций Глисона был зарегистрирован на одной и той же частоте Рамановского сдвига соответствующей  $2000 \pm 47 \text{ см}^{-1}$  и был обусловлен люминесценцией эндогенных порфиринов, значения максимальной его интенсивности зависели от степени атипии опухолевого узла. В частности, для высокодифференцированной ацинарной аденокарциномы (<5 баллов по Глисону) были характерны умеренные значения интенсивности люминесценции локального максимума (<12 тыс. отн.ед.) в отличие от менее дифференцированных образцов, которым соответствовали вдвое-втрое большие значения интенсивности (>30 тыс. отн.ед.) (Рисунок 9).



**Рисунок 9. Корреляция интенсивности Рамановского рассеяния в зависимости от дифференцировки ацинарной аденокарциномы согласно шкале Глисона. Область локального максимума выделена желтым. А. Раман-люминесцентные спектры образцов ацинарной аденокарциномы различных грейдов. Б. Образец ацинарной аденокарциномы (4+3), соответствующий зарегистрированному спектру. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х10. В. Образец ацинарной аденокарциномы (3+3), соответствующий зарегистрированному спектру. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х20.**

Спектры образцов РПЖ, полученные в ходе операции радикальной простатэктомии, ни визуально, ни статистически не имели различий со спектрами образцов РПЖ, как удаленных при помощи лапароскопических технологий, так и полученных с помощью пункционной биопсии с целью уточнения существа заболевания или патологического состояния, развившегося в предстательной железе. Также было установлено, что предварительная фиксация препаратов в 10% растворе формалина не влияет ни на основные, ни на косвенные параметры регистрируемых спектров, которые строго коррелируют основным значениям спектров, полученным с нативных образцов (Рисунок 10). Это обстоятельство

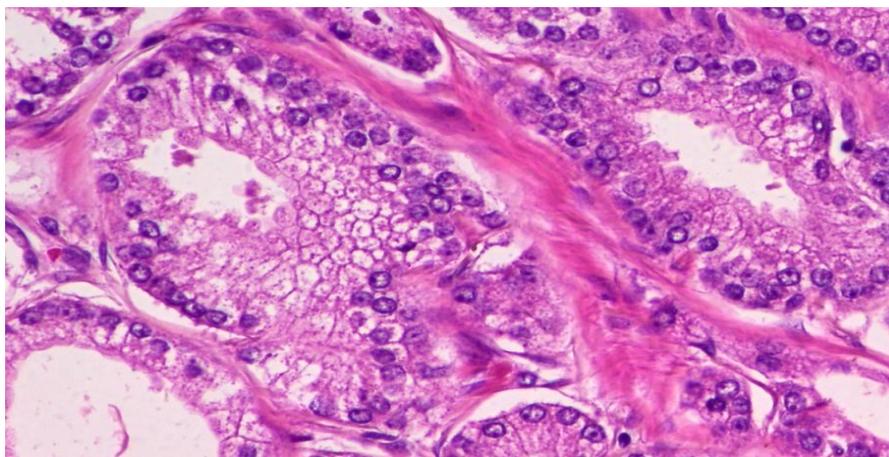
значительно расширяет возможности использования данной технологии в интраоперационных условиях в режиме реального времени.



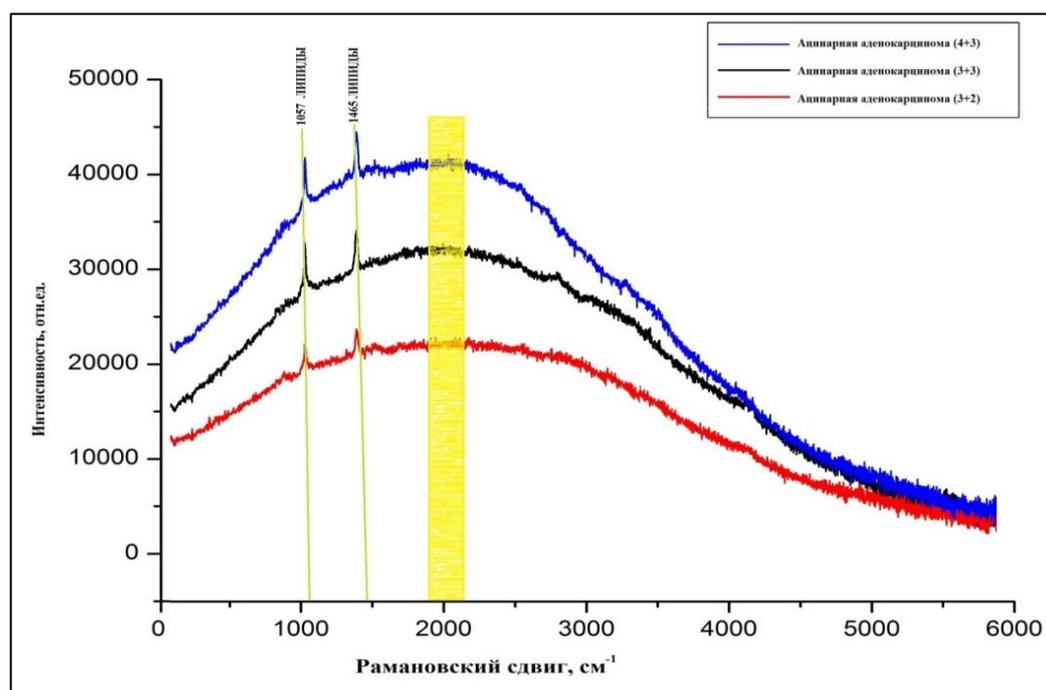
**Рисунок 10. Оценка влияния формалина на спектральные характеристики образцов с аденокарциномой. Совпадение регистрируемых сигналов спектров образца ацинарной аденокарциномы без фиксации формалина (оранжевый спектр) и с фиксацией формалином (синий спектр).**

Образцы ацинарной аденокарциномы, образованной светлыми тубулярными структурами (Рисунок 11) (в 3,7% наблюдений), при исследовании спектроскопически также характеризуются параболической куполообразной формой и основными закономерностями, касающимися колебаний параметров инициальной и остаточной флуоресценций, выявленных при изучении образцов типичной хрестоматийной ацинарной аденокарциномы, и относительной константой значения локального максимума интенсивности люминесценции в точке  $1950 \pm 34 \text{ см}^{-1}$  рамановского сдвига. Особенностью пенистоклеточного варианта аденокарциномы являются отчетливо выраженные единичные Рамановские пики в точках  $1057 \text{ см}^{-1}$  и  $1465 \text{ см}^{-1}$  оси абсцисс, соответствующие молекулярным вибрациям липидов (Рисунок 12). Между степенью атипичности и значениями интенсивности люминесценции в исследуемых образцах

светлоклеточных форм была также отмечена четкая коррелятивная связь характерная для типичных формах аденокарциномы.

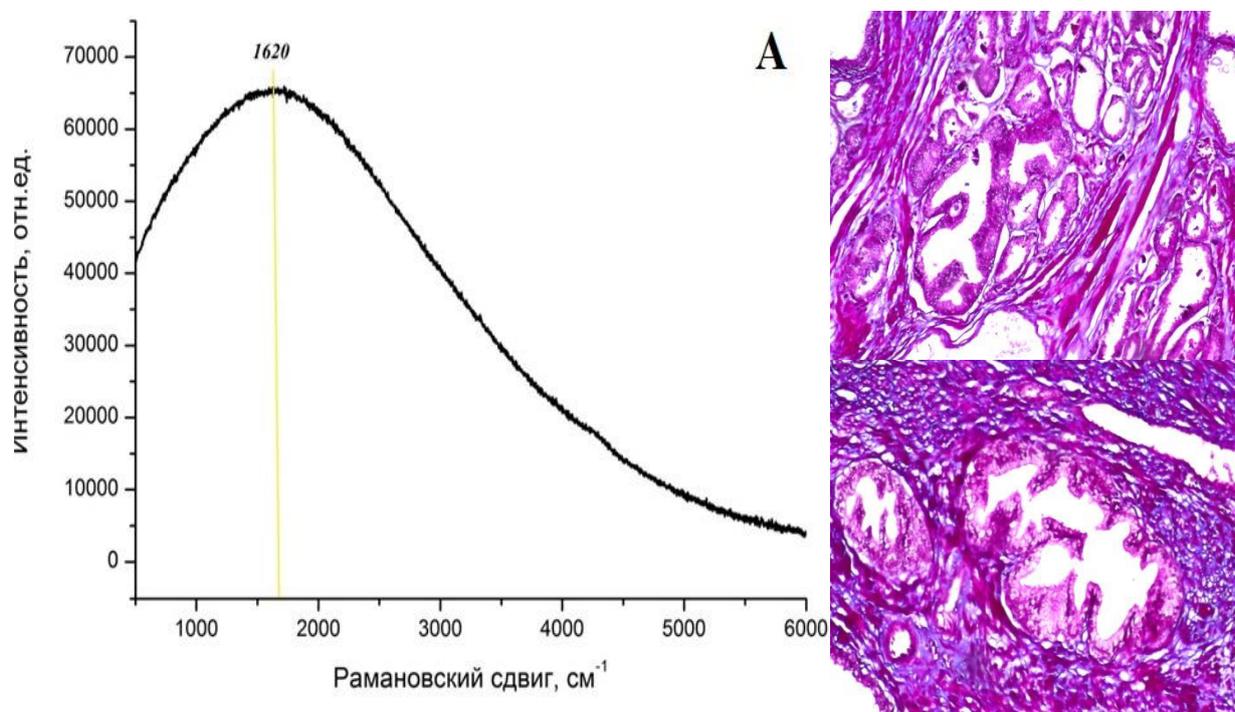


**Рисунок 11. Образец пенистоклеточного варианта ацинарной аденокарциномы. Наличие везикулярных включений в цитоплазме опухолевых клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х40.**



**Рисунок 12. Раман-люминесцентные спектры образцов ацинарной аденокарциномы со светлой цитоплазмой различных степеней дифференцировки. Область локального максимума выделена желтым. Рамановские пики обозначены числовыми значениями, соответствующие рассеянию молекул липидов.**

Было также установлено, что спектроскопические характеристики паренхиматозной и стромальной опухолевой составляющих могут подчас существенно отличаться. Так, например, при попадании лазерного луча на участок стромы, спектр ткани может также иметь сходный параболический куполообразный одногорбый вид, но остальным характеристикам будут свойственны отличные от паренхимы, как правило, увеличенные значения. Это касается и локального максимума, соответствующего  $1620\text{ см}^{-1}$  и обусловленного суммарной люминесценцией липопигментов и флавинов, и высокой пиковой интенсивности, способной достигать весьма значительных показателей в диапазоне 60-70 тыс. отн.ед. (Рисунок 13).



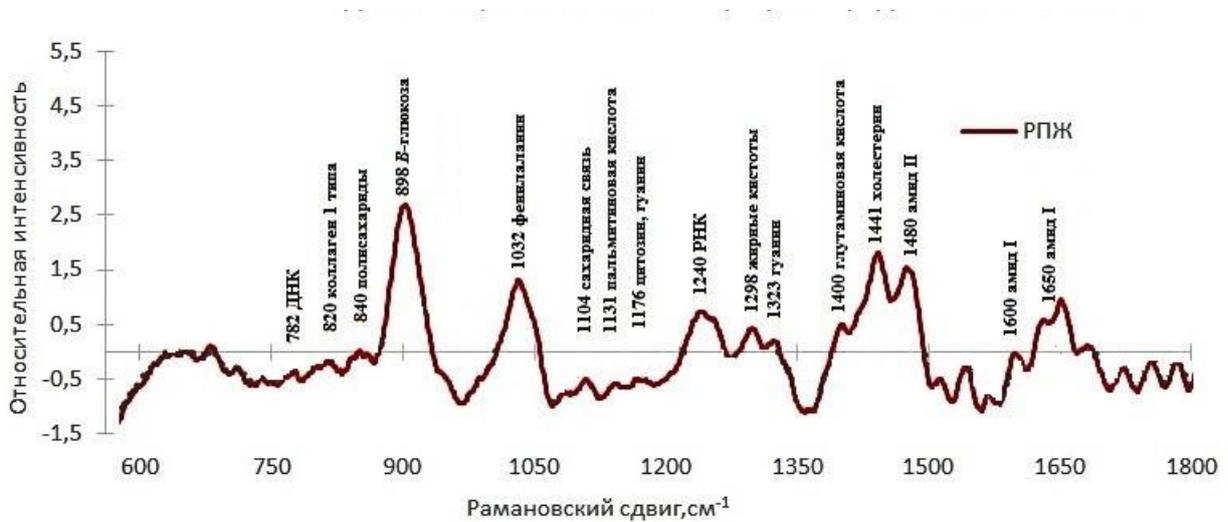
**Рисунок 13. А. Раман-люминесцентный спектр стромального компонента ацинарной аденокарциномы 6 (3+3) баллов по Глисон. Локальный максимум выделен желтой линией. Б. Тяжи фиброзно-мышечной стромы, окружающие атипичные железы (коллагеновые волокна – темно-синие; эластические волокна – розовые). Окр. трихром по Массону. Ув. x40. В. Другое поле зрения. X20.**

***Спектроскопическое исследование образцов ацинарной аденокарциномы с помощью лазерной установки длиной волны 785 нм.***

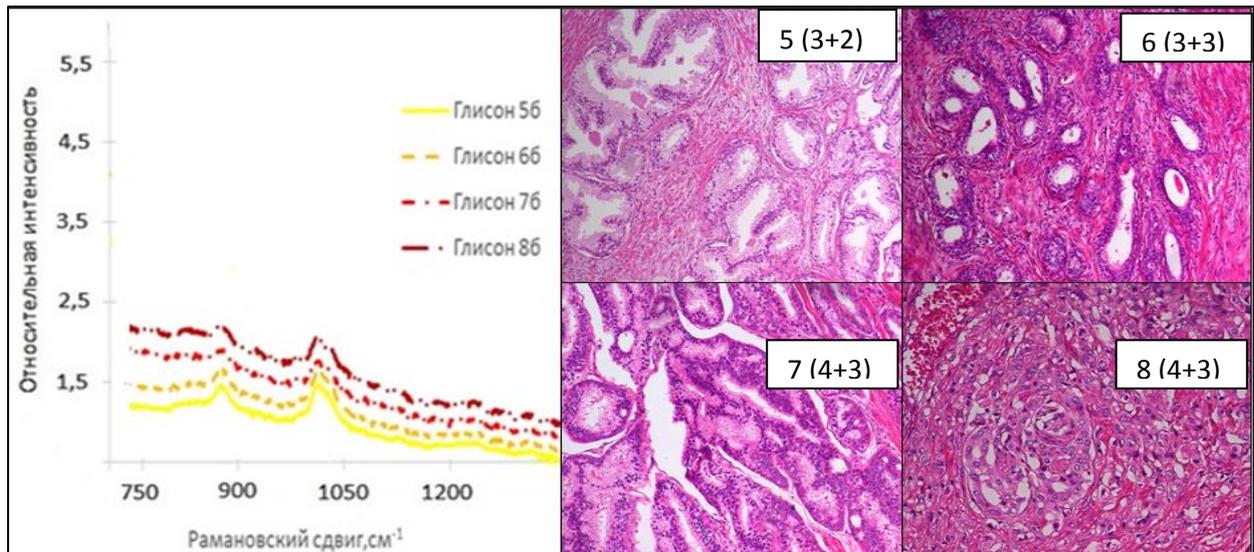
Использование Раман-спектрографа с длиной волны 785 нм позволило более детально распознать молекулярный состав опухолевых клеток ацинарной аденокарциномы в виду практически полного устранения явления люминесценции и, напротив, усиление конфокального (Рамановского) рассеяния. Таким образом, Рамановские спектры паренхиматозной составляющей ацинарной аденокарциномы, представленной преимущественно атипичными железистыми структурами, характеризуются бесчисленным количеством пиков в диапазоне 300-1900  $\text{см}^{-1}$ : 762  $\text{см}^{-1}$  (ДНК), 820  $\text{см}^{-1}$  (коллаген 1 типа), 840  $\text{см}^{-1}$  (полисахариды), 989  $\text{см}^{-1}$  ( $\beta$ -глюкоза), 1032  $\text{см}^{-1}$  (фенилаланин), 1104  $\text{см}^{-1}$  (сахаридная связь), 1131  $\text{см}^{-1}$  (пальмитиновая кислота), 1176  $\text{см}^{-1}$  (гуанин, цитозин), 1240  $\text{см}^{-1}$  (РНК), 1298  $\text{см}^{-1}$  (жирные кислоты), 1323  $\text{см}^{-1}$  (гуанин), 1400  $\text{см}^{-1}$  (глутаминовая кислота), 1441  $\text{см}^{-1}$  (холестерин и его эфиры), 1482  $\text{см}^{-1}$  (амид II), 1546  $\text{см}^{-1}$  (свободный и связанный НАДН), 1480, 1600, 1629, 1650  $\text{см}^{-1}$  (амид I) (Рисунок 14). Кроме того, отмеченная ранее зависимость между степенью атипичности опухоли и интенсивностью рассеяния в спектрах, зарегистрированных с помощью лазерной установки с длиной волны 532 нм, прослеживалась и при фиксации спектров, лазерной установки длиной волны 785 нм. Так, наибольшая интенсивность пиков Рамановского рассеяния отмечалась в низкодифференцированных образцах, что согласно шкале градации Глисона соответствовала показателям 8 и 9 баллам, соответственно случаи с высоко и умереннодифференцированными ( $\leq 7$  баллов), напротив, на спектре имели более низкие показатели интенсивности пиков ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 15).

Рамановский спектр стромального компонента опухоли отличался от паренхиматозного, прежде всего, преобладанием пиков рамановского рассеяния молекул коллагена (933  $\text{см}^{-1}$ , 1035  $\text{см}^{-1}$ , 1401  $\text{см}^{-1}$ , 1488  $\text{см}^{-1}$ ), гликогена (484-490  $\text{см}^{-1}$ ),  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ -связи молекул коллагена, эластина и фосфолипидов, по-

видимому, входящих в состав гладкомышечных и эластических волокон (Рисунок 16).



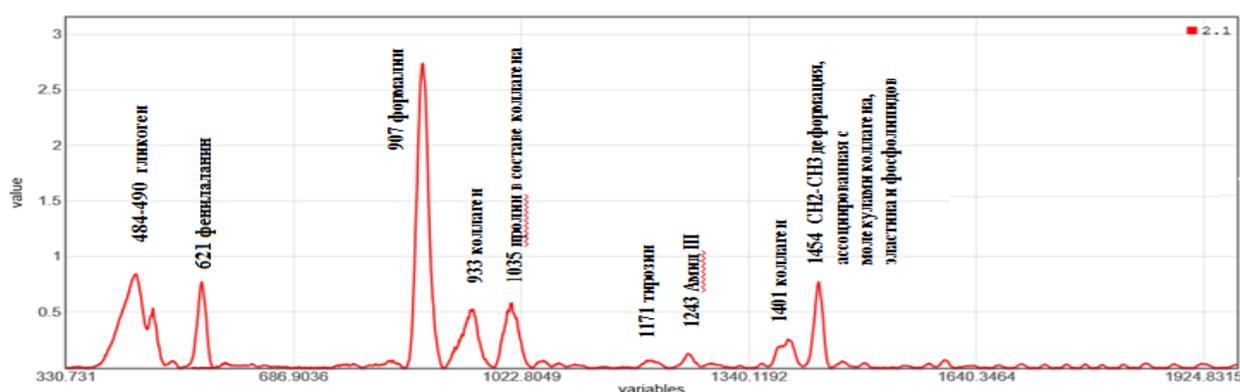
**Рисунок 14. А. Рамановский спектр паренхиматозного компонента ацинарной аденокарциномы 7 (4+3) баллов по Глисону в диапазоне 330-1950 см<sup>-1</sup>. Б. Рамановский спектр паренхиматозного компонента ацинарной аденокарциномы 7 (4+3) баллов по Глисону в диапазоне 600-1800 см<sup>-1</sup>. Рамановские пики обозначены числовыми значениями.**



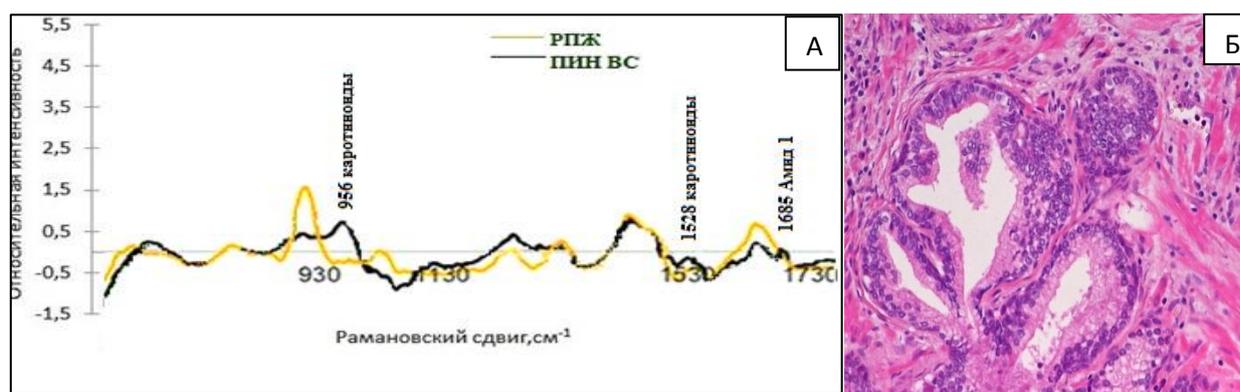
**Рисунок 15. Зависимость интенсивности Рамановских пиков β-глюкозы и фенилаланина от степени дифференцировки ацинарной аденокарциномы простаты согласно шкале Глисона. Окраска гематоксилином и эозином.**

Ув.х10.

В 12 случаях (16%) помимо «типичных» спектров аденокарциномы также удалось зарегистрировать спектры очагов простатической интроэпителиальной неоплазии высокой степени, которые визуально практически полностью повторяли конфигурацию опухолевых спектров как по частоте рамановского сдвига, так и по их интенсивности рассеяния. Исключение составили 3 области Рамановского сдвига –  $956\text{ см}^{-1}$ ,  $1528\text{ см}^{-1}$  (отражающие вибрации молекул каротиноидов), и  $1685$  (Амид I), характерные для всех исследуемых случаев с ПИН ВС, и отсутствующие в случаях с аденокарциномой ( $p>0,05$ ) (Рисунок 17).

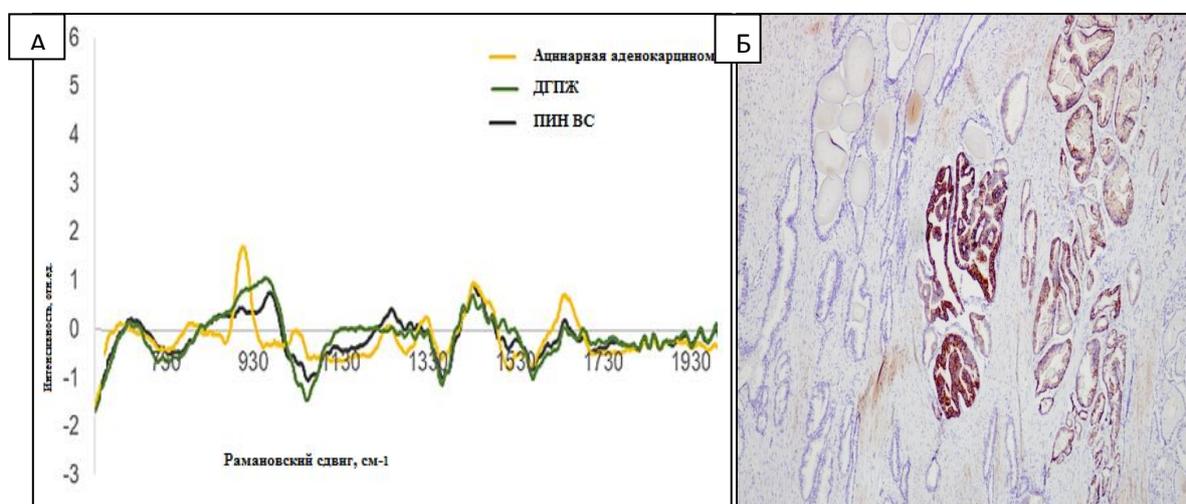


**Рисунок 16. Рамановский спектр стромального компонента ацинарной аденокарциномы 7 (4+3) баллов по Глисону. Рамановские пики обозначены числовыми значениями.**



**Рисунок 17. Результаты морфологического и спектроскопического исследования участка ПИН ВС в образце ацинарной карциномы 6 баллов по Глисону. А. Сопоставление спектров аденокарциномы и ПИН ВС. «Специфические» для ПИН ВС Рамановские пики обозначены числовыми значениями. Б. Область регистрации спектра – участок ПИН ВС. Окр. ГиЭ. ув.40.**

Среди изученных образцов предстательных желез, содержащих очаги ацинарной аденокарциномы, в 81 гистологическом наблюдении было отмечено сочетание очагов с нодозной гиперплазией (Рисунок 18Б.). Опухолевые структуры не были топографически связаны с узлами гиперплазии, однако последние вносили вклад в спектральную картину и отображались хоть и схожей, но не одинаковой конфигурацией. При сопоставлении Рамановских спектров из участков аденокарциномы, ПИН высокой степени и узлов гиперплазии максимальные отличия были выявлены в  $898\text{ см}^{-1}$  (в-глюкоза),  $1032\text{ см}^{-1}$  (фенилаланин),  $1131\text{ см}^{-1}$  (пальмитиновая кислота),  $1400\text{ см}^{-1}$  (глутаминовая кислота),  $1441\text{ см}^{-1}$  (холестерин) (Рисунок 18А).



**Рисунок 18. А. Варианты спектров, зарегистрированные с различных участков образца с РПЖ. Б. Сочетание очагов ацинарной аденокарциномы (ИГХ-положительное окрашивание с использованием антител к АМАСR) с узловой гиперплазией. ИГХ. x10.**

### **3.3. Результаты морфологического исследования образцов группы сравнения**

Результаты анализа клинических и лабораторных характеристик 50 пациентов группы сравнения представлены в таблице 4. Группу сравнения составили образцы предстательных желез с доброкачественной гиперплазией. Оценить полноценные размеры и локализацию узлов гиперплазии при макроскопическом

исследовании было возможно лишь на предстательных железах, удаленных в ходе радикальной простатэктомии (n=20). При проведении ступенчатых срезов предстательных желез, узлы гиперплазии выступали над поверхностью разреза в виде округлых образований бело-серого цвета и в 90% наблюдений были выявлены в периуретральной зоне, в 10% - узлы локализовались и в периуретральной, и в периферической зонах. Диаметр узлов, как правило, не превышал значения 1,5 см, средний размер при этом составил –  $0,8 \pm 0,1$  см. При гистологическом исследовании были выявлены типичные узловатые образования из хаотично расположенных желез с выраженным стромальным компонентом. Ацинусы неравномерно увеличены во всех направлениях, вариабельны по форме и размерам, характеризуются внутриацинарной пролиферацией эпителия в виде сосочков или криброзных структур. Базальная мембрана сохранена. Сосочки, характерные для железистой гиперплазии, имели нежную соединительнотканную основу. Эпителий желез был представлен секреторными и базальными клетками. Практически в каждом наблюдении в строме обнаруживались множественные инфильтраты, состоящие преимущественно из лимфоидных клеток, изредка с небольшим количеством плазматических клеток и занимавшие и сравнительно небольшие участки стромы. Наряду с этим, в 72% случаев, обнаруживали скопления клеток состоящие, главным образом, из нейтрофильных лейкоцитов и расположенные вокруг ацинусов и протоков с некротическими изменениями эпителия, характерные для хронического простатита.

Образцы ДГПЖ, полученные в ходе проведения операции трансуретральной резекции ПЖ (n=20), при макроскопическом исследовании были представлены в виде множественных фрагментов белесоватого вида, размерами каждый 1,0x0,5x0,5 см, неоднородного строения. При гистологическом исследовании с применением стандартного окрашивания гематоксилином 82% наблюдений соответствовали фиброаденоматозной форме гиперплазии, при которой железистая ткань, представленная ацинарными структурами, окружена фиброваскулярной стромой с примесью гладкомышечных клеток. 15% случаев

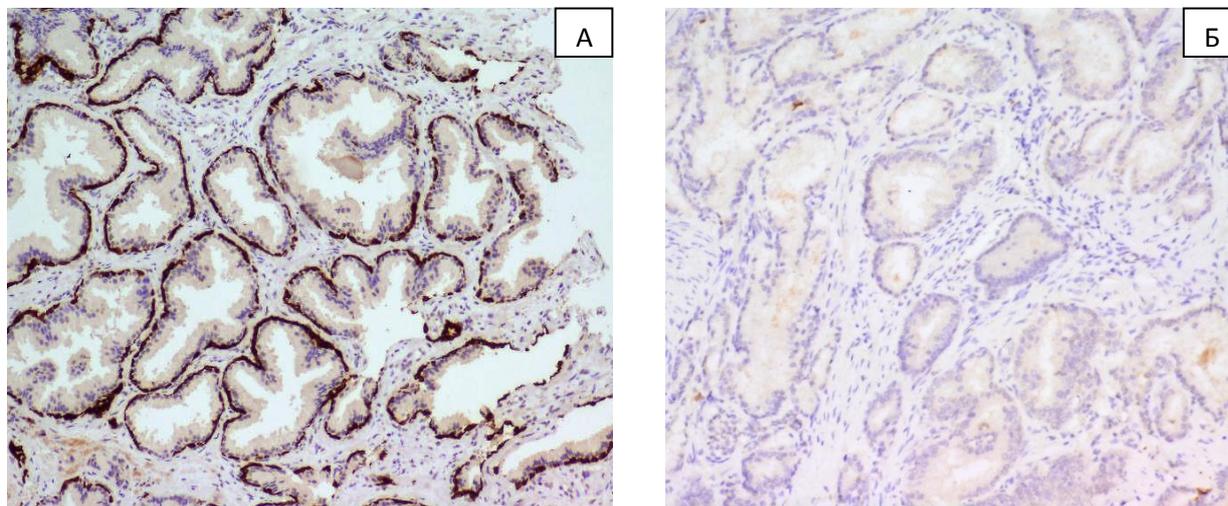
характеризовались аденоматозной форме с наличием большого числа желез округлой или неправильной формы, тесно прилежащих друг к другу, и 2% наблюдений приходились на папиллярный вариант гиперплазии.

Материал, полученный от 10 больных с подозрением на ДГПЖ, с помощью трансректальной пункционной биопсии из 12 точек, в 70% соответствовал фиброаденоматозной форме, и в 30% аденоматозной.

**Таблица 4. Клинико-лабораторные показатели пациентов с ДГПЖ.**

Показатель	ДГПЖ n, (%)
<b>Возраст</b>	
< 50 лет	3 (6)
51-55 лет	22 (44)
56-60 лет	17 (34)
61-65 лет	5 (10)
66-71 лет	1 (2)
>71 лет	2 (4)
<b>Жалобы</b>	
Странгурия	50 (100)
Гематурия	27 (54)
Поллакиурия	48 (96)
Боли в костях	1 (2)
<b>Уровень ПСА общ, нг/мл</b>	
≤2,5	8 (16)
2,5 – 4,0	13 (26)
4,1 – 10,0	25 (50)
10,1 – 20,0	4 (8)
20,1 – 30,0	0
>30,1	0
<b>Объем ПЖ по данным ТРУЗИ</b>	
≤ 30 см <sup>3</sup>	28 (56)
> 30 см <sup>3</sup>	22 (44)

При иммуногистохимическом исследовании преобладала высокая (92%) и умеренная (8%) интенсивность окрашивания для НМWСК в участках гиперплазированной ткани. В 99,2% наблюдений при использовании антител к АМАСR участки гиперплазии не меняли окраску (Рисунок 19).



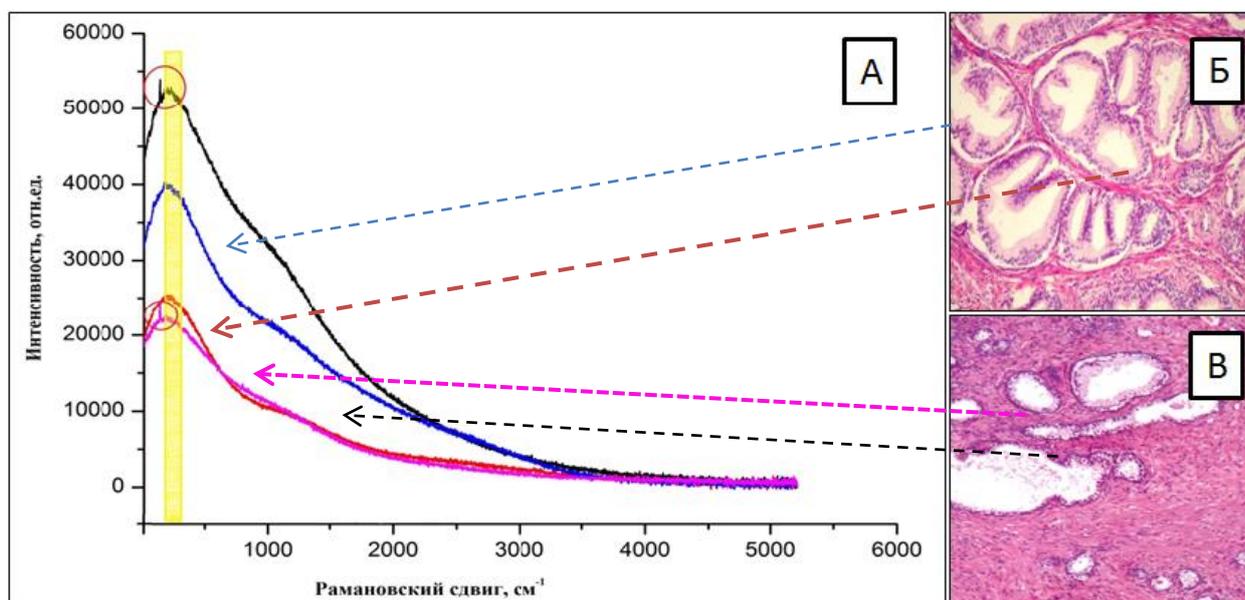
**Рисунок 19. Результаты иммуногистохимического исследования ДГПЖ.**  
**А. Высокий уровень экспрессии (+++) НМWСК базальными клетками.**  
**х20. Б. Отсутствие маркера АМАСR. х20.**

#### **3.4. Результаты спектроскопического исследования образцов группы сравнения**

##### ***Спектроскопическое исследование образцов ДГПЖ с помощью лазерной установки длиной волны 532 нм.***

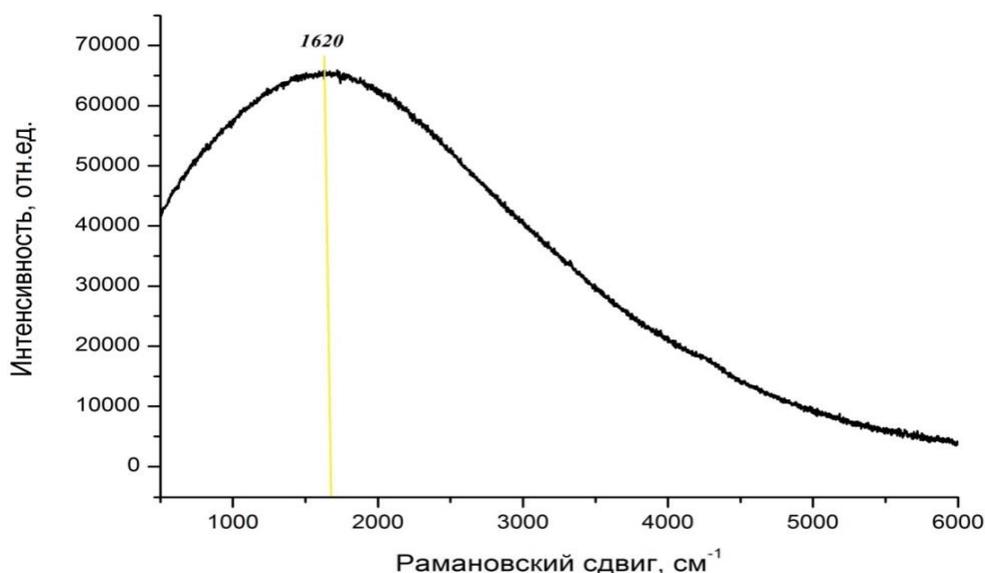
Раман-люминесцентные спектры образцов узловой гиперплазии аденоматозной формы, зарегистрированные с помощью спектрометра длиной волны 532 нм, характеризовались «подавлением» люминесценцией пиков рамановского рассеяния. При этом спектры имели вид одnogорбого спектра с максимальным пиком в области  $300 \pm 27 \text{ см}^{-1}$ , образованным люминесценцией ароматической аминокислотой триптофаном. Спектры фиброаденоматозной формы узловой гиперплазии с выраженным фиброзно-мышечным компонентом по своей конфигурации были идентичны спектрам железистой формы, однако в

21,33% случаях железистого варианта регистрировался пик рамановского рассеяния в точке  $299\text{ см}^{-1}$ , характеризующий вибрации молекулы коллагена (Рисунок 20).



**Рисунок 20. Результаты морфологического и спектроскопического исследований. А. Раман-люминесцентные спектры различных вариантов ДГПЖ. Б. Железистый вариант ДГПЖ. В. Фиброаденоматозная форма ДГПЖ. Стрелками определенных цветов обозначены области исследования и соответствующие им спектры.**

Спектры непосредственно стромального компонента образцов ДГПЖ совпадали по своим характеристикам с аналогичными спектрами образцов аденокарцином: локальный максимум соответствовал  $1620\text{ см}^{-1}$  и определялся суммарной люминесценции липопигментов и флавинов, максимальная интенсивность при этом достигала значений 60-70 тыс. отн.ед (Рисунок 21).

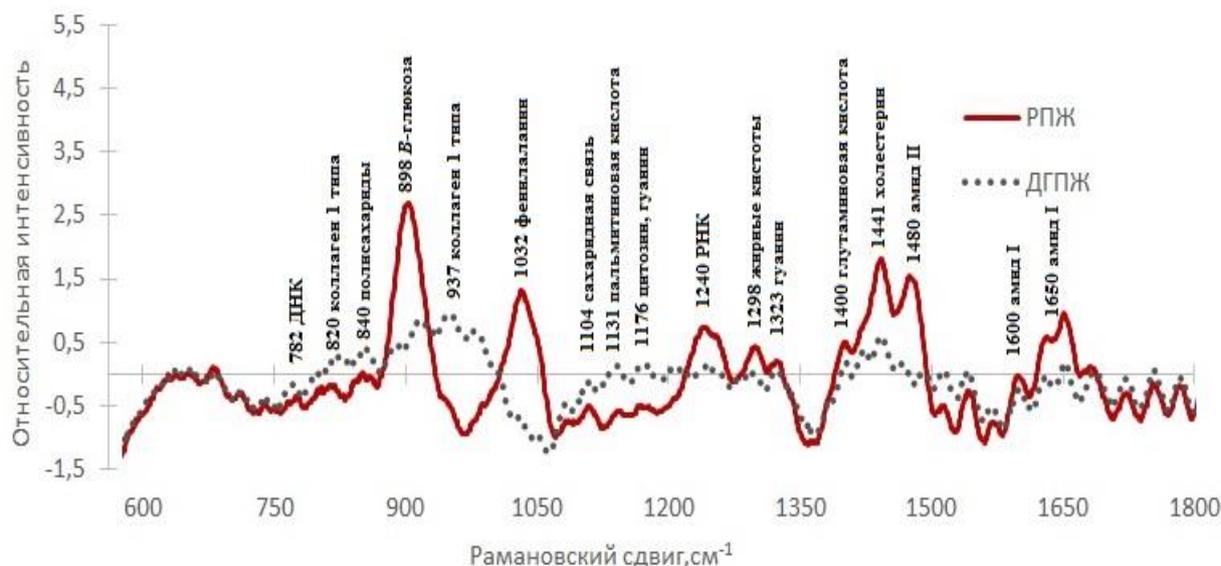


**Рисунок 21. Раман-Люминесцентный спектр стромального компонента образца ДГПЖ. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией.**

***Спектроскопическое исследование образцов ДГПЖ с помощью лазерной установки длиной волны 785 нм.***

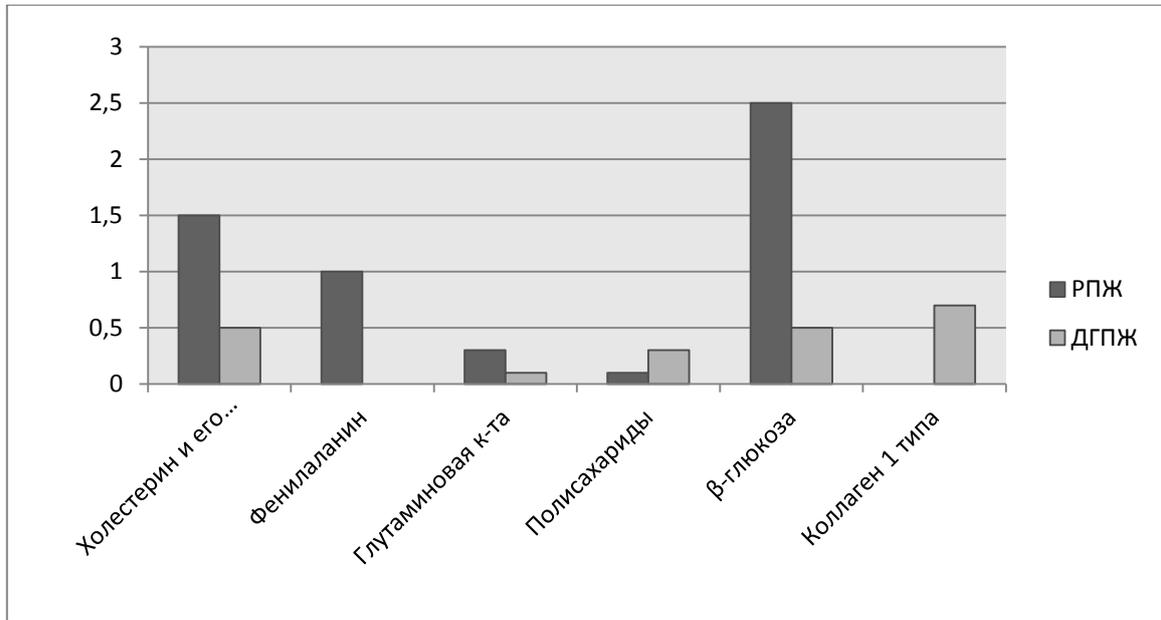
Спектры образцов ДГПЖ, зарегистрированные с помощью лазерной установки длиной волны 785, имели множество рамановских пиков, большее число которых совпадало с определяемыми рамановскими пиками образцов с аденокарциномой:  $762 \text{ см}^{-1}$  (ДНК),  $820, 937 \text{ см}^{-1}$  (коллаген 1 типа),  $840 \text{ см}^{-1}$  (полисахариды),  $989 \text{ см}^{-1}$  ( $\beta$ -глюкоза),  $1104 \text{ см}^{-1}$  (сахаридная связь),  $1131 \text{ см}^{-1}$  (пальмитиновая кислота),  $1176 \text{ см}^{-1}$  (гуанин, цитозин),  $1240 \text{ см}^{-1}$  (РНК),  $1298 \text{ см}^{-1}$  (жирные кислоты),  $1323 \text{ см}^{-1}$  (гуанин),  $1400 \text{ см}^{-1}$  (глутаминовая кислота),  $1441 \text{ см}^{-1}$  (холестерин и его эфиры),  $1482 \text{ см}^{-1}$  (амид II),  $1546 \text{ см}^{-1}$  (свободный и связанный НАДН),  $1480, 1600, 1629, 1650 \text{ см}^{-1}$  (амид I) (Рисунок 22). При этом значительная часть веществ отличалась по интенсивности рамановского сдвига, что характеризует различия их количественного состава в изучаемых группах (Диаграмма 2). К числу отличительных особенностей следует также отнести

обнаруживаемые на спектрах Рамановские пики аминокислот: пролина, входящего в состав коллагена 1 типа ( $937\text{ см}^{-1}$ ) и определяемого в группе с узловой гиперплазией, и фенилаланина ( $1031\text{ см}^{-1}$ ), напротив, идентифицируемого в образцах с аденокарциномой.

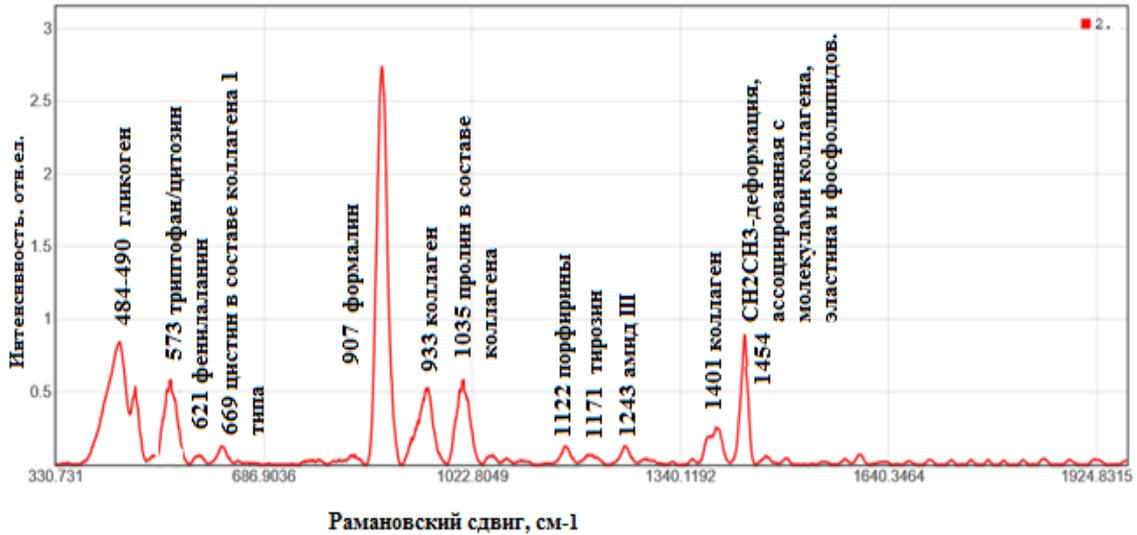


**Рисунок 22. Сопоставление спектров образцов аденокарциномы и ДГПЖ. Рамановские пики обозначены числовыми значениями.**

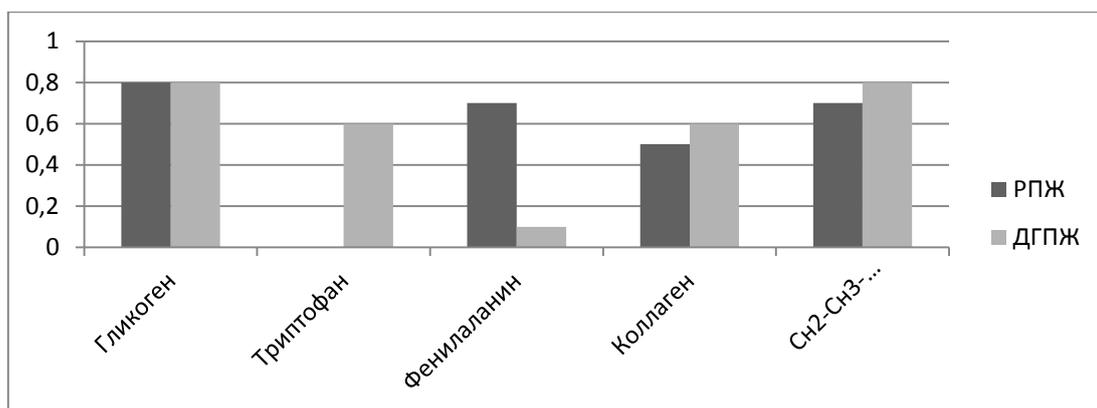
Рамановский спектр мезенхимальной составляющей узловой гиперплазии характеризовался набором специфических «пику» на 75% схожим по компонентному составу с аналогичным спектром аденокарциномы, исключение составили области рамановского сдвига -  $573\text{ см}^{-1}$  (триптофан/цитозин),  $669\text{ см}^{-1}$  (цистин, в составе коллагена 1 типа),  $1122\text{ см}^{-1}$  (порфирины) (Рисунок 23) (Диаграмма 3).



**Диаграмма 2. Сравнительные уровни интенсивности рамановских сдвигов выявленных веществ в образцах паренхиматозного компонента при РПЖ и ДГПЖ.**



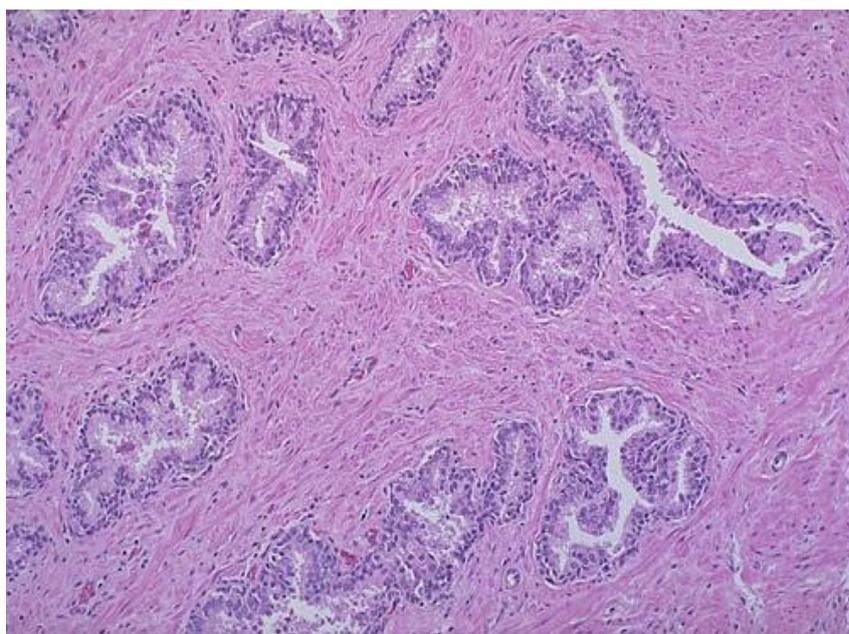
**Рисунок 23. Рамановский спектр стромального компонента образца ДГПЖ. Рамановские пики обозначены числовыми значениями.**



**Диаграмма 2. Сравнительные уровни интенсивности основных рамановских пиков выявленных веществ в образцах с стромального компонента РПЖ и ДГПЖ**

### **3.5. Результаты морфологического и спектроскопического исследований образцов группы контроля**

Как уже было отмечено в разделе, касающемся описания материала и методов исследования, образцы ткани предстательной железы были получены у лиц, причина смерти которых была не связана с её патологией. Отсутствие изменений было подтверждено при жизни как клиническими данными, так и лабораторными исследованиями, предусмотренными Стандартами обследования и лечения больных с той или иной патологией. При макроскопическом исследовании ПЖ соответствовали нормальным размерам (3,0x4,0x2,0 см) и характеризовались конусовидной формой. На разрезе ПЖ доли были симметричны, однородного вида, серовато-красного цвета. Гистологически во всех исследованных случаях признаки патологии на светооптическом уровне отмечены не были (Рисунок 24).



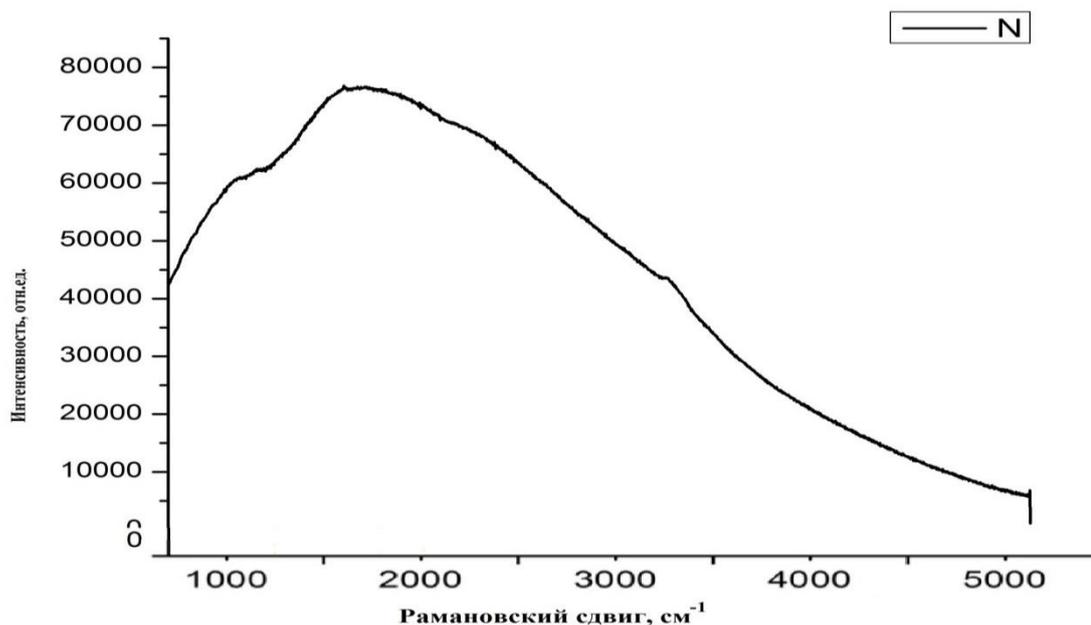
**Рисунок 24. Результат гистологического исследования образца ПЖ из группы контроля. Сохранные участки в пределах нормы. Окр. гем и эоз. x20.**

*Спектроскопическое исследование образцов группы контроля с помощью лазерной установки длиной волны 572 нм.*

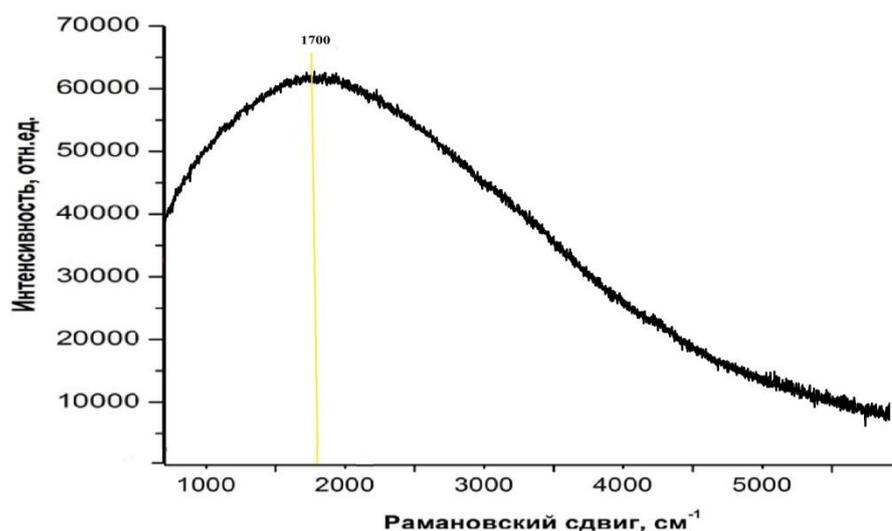
Спектроскопически образцы ПЖ контрольной группы характеризовались выраженной «двугорбой» формой спектра, свойственной нормальным неповрежденным тканям. Показатели начальной флуоресценции соответствовали высоким значениям интенсивности и располагались в области 45000 по оси относительных единиц. Локальные максимумы отмеченные в точке  $1030 \text{ см}^{-1}$  (обусловленный суммарной люминесценцией липопигментов и флавинов), и в точке  $2000 \text{ см}^{-1}$ , (обусловленный люминесценцией эндогенных порфиринов) характеризовались высокими значениями интенсивности превышающие 60 тыс. отн. ед. (Рисунок 25).

Спектры элементов стромы относительно сохранных предстательных желез при попадании лазерного пучка длиной волны 532 нм отличались куполообразной формой, высокими значениями интенсивности как начальной, так и пиковой люминесценции, максимум люминесценции соответствовал  $1700 \text{ см}^{-1}$  (эндогенные

порфирины) (Рисунок 26).



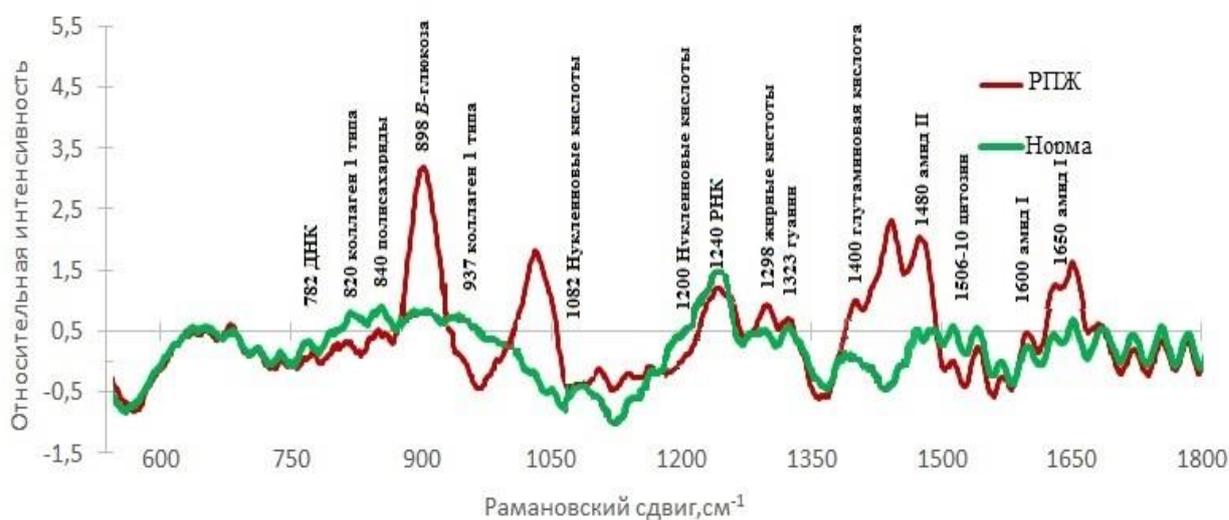
**Рисунок 25. Раман-люминесцентный спектр образца из группы контроля. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией.**



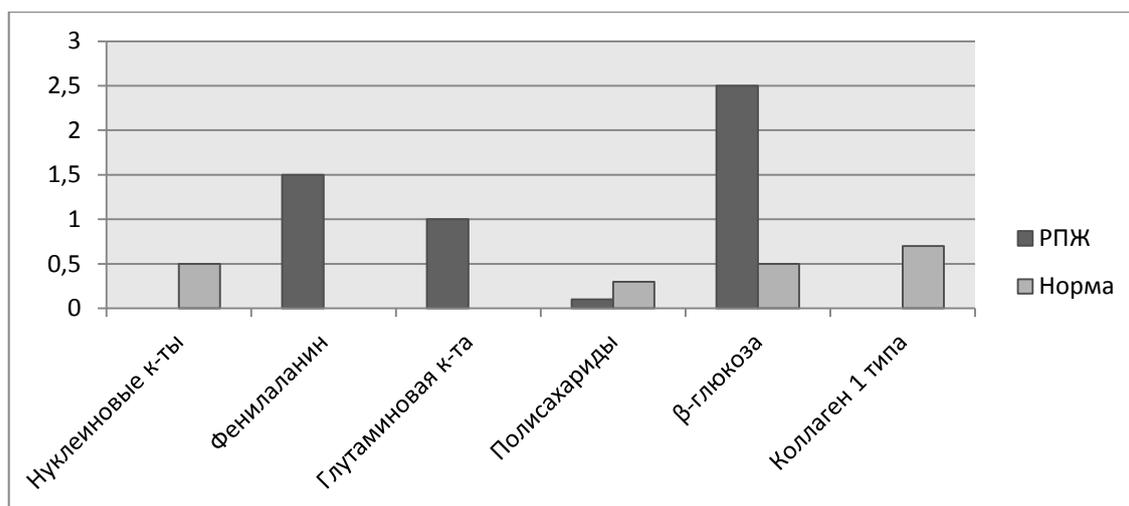
**Рисунок 26. Раман-люминесцентный спектр стромального компонента образца группы контроля. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией.**

**Спектроскопическое исследование образцов группы контроля с помощью лазерной установки длиной волны 785 нм.**

Спектры образцов группы контроля, зарегистрированные с помощью лазерной установки длиной волны 785, характеризовались набором Рамановских пиков, большее число которых совпадало с определяемыми Рамановскими пиками образцов с аденокарциномой: 762 см<sup>-1</sup> (ДНК), 820, 937 см<sup>-1</sup> (коллаген 1 типа), 840 см<sup>-1</sup> (полисахариды), 1240 см<sup>-1</sup> (РНК), 1298 см<sup>-1</sup> (жирные кислоты), 1323 см<sup>-1</sup> (гуанин), 1400 см<sup>-1</sup> (глутаминовая кислота), 1480 см<sup>-1</sup> (амид II), 1650 см<sup>-1</sup> (амид I) (Рисунок 27), однако значения интенсивности их рассеяния не совпадали (Диаграмма 4). Колебания молекул нуклеиновых кислот (1082 см<sup>-1</sup>, 1200 см<sup>-1</sup>), и коллагена 1 типа (937 см<sup>-1</sup>) были отнесены к числу «диагностических» для образцов группы контроля в виду их полного отсутствия в спектрах образцов с РПЖ и ДГПЖ.



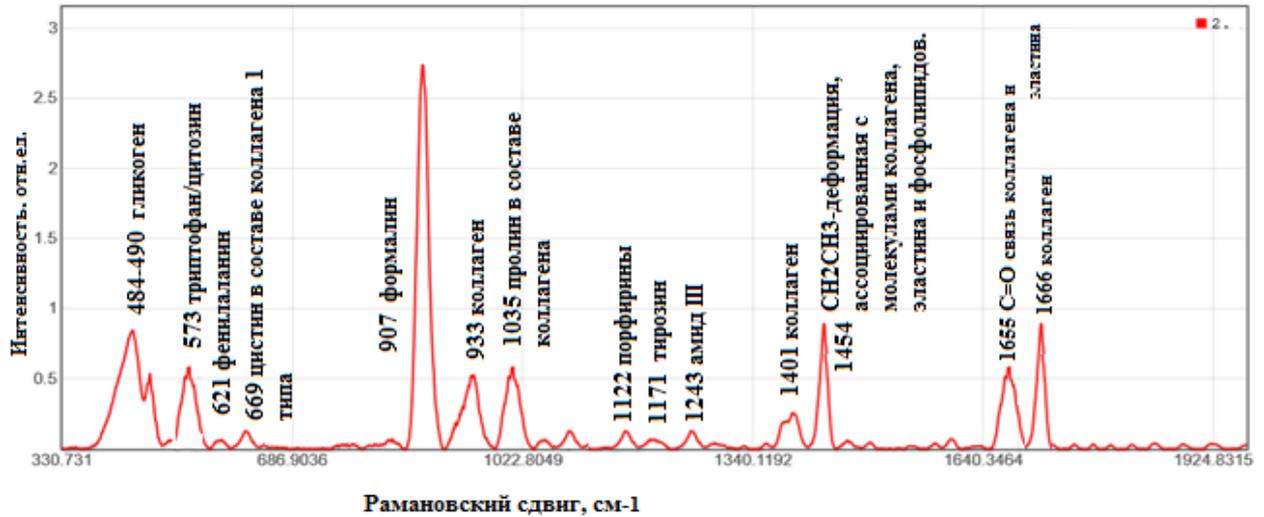
**Рисунок 27. Сопоставление спектров образцов группы контроля и адинарной аденокарциномы. Рамановские пики обозначены числовыми значениями.**



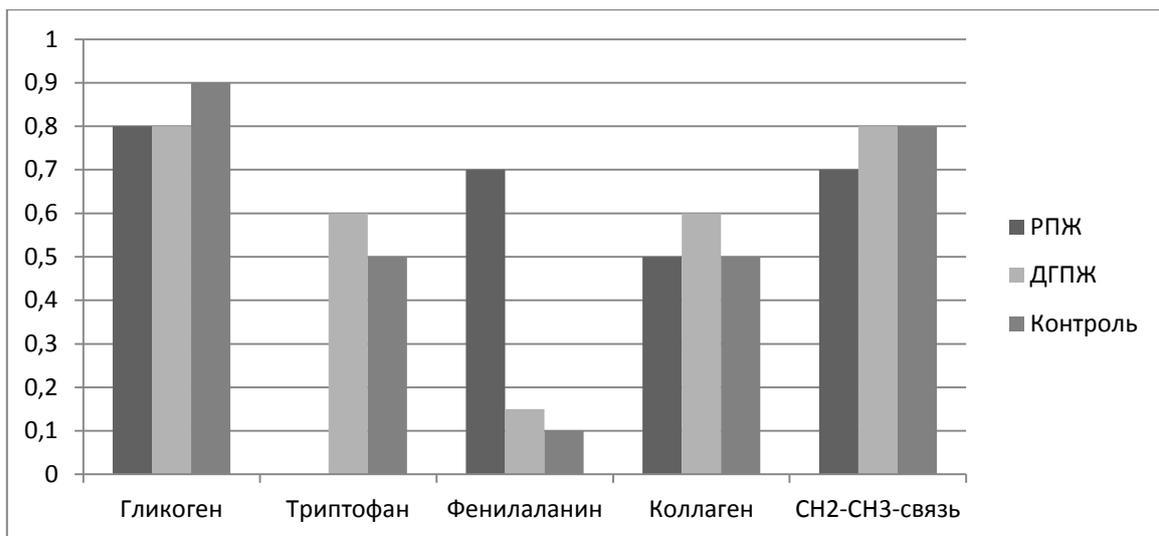
**Диаграмма 4. Сравнительные уровни интенсивности рамановских сдвигов выявленных веществ паренхиматозного компонента образцов группы контроля и РПЖ.**

При спектроскопическом анализе стромального компонента образцов из группы контроля, отмечено, что преобладающим компонентом изученных тканей является коллаген, вибрации молекул которого соответствовали значениям  $669\text{ см}^{-1}$ ,  $933\text{ см}^{-1}$ ,  $1035\text{ см}^{-1}$ ,  $1401\text{ см}^{-1}$ ,  $1454\text{ см}^{-1}$ ,  $1655\text{ см}^{-1}$  и  $1666\text{ см}^{-1}$  рамановского сдвига (Рисунок 28). Кроме того, в 3 образцах, полученных от самых старших в этой группе мужчин (39 и 40 лет), было отмечено появление рамановского пика фенилаланина ( $621\text{ см}^{-1}$ ) с значением интенсивности не превышающем 0,1 (100) отн.ед. (Диаграмма 5).

При сопоставлении аналогичных спектров образцов РПЖ и ДПЖ, выявлено совпадение набора Рамановских пиков на 43,75% и 85,7%, соответственно.



**Рисунок 28. Рамановский спектр стромального компонента образца группы контроля. Рамановские пики обозначены числовыми значениями.**

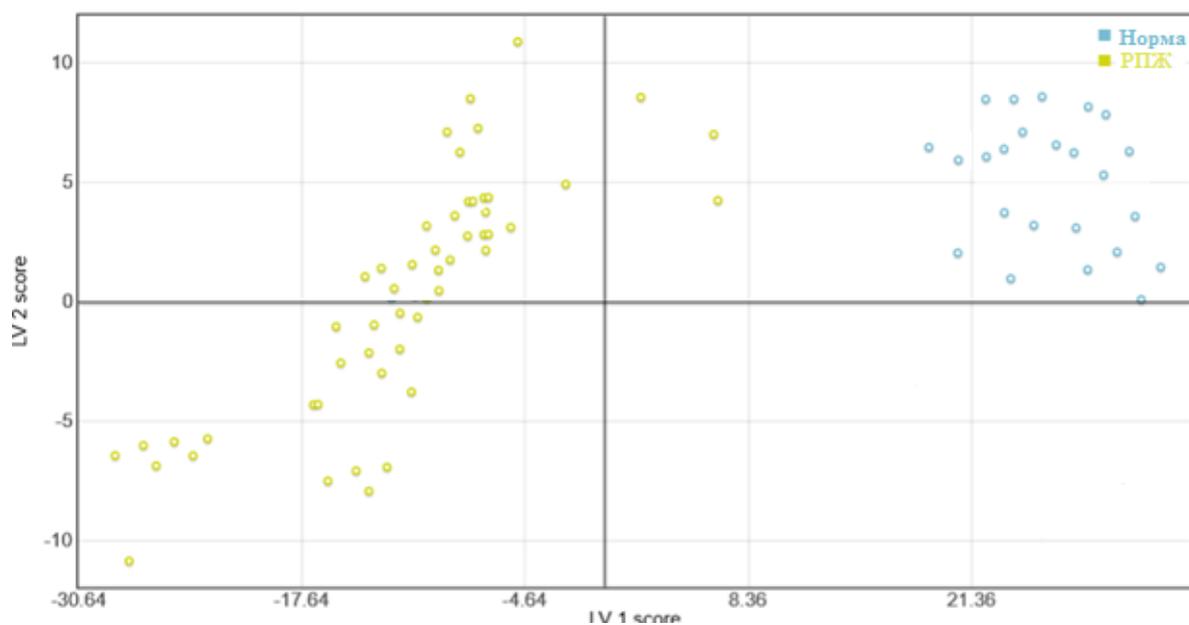


**Диаграмма 5. Сравнительные уровни интенсивности основных рамановских пиков выявленных веществ в образцах с стромального компонента РПЖ и ДГПЖ**

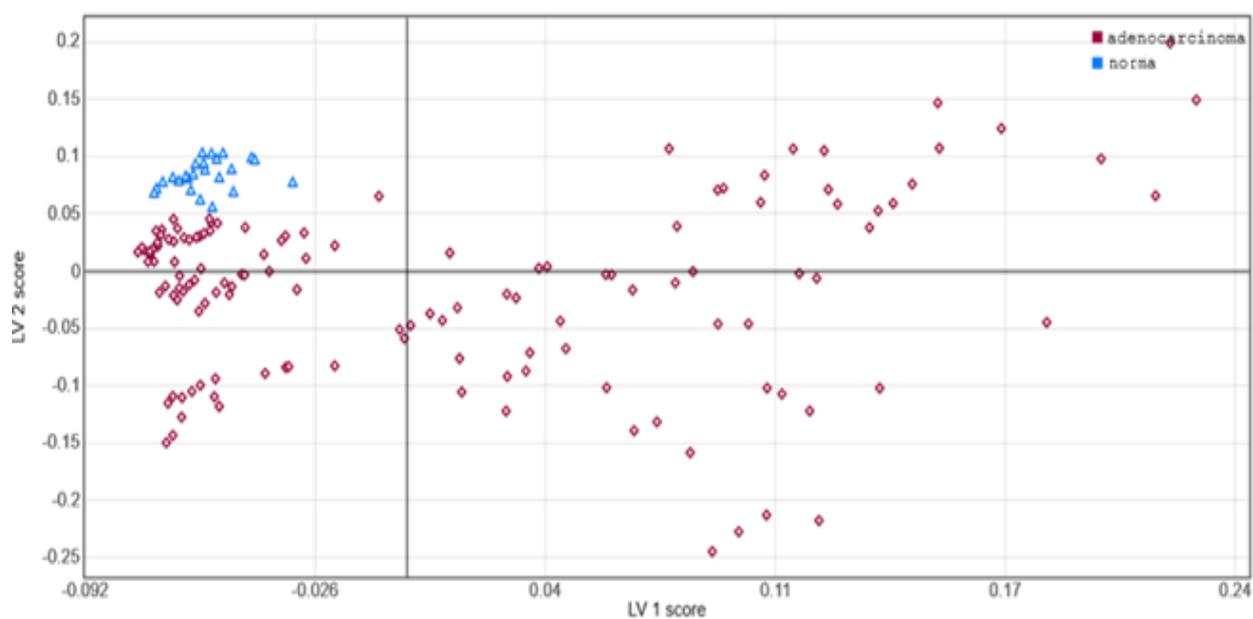
### **3.6. Анализ эффективности метода раман-люминесцентной спектроскопии в диагностике рака предстательной железы**

Анализ эффективности раман-люминесцентной спектроскопии в диагностике рака предстательной железы оценивали с помощью метода проекций на латентные структуры с последующим дискриминантным анализом (PLS-DA). С помощью метода PLS-DA было построено несколько аналитических моделей, согласно которым было осуществлено разделение: 1) Раман-люминесцентных спектров, полученных с помощью лазерной установки с длиной волны 532 нм, образцов группы контроля и образцов РПЖ; 2) Рамановских спектров, полученных с помощью лазерной установки с длиной волны 785 нм, образцов группы контроля и образцов РПЖ 3) разделение Раман-люминесцентных спектров, полученных с помощью лазерной установки с длиной волны 532 нм, образцов РПЖ и ДППЖ; 4) Рамановских спектров, полученных с помощью лазерной установки с длиной волны 785 нм, образцов РПЖ и ДППЖ.

Точность разделения категорий «рак» и «норма» с помощью лазерной установки с длиной волны 532 нм составила 83,6%, специфичность и чувствительность, 90% и 72% соответственно (Рисунок 29). При применении программно-аппаратного комплекса, оснащенного лазерной установкой с длиной волны 785 нм, данные показатели имели следующие значения: точность составила 94%, специфичность и чувствительность – 85% и 100%, соответственно (Рисунок 30).

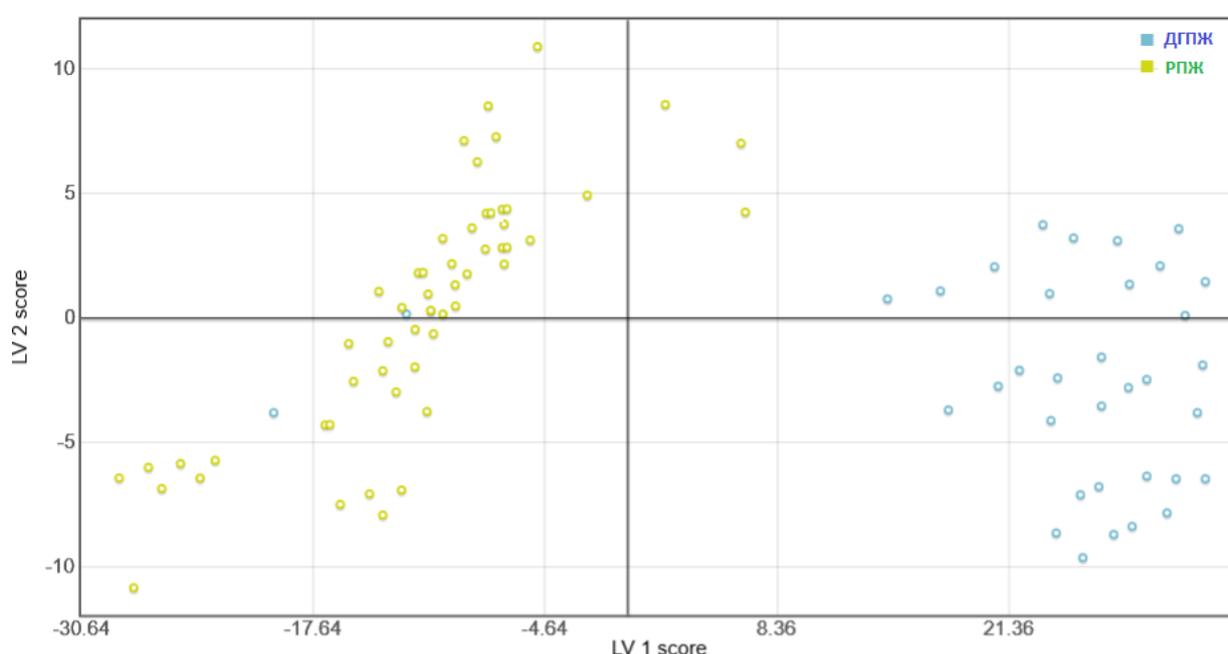


**Рисунок 29. Разделение спектров (полученные при использовании лазерной установки с длиной волны 532 нм) образцов группы контроля и образцов с ПЛЖ методом PLS-DA.**

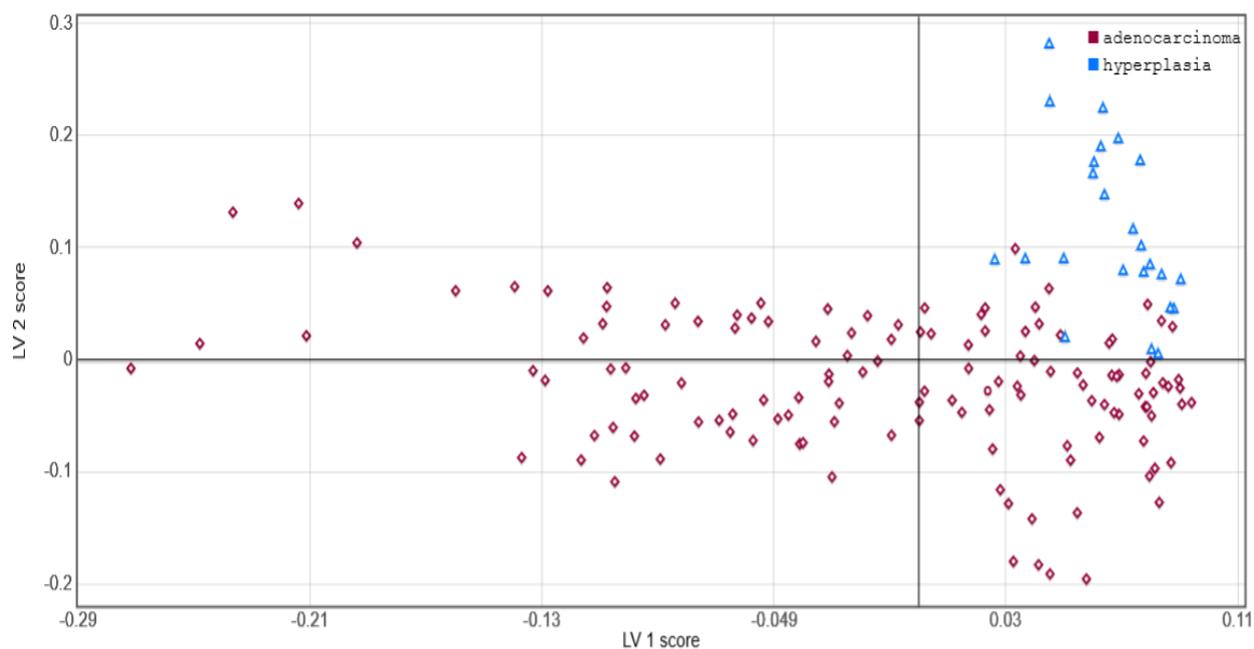


**Рисунок 30. Разделение спектров (полученные при использовании лазерной установки с длиной волны 785 нм) образцов группы контроля и образцов с ПЛЖ методом PLS-DA.**

При анализе эффективности метода раман-люминесцентной спектроскопии с использованием программно-аппаратного комплекса с лазерной установкой длиной волны 532 нм в диагностике образцов с РПЖ и образцов ДГПЖ, точность составила 78%, специфичность – 89% и чувствительность 76%. (Рисунок 31). Аналитическая модель разделения спектров этих же групп образцов, полученных при использовании лазерной установки с длиной волны 785 нм определила более высокие показатели: точность – 96%, специфичность – 99% и чувствительность – 86% (Рисунок 32).



**Рисунок 31. Разделение спектров (полученные при использовании лазерной установки с длиной волны 532 нм) образцов ДГПЖ и образцов с РПЖ методом PLS-DA.**



**Рисунок 32. Разделение спектров (полученные при использовании лазерной установки с длиной волны 785 нм) образцов группы ДГПЖ и образцов с РПЖ методом PLS-DA.**

#### Глава 4. Обсуждение результатов собственного исследования

Традиционное морфологическое исследование в сочетании с иммуногистохимическими методами прочно вошли в алгоритм диагностики рака предстательной железы, и по-прежнему, эффективность их применения не вызывает сомнения. Вместе с тем, необходимость получения быстрого результата в режиме реального времени побуждает исследователей к поиску новых эффективных диагностических технологий. Исходя из этого, нами была предпринята попытка определить роль и значение метода рамановской спектроскопии в дооперационной и интраоперационной диагностике рака предстательной железы. К значимым преимуществам метода относится простота пробоподготовки – эффективность исследования не зависит от объема исследуемой ткани, кроме того, анализ может осуществляться в водных растворах, прозрачной пластиковой упаковке, в виду слабого сигнала последних [100]. В нашем исследовании мы изучили материал предстательных желез, удаленных или иссеченных в ходе различных оперативных манипуляций, а с целью подтверждения данного положения. Действительно, участки ацинарной аденокарциномы обнаруженные в образцах, удаленных в ходе операции радикальной простатэктомии и диагностированные спектроскопически, по своим спектральным характеристикам не показали различий с образцами ацинарной аденокарциномы, найденных в значительно меньших по объему кусочках ткани, полученных в ходе пункционных биопсий ( $p < 0,01$ ).

Проведенное нами сравнительное морфологическое и спектроскопическое исследование с последующей статистической обработкой позволило более детально изучить структурные изменения ткани предстательной железы при гиперплазии, дисплазии и раке. Для этого нами было исследовано предстательные железы или их фрагменты, полученные от 125 пациентов с предварительным диагнозом рак или доброкачественная гиперплазия предстательной железы. Раман-люминесцентную спектроскопию операционного

материала, полученного в ходе радикальной простатэктомии, трансуретральной резекции или пункционной биопсии, предварительно фиксированного в 10% растворе формалина до проведения морфологического исследования осуществляли с помощью двух программно-аппаратных комплексов, с длиной волны лазерной установки 532 нм и 785 нм. Далее, тот же материал исследовали гистологически, гистохимически и иммуногистохимически. Основную группу составили образцы ацинарной аденокарциномы (n=75), группу сравнения – образцы доброкачественной гиперплазии (n=50). Контрольную группу составили образцы предстательных желез, полученные от 10 лиц, умерших в возрасте до 40 лет от других заболеваний, клинически и морфологически не имевших признаков патологии предстательной железы.

Анализ раман-люминесцентных спектров образцов ацинарной аденокарциномы, зарегистрированных лазерной установкой с длиной волны 532 нм, показал, что конфигурация спектров не зависит от гистологического варианта опухоли и имеет единую форму параболы или некоего «купола», что обусловлено единичным локальным максимумом в точке  $2000 \text{ см}^{-1}$  (590-600 нм), отражающим люминесценцию эндогенных порфиринов. Сходные данные были получены М. У. Verezin и соавт. [37], однако, по их мнению, максимальный сигнал был обусловлен не только за счет люминесценцией эндогенных порфиринов, но и суммарной люминесценцией и порфиринов, и липопигментов, обладающих широкой полосой излучения в данной области. В формирование свободных рамановских пиков вносит существенный вклад один из самых известных флуорофоров, входящих в группу липидогенных пигментов, липофусцин, известный также как пигмент «изнашивания», по сути являющийся продуктом окисления клеточных липидов и остатков белков, накапливаемый в лизосомах. Вероятней всего, «дефектные» лизосомы новообразованных опухолевых клеток ацинарной карциномы, неспособные должным образом «утилизировать» продукты окисления белков и липидов, способствуют увеличению количества липофусцина. В нашем исследовании при спектроскопическом исследовании

наличие липидов отмечается в 3,7% случаев, соответствующих образцам аденокарциномы, образованных клетками со светлой цитоплазмой (пенистоклеточным её вариантом), в виде рамановских пиков в точках  $1057\text{ см}^{-1}$  и  $1465\text{ см}^{-1}$ .

При стандартном гистологическом исследовании ключевым прогностическим показателем РПЖ, по-прежнему, является сумма градации Глисона. При сопоставлении спектров ацинарной аденокарциномы различных прогностических групп выявлена обратная коррелятивная зависимость между степенью дифференцировки и значениями люминесценции. Так, уровень интенсивности максимальной люминесценции образцов с низким уровнем дифференцировки (сумма Глисона  $\geq 8$  баллов) достоверно выше аналогичных показателей высокодифференцированных образцов ( $p < 0,05$ ). Увеличение концентрации порфиринов на поздних стадиях развития опухоли, по-видимому, может считаться проявлением одной из универсальных адаптивных реакций организма в процессе его приспособления к гипоксическим условиям в связи с ослаблением интенсивности окислительных процессов [22, 54].

Следует отметить, что данные особенности характерны лишь для «специфического» паренхиматозного компонента опухолевого узла. Стромальный компонент опухоли (соединительная ткань, сосуды и др.), морфологически более однородный у большинства опухолей, на спектре характеризуется единичным локальным максимумом люминесценции и отсутствием рамановских пиков рассеяния. При изучении стромальной составляющей с использованием программно-аппаратного комплекса, оснащенного лазерной установкой длиной волны 532 нм образцов узловой гиперплазии и сопоставлении её с образцами ацинарной аденокарциномы выявлено полное совпадение спектральных характеристик. Схожесть спектроскопических характеристик стромального компонента в образцах узловой гиперплазии и образцами аденокарциномы, по-видимому, объясняется общностью основных структурных элементов, входящих в его состав – пучков

мышечных волокон и рыхлой волокнистой соединительной ткани. Это положение согласуется с результатами зарубежных работ, посвященных изучению экстрацеллюлярного матрикса опухолей других локализаций [52, 77].

Спектр паренхиматозного компонента образцов доброкачественной гиперплазии ПЖ, зарегистрированных с помощью спектрометра длиной волны 532 нм, независимо от гистологической формы, имеет единую конфигурацию в виде «купола», образованного люминесценцией незаменимой аминокислоты триптофана. Однако, в случаях преобладания фиброзно-мышечного компонента, в зоне исследования возможно появление рамановского пика коллагена. Его разновидность (1 тип) ( $937 \text{ см}^{-1}$ ) также фиксируется и при регистрации спектров узловой гиперплазии с помощью лазерной установки длиной волны 785 нм.

Спектры образцов группы контроля характеризуются выраженной «двугорбой» формой спектра, свойственной нормальным неповрежденным тканям и отражают люминесценцию не только порфиринов, но и суммарную люминесценцию липопигментов и флавинов.

При сопоставлении спектроскопических характеристик предстательных желез при раке, гиперплазии и контрольных образцов, полученных с помощью лазерной установки с длиной волны 532 нм, установлено, что каждая группа характеризуется определенным набором показателей: количество и положение локальных максимумов люминесценции, значение интенсивности люминесценции, наличие и расположение пиков рамановского рассеяния, обусловленных соотношением составных компонентов и их концентрацией в ткани (Таблица 5).

**Таблица 5. Спектроскопическая характеристика РПЖ, ДГПЖ и образцов группы контроля при применении лазера длиной волны 532 нм.**

	<b>Ацинарная аденокарцинома (N = 75)</b>	<b>ДГПЖ (N = 50)</b>	<b>Контроль (N = 10)</b>
<b>Начальная люминесценция</b>	1 тыс. до 12 тыс. отн. ед.	19 тыс. до 45 тыс. отн. ед.	От 43 тыс. до 60 тыс. отн. Ед
<b>Количество локальных максимумов люминесценции и их значение (см<sup>-1</sup>)</b>	N - 1 2000 $\pm$ 47 см <sup>-1</sup> (эндогенные порфирины)	N- 1 300 $\pm$ 27 см <sup>-1</sup> (триптофан)	N-2 1030 см <sup>-1</sup> (суммарная люминесценция липопигментов и флавинов), и в точке 2000 см <sup>-1</sup> , (эндогенные порфирины)
<b>Максимальное значение интенсивности люминесценции, (отн.ед.)</b>	12 тыс. отн.ед (для Глисона ниже или равном 5 баллов) >30 тыс. отн.ед. (для Глисона выше или равном 6 баллов)	варьирует от 32 тыс. до 55 тыс. отн. ед.)	варьирует от 60 тыс. до 100 тыс. отн. ед.
<b>Значения волн рамановского рассеяния, (см<sup>-1</sup>)</b>	<b>Рамановские пики</b> встречаются только в случаях с ацинарной аденокарциномой, образованной клетками с светлой цитоплазмой (пенистоклеточный вариант) - 1057 см <sup>-1</sup> и 1465 см <sup>-1</sup> (вibrации липидов)	<b>Рамановские пики</b> встречаются только в случаях смешанной формы узловой гиперплазии с выраженным фиброзно-мышечным компонентом - 299 см <sup>-1</sup> (коллаген)	<b>Рамановские пики</b> отсутствуют

Метаболические расстройства, развивающиеся в ткани железы и связанные с развитием опухоли, также стало возможным идентифицировать с помощью программно-аппаратного комплекса, оснащенного лазерной установкой с длиной волны 785 нм. Результаты проведенного спектроскопического анализа в сочетании с морфологическим исследованием позволили подтвердить основные положения теории нарушенного при раке предстательной железы тканевого и клеточного метаболизма, который, как известно, не соответствует стандартному проявлению эффекта Варбурга [114], наблюдаемому в большинстве случаев злокачественных опухолей. На ранних стадиях развития РПЖ, в клетках не происходит аэробный гликолиз, а основным источником получения энергии для обеспечения жизнедеятельности тканей, являются липиды, полученные из андрогенов [67]. Кроме того, Deer G, Schlaepfer IR. (2016) показали, что клетки рака предстательной железы сверхэкспрессируют определенные маркеры, которые являются ключевыми в инициации синтеза липидов *de novo* [50]. К ним относятся синтаза жирных кислот (FASN), белок 1, связывающий регуляторные элементы стерола (SREBP1) и стериол-КоА-десатуразу и другие. Стериол-КоА-десатураза также является ключевым ферментом в образовании мононенасыщенных жирных кислот из более крупных насыщенных жирных кислот. Результаты спектроскопического исследования убедительно свидетельствуют, что концентрация холестерина и его эфиров ( $1441\text{ см}^{-1}$ ), а также жирных кислот ( $1298\text{ см}^{-1}$ ) в опухолевых клетках аденокарциномы в несколько раз выше по сравнению с клетками при узловой гиперплазии железы. Моно- и полисахариды преобладали в группе с гиперпластическими изменениями за исключением  $\beta$ -глюкозы, содержание которой в образцах аденокарциномы было в пять раз выше по сравнению с образцами ДГПЖ (диаграмма 1), что, видимо, связано с её замедленной утилизацией опухолевыми клетками. Выявление спектроскопически повышенного содержания глутаминовой кислоты ( $1400\text{ см}^{-1}$ ) в образцах с аденокарциномой по сравнению с ДГПЖ подтвердило предположение об эффекторной роли глутамин в образовании липидов *de novo*, и, как следствие, стимуляции роста опухоли [87]. Примечательно, что в

относительно сохранных тканях ПЖ, при спектроскопическом исследовании ни глутамина, ни холестерина, ни жирных кислот выявлено не было. Кроме того, в нашем исследовании было отмечено, что наибольшая интенсивность пиков Рамановского рассеяния отмечается в низкодифференцированных образцах, что согласно шкале градации Глисона соответствует показателям 8 и 9, соответственно высоко и умереннодифференцированные (<7 баллов) участки, напротив, на спектре имеют более низкие показатели интенсивности пиков ( $p < 0,05$ ). В работах Devpura S. и соавт. (2010), R. E. Kast и соавт. (2014) хотя и содержатся частично сходные данные спектроскопического исследования образцов РПЖ, однако не подкрепленные описанием структурных изменений ткани предстательной железы для обоснования полученных результатов [50, 74].

Сравнивая спектры образцов ацинарной аденокарциномы, полученные с помощью лазерной установки с длиной волны 785 нм, с образцами узловой гиперплазии и неизмененных тканей предстательной железы, отмечено, что все опухолевые образцы имели наличие рамановского пика молекулы аминокислоты фенилаланина, при полном его отсутствии в группах с гиперплазированными и сохранными тканями. Повышение концентрации этой аминокислоты, видимо, объясняется усилением синтеза как онкобелков, так и собственных опухолевым клеткам эмбриональных белков, происходящего в опухолевом узле [76]. Наличие полосы в спектре фенилаланина опухолевых тканей предстательной железы нами установлено впервые, однако упоминание о повышенной интенсивности этой аминокислоты в новообразованиях других локализациях не единичны [3, 61, 68, 108]. Особенно интересным является тот факт, что участки ПИН ВС, трактующиеся патогистологически как предопухолевая трансформация, при спектроскопическом исследовании также характеризуются наличием рамановского пика молекулы фенилаланина, но в чуть меньших концентрациях по сравнению с ацинарной аденокарциномой ( $p < 0,01$ ). Однако эти данные корреляции присущи лишь для спектров паренхиматозных компонентов изучаемых групп. Что касается спектров стромального компонента, то наличие рамановского пика фенилаланина было отмечено нами во всех трех группах

исследования. Примечательно, что в образцах группы контроля пик рассеяния молекулы фенилаланина (среднее значение интенсивности рассеяния – 1000 отн. ед.) встречался в спектрах лишь 3 образцов ПЖ от пациентов 39 и 40 лет. При ДГПЖ пик фенилаланина регистрировался во всех образцах вне зависимости от возрастной категории пациентов, и среднее значение интенсивности его рассеяния соответствовало значению 1700 отн. ед. Стромальный компонент образцов аденокарциномы ПЖ при спектральном исследовании также характеризовался наличием на  $621\text{ см}^{-1}$  рамановского сдвига молекулы фенилаланина во всех наблюдениях, при среднем значении интенсивности соответствовало 7000 отн.ед. Таким образом, появление на спектре вибрационных колебаний молекулы фенилаланина, по-видимому, в меньшей или большей степени может свидетельствовать о структурных перестройках в ткани предстательной железы.

Определенные вопросы остаются при сопоставлении результатов спектрального исследования группы контроля и образцов ацинарной аденокарциномы, зарегистрированных с помощью лазерной установки длиной волны 785 нм, имея в виду значительно более высокие значения интенсивности вибраций молекул нуклеиновых кислот ( $1082\text{ см}^{-1}$ ,  $1200\text{ см}^{-1}$ ), и коллагена 1 типа ( $937\text{ см}^{-1}$ ), коррелирующие с их концентрацией в неизмененных тканях. Если наличие рамановского пика коллагена 1 типа может быть объяснено попаданием лазерного луча на сосудистую стенку артерий, то интерпретация феномена появления высоких пиков нуклеиновых кислот в группе контроля может вызывать затруднение. Как известно, опухолевые клетки ацинарной аденокарциномы характеризуются повышением содержания РНК в цитоплазме и ДНК в ядрах [7, 9], однако при спектроскопическом исследовании колебания их молекул в образцах аденокарциномы выявлены в другой области рамановского сдвига ( $762$ ,  $1240\text{ см}^{-1}$ ) с более низким уровнем интенсивности по отношению к тканям без патологических изменений. Возможной причиной может быть их «дефектная» структура, выражающаяся в точечных мутациях, инверсии, делеции

или других «поломках», в связи с чем распознавание их вибрации при спектроскопическом исследовании затруднительно в виду отсутствия эталонного спектра таких молекул в базе данных программного комплекса лазерной установки.

Таким образом, анализ морфо-спектроскопических характеристик ацинарной аденокарциномы показал, что биохимический профиль опухоли претерпевает как количественные, так и качественные изменения в сравнении с аналогичным компонентом ткани ПЖ при узловой гиперплазии и группе контроля (Таблица 6) .

Оценивая возможности программно-аппаратного комплекса, оснащенного лазером, длиной волны 532 нм, по финальным результатам исследования, можно сделать вывод о том, что полученные раман-люминесцентные спектры позволяют достаточно быстро визуально отнести то или иное наблюдение по конфигурации спектра к РПЖ, ДГПЖ или норме. Вместе с тем, при регистрации спектров при изучении стромальных компонентов тканей ПЖ при различных патологиях их основные характеристики могут и совпадать. Учитывая этот факт, необходимым условием для проведения качественного раман-люминесцентного исследования является исследование образца в нескольких участках. Кроме того, лазер длиной волны 532 нм в значительной части случаев регистрируют интенсивную люминесценцию природных люминофоров, содержащихся в тканях ПЖ, что, как правило, «подавляет» сигнал рамановского рассеяния, и снижает информацию о биохимических изменениях, происходящих в опухолевой или гиперплазированной ткани ПЖ. Лазер, длиной волны 785 нм, напротив, при спектроскопическом исследовании позволяет ослабить люминесценцию и выявить на спектре специфический набор рамановских пиков молекул веществ, характерных для изучаемой ткани. Количество таких пиков может варьировать, однако современное программное обеспечение автоматизированно позволяет определить принадлежность тех или иных веществ и идентифицировать их. Согласно полученным данным рамановское рассеяние делает возможным не

только определить вариант патологических изменений, но оценить дальнейшую его динамику. Сопоставление результатов спектроскопического и морфологического исследований при раке, гиперплазии и дисплазии предстательной железы позволило расширить представления о патогенезе данных заболеваний.

**Таблица 6. Основные спектроскопические «маркеры» и выраженность интенсивности\* их рассеяния при раке, доброкачественной гиперплазии и в неизменной ткани предстательной железы при применении лазера длиной волны 785 нм.**

Рамановский пик, см <sup>-1</sup>	Значение	РПЖ	ДГПЖ	Контроль
762	ДНК	+	+	++
820, 937	Коллаген I типа	+ (937 отсутствует)	+ (937++)	+ (937 ++)
840	Полисахариды		+	+
898	В-глюкоза	+++	+	+
1031	Фенилаланин	+++	отсутствует	отсутствует
1082, 1200	Нуклеиновые кислоты	отсутствует	отсутствует	++
1104	Сахаридная связь	+	+	отсутствует
1131	Пальмитиновая кислота	+	+	отсутствует
1176	Гуанин, цитозин	+	+	+
1240	РНК	++	+	+++
1298	Пальмитиновая кислота, жирные кислоты	+	+	+
1323	Гуанин	+	+	+
1400	Глутаминовая кислота	+++	+	+
1441	Холестерин	+++	+	отсутствует
1482	Амид II	+++	+	+
1600, 1629, 1650	Амид I	+++	+	+

\* «+» - интенсивность рамановского рассеяния не превышает 500 (0,5) отн.ед; «++» - интенсивность рамановского рассеяния от 501 (0,5) до 1500 (1,5) отн.ед. ; «+++» - интенсивность рамановского свыше 1500 (1,5) отн. ед.

Обладая значительными преимуществами в виде высокой специфичности, проведением измерений в режиме реального времени, отсутствием

противопоказаний, а также возможностью использования волоконно-оптических датчиков в конструкции пункционных игл, раман-люминесцентная спектроскопия имеет серьезные перспективы использования в качестве метода «оптической биопсии» на до- и интраоперационных этапах диагностики РПЖ.

В результате проведенного исследования и анализа литературных данных об использовании метода раман-люминесцентной спектроскопии для диагностики заболеваний и патологических состояний других локализаций представляется возможным сформулировать алгоритм дооперационной и интраоперационной морфо-спектроскопической диагностики предопухолевых состояний и рака предстательной железы. На первом (дооперационном) этапе после реализации комплекса физикальных, клиничко-лабораторных, неинвазивных диагностических методов, предусмотренных стандартами ведения пациентов с данной патологией, проведения традиционного морфологического исследования биоптатов ткани предстательной железы, осуществляется спектроскопическое исследование образцов на предмет обнаружения и идентификации в них специфических «оптических» маркеров опухоли и/или предопухолевых состояний. Второй (интраоперационный) этап предусматривает проведение спектроскопического исследования в режиме он-лайн в ходе операции на предстательной железе, а также окружающих тканях, параректальной жировой клетчатке, лимфатических узлах. Реализация второго этапа диагностики направлена на определение оптимального объема оперативного вмешательства, включающего радикальное удаление пораженных опухолью тканей, лимфатических узлов, в которых посредством спектроскопического исследования определяются «оптические» маркеры опухоли.

## Выводы

1. Морфологические проявления, идентифицируемых в предстательной железе предопухолевых процессов, доброкачественной гиперплазии и злокачественных опухолей коррелируют с их спектроскопическими характеристиками, которые являются специфичными, отражают степень дифференцировки и гистологический вариант каждого патологического состояния и опухоли.
2. Морфологическая гетерогенность ткани предстательной железы, обусловленная доминированием паренхиматозного или стромального компонентов, обуславливает необходимость проведения анализа спектральных характеристик из разных участков исследуемой ткани, с целью исключения как ложноположительных, так и ложноотрицательных заключений.
3. Ацинарная аденокарцинома предстательной железы характеризуется набором «оптических» маркеров в виде эндогенных порфиринов, холестерина, жирных кислот и  $\beta$ -глюкозы, светлоклеточный и пенистоклеточный раки – липидов, обладающих как флуоресцентными, так рамановскими спектроскопическими особенностями.
4. Использование в морфологическом алгоритме технологии раман-люминесцентной спектроскопии позволяет значительно повысить эффективность дифференциальной диагностики предопухолевых процессов, патологических состояний и опухолей предстательной желез (специфичность – 99%, чувствительность – 86%).

## Практические рекомендации

Пациентам с подозрением на рак предстательной железы, рекомендуется во время проведения пункционной биопсии или операционного вмешательства проводить диагностический поиск с использованием портативного раман-люминесцентного спектрометра, сопряженного с портативным компьютером с целью предварительного определения степени дифференцировки опухоли и хирургических краев резекции.

### Список сокращений

- АМАП – атипическая мелкоацинарная пролиферация
- ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия предстательной железы
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- мпМРТ – мультипараметрическая магнитно-резонансная томография
- ДВИ - диффузионно-взвешенные изображения
- ИКД - измеряемый коэффициент диффузии
- НЭК – нейроэндокринные клетки
- ПИН - простатическая интраэпителиальная неоплазия
- ПСА – простатспецифический антиген
- РПЖ – рак предстательной железы
- РПЭ – радикальная простатэктомия
- ТРУЗИ – трансректальное ультразвуковое исследование
- ТУР – трансуретральная резекция
- УЗИ - ультразвуковое исследование
- АМАСР (alpha-methylacyl-CoA racemase) – альфа-метилацил-коА рацемаза
- НМСК (high molecular weight cytokeratin) - цитокератины высокой молекулярной массы

### Список литературы

1. Авраамова С. Т., Александров Н. С., Кириллов Ю. А., Кукушкин В. И., Пауков В. С. Состояние и перспективы разработки технологий до- и интраоперационной диагностики рака предстательной железы (обзор литературы)// Медицинская наука и образование Урала № 1/2016. С.-117-122.
2. Александров В.П. Рак предстательной железы / В.П. Александров, М.И. Карелин. СПб: Изд-во СПбМАПО, 2004. –148 с.
3. Александров Н.С. Сравнительная иммуноморфологическая и спектроскопическая характеристика опухолей почек: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.02/ Александров Николай Сергеевич – М., 2019. - 99 с.
4. Александров Н.С., Авраамова С.Т., Кириллов Ю.А., Бабичева Т.О., Кукушкин В.И., Артемьев Д.Н.. Использование метода раман-флуоресцентной спектроскопии для диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака. Клиническая и экспериментальная морфология. 2017. № 4 (24). С. 59-65.
5. Алексеев Б. Я. , Воробьев Н. В. , Нюшко К. М. , и соавт. Миграция суммы Глисона у больных раком предстательной железы после радикальной простатэктомии [Электронный ресурс] // Клиническая онкология (специальный выпуск). – 2012. – №1. – Режим доступа: <http://www.clinicaloncology.com.ua/article/3606/rakpredstatelnoj-zhelezy>
6. Бачурин В.И., Бачурин Г.В., Коломоец Ю.С.. Всегда ли уровень PSA подтверждает факт наличия рака предстательной железы [Электронный ресурс] // Клиническая онкология (специальный выпуск). – 2012.– №1. – Режим доступа: <http://www.clinicaloncology.com.ua/article/3606/rak-predstatelnoj-zhelezy>
7. Бялик В. В., Пинчук В. Г. Патологическая анатомия и ультраструктура nodозной гиперплазии и рака предстательной железы \ К.К. Бялик - Киев, 1977. – С. 40-41.

8. Воробьев А.В., Крживицкий П.И. Перспективы профилактики, диагностика и стадирование рака предстательной железы// Практическая онкология. 2008. – Т. 9. – № 2. – С.71-80.
9. Гундорова Л. В. Дифференциальная диагностика гиперпластических и опухолевых процессов предстательной железы: Иммуногистохимическое и плоидометрическое исследование: автореферат дис. ... доктора мед. наук : 14.00.15: Гундорова Людмила Викторовна. – М., – 2005. - 41 с.
- 10.Ефремов Г. Д. Роль иммуногистохимии в диагностике рака предстательной железы // Экспериментальная и клиническая урология.– 2011.– № 4. – С. 25-29.
- 11.Каллаев К. К. Интраоперационный фотодинамический контроль радикальности простатэктомии: автореф. дис. ... канд мед наук: 14.01.23.: Каллаев Камиль Кадырович. - М., - 2012.- С. 20-21.
12. Каприн А.Д., Алексеев Б.Я., Степанов С.О., Рубцова Н.А., Скрепцова Н.С., Долгачева Д.В. Современные методики биопсии предстательной железы в выявлении рака \ \ Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2014. –№6. – С. 59-62.
13. Кельн А.А., Зырянов А.В., П. Б. Зотов. Возможности fusion-биопсии в диагностике рака предстательной железы \ \ Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. –2019. – 8 (2). – С. 126-130.
- 14.Коваленко А.А., Елисеев А.А. Спектроскопия комбинационного рассеяния: Методическая разработка \ \ А.А. Коваленко, А.А. Елисеев. — М. — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова. Факультет наук о материалах, 2011. — С.4.
- 15.Корсик В.Ю., Летковская Т.А., Давидян А.В. Морфологические особенности ERG-позитивной аденокарциномы предстательной железы // Молодой ученый. — 2017. — №44. — С. 48-50
16. Коссов Ф.А., Черняев В.А., Ахвердиева Г.И., Камолов Б.Ш., Абдуллин И.И., Панов В.О., Буйденко Ю.В., Матвеев В.Б., Тюрин И.Е. Роль и

- значение мультипараметрической магнитно-резонансной томографии в диагностике рака предстательной железы // Онкоурология. — №1(13). — 2017. — С. 122-133.
17. Летковская Т. А., Захарова В. А., Черствый Е. Д., и соавт. Иммуногистохимия в диагностике патологии простаты // Онкологический журнал. — 2011.— Т.5. — № 3(19). —С 29-30.
18. Лыжко Н.А. Молекулярно-генетические механизмы инициации, промоции и прогрессии опухолей // Российский биотерапевтический журнал. — 2017. — №4. — С. 7-17.
19. Матвеев Б.П. Рак предстательной железы./ Б. П. Матвеев, Б. В. Бухаркин, В. Б. Матвеев. —Москва, 1999. —С. 153-155.
20. Мищенко А.В., Рубцова Н.А., Алексеев Б.Я. и др. Система унифицированного подхода к интерпретации магнитно-резонансной томографии предстательной железы согласно руководству PI-RADSv // Онкоурология. — 2016. —12(1).—С. 81–89.
21. Невирович Е., Павленко А., Румянцев А. и соавт. Клиническое применение индекса здоровья предстательной железы для раннего выявления РПЖ у мужчин с уровнем ПСА 2-10 нг/мл // Врач. — 2015. — №6. —С. 63-66.
22. Петрицкая Е. Н., Куликов Д. А., Рогаткин Д. А., Гусева И. А.; Куликова П. А.. Использование флуоресцентной спектроскопии для диагностики гипоксии и воспалительных процессов в тканях// Оптический журнал. — № 82 (12). — 2015. — С.41-45.
- 23.Пушкарь Д.Ю., А.В. Говоров, А.В. Сидоренков, Е.А. Прилепская, М.В. Ковылина. Ранняя диагностика рака предстательной железы: методические рекомендации №19. М.: ИД «АБВ-пресс», 2015. — С. 25-27.
24. Сивков А.В., Кешишев Н.Г., Ефремов Г.Д., Ковченко Г.А., Рабинович Э.З., Трудов А.А., Никонова Л.М., Ромих Ф.Д. Нейроэндокринная дифференцировка рака предстательной железы, что нового? // Урология. Номер №3, 2015 - С. 22-30.

25. Тучин В. В. Оптическая Биомедицинская диагностика // Изв. Сарат. ун-та Нов. сер. Сер. Физика. —2005. — №1. — С. 39-53.
26. Харченко В. П., Каприн А. Д., Амосов Ф. Р. Рак предстательной железы: проблемы диагностики // Лечащий врач. —1999. —№ 1. —С. 4-7.
27. Хурсевич Н.А., Слонимская Е.М., Латыпов В.Р. и соавт. Скрининг рака предстательной железы // Сибирский онкологический журнал. — 2005. — №3. —С. 19-23.
28. Шария М.А., Коробкин А.С. Современные методики магнитно-резонансной томографии (МРТ) в диагностике рака предстательной железы//Russian electronic journal of radiology. — 2011. — Т.1. — №4. — С. 11-16.
29. Шibaев А. Н. Клиническое значение фактора роста эндотелия сосудов при раке и доброкачественной гиперплазии предстательной железы: автореферат дис ... канд мед наук. — М., —2003. — С. 109-110.
30. Юрмазов З.А. Место ПИН в опухолевой патологии предстательной железы // Сибирский онкологический журнал. —2009. Приложение № 1. —С. 224-225.
31. Acher P., Dooldeniya M. Prostate biopsy: will transperineal replace transrectal? // Br. J. Urol. Int. — 2013; 112 (5): 533—4. 17.
32. Aldaoud N., Graboski-Bauer A., Abdo N., Bashir S. A., Oweis A. O., Ebwaini H., Hasen Y., Alazab R., Trpkov K. ERG expression in prostate cancer biopsies with and without high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: a study in Jordanian Arab patients // Res Rep Urol. — 2019; 11: —P.149–155.
33. Anastassopoulou J, Kyriakidou M, Malesiou E, Rallis M, Theophanides T. Infrared and Raman Spectroscopic Studies of Molecular Disorders in Skin Cancer // In Vivo. — 2019 Mar-Apr; — 33(2):. — P.567-572.
34. Aprikian A.G , Cordon-Cardo C., Fair W. R. , Reuter V. E. Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinomas // Cancer. 1993. — Vol. 71. — P. 3952-3965.
35. Auner, G. W., Koya, S. K., Huang, C., Broadbent, B., Trexler, M., Auner, Z., Elias, A., Mehne, K. C., & Brusatori, M. A. (2018). Applications of Raman

- spectroscopy in cancer diagnosis // *Cancer metastasis reviews*— 37(4), 691–717.  
<https://doi.org/10.1007/s10555-018-9770-9>
36. Baek S.-J. Baseline correction using asymmetrically reweighted penalized least squares smoothing / S.-J. Baek, A. Park, Y.-J. Ahn, J. Choo // *The Analyst*. – 2015. – 140(1): P. 250–257.
37. Berezin M.Y., Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging // *Chem. Rev.* 110(5), 2641–2684 (2010).
38. Bettencourt M.C., Bauer J.J., Sesterhenn I.A., Connelly R.R., Moul J.W. CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy // *J Urol.* — 1998; — 160: P. 459–465.
39. Bjurlin M.A., Meng X., Le Nobin J., и др. / Optimization of prostate biopsy: The role of magnetic resonance imaging targeted biopsy in detection, localization and risk assessment // *Journal of Urology*. - 2014. - №3. - P. 648-658.  
[doi:10.1016/j.juro.2014.03.117](https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.03.117)
40. Borghesi M, Ahmed H, Nam R, Schaeffer E, Schiavina R, Taneja S, Weidner W, Loeb S. Complications after systematic, random, and image-guided prostate biopsy // *Eur Urol.* — 2017; — 71: — P.353–365.
41. Brawer M. K. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview // *Rev Urol.* 2005; — 7(Suppl 3): — P.11–18.
42. Brimo F., Epstein J. I. Immunohistochemical pitfalls in prostate pathology // *Hum Pathol.* 2012. — № 43(3). — P. 313-24.
43. Brozek-Pluska, B., Musial, J., Kordek, R., & Abramczyk, H. (2019). Analysis of Human Colon by Raman Spectroscopy and Imaging-Elucidation of Biochemical Changes in Carcinogenesis // *International journal of molecular sciences*. — 20(14), — 3398. <https://doi.org/10.3390/ijms20143398>
44. Chang D.T., Challacombe B., Lawrentschuk N. Transperineal biopsy of the prostate — is this the future? // *Nat. Rev. Urol.* — 2013; — 10 (12): P. 690—702.

45. Coetzee L. J., Layfield L.J., Hars V., Paulson D. F. Proliferative index determination in prostate carcinoma tissue: is there any additional prognostic value greater than that of Gleason score, ploidy and pathological stage? // *J Urol.* 1997. — № 157. — P. 214-218.
46. Corsetti S., Rabl T., McGloin D., Nabi G.. Raman spectroscopy for accurately characterizing biomolecular changes in androgen-independent prostate cancer cells // *Biophotonics.*—2018;—11:e201700166.
47. Crow P., Barrass B., Kendall C., Hart-Prieto M., Wright M. et al. The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines// *Br J Cancer.* — 2005. — № 92 (12). — P. 2166-2170.
48. Crow P., Stone N., Kendall C. A. et al. The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro // *Br J Cancer.* — 2003. № 89. — P.106-108.
49. D'Agostino, D., Romagnoli, D., Giampaoli, M., Bianchi, F. M., Corsi, P., Del Rosso, A., Schiavina, R., Brunocilla, E., Artibani, W., & Porreca, A. (2020). "In-Bore" MRI-Guided Prostate Biopsy for Prostate Cancer Diagnosis: Results from 140 Consecutive Patients // *Current urology.* — 14(1). — P. 22–31. <https://doi.org/10.1159/000499264>
50. Deep G., Schlaepfer I.R. Aberrant lipid metabolism promotes prostate cancer: role in cell survival under hypoxia and extracellular vesicles biogenesis // *Int J Mol Sci.* — 2016. — 17(7): — P.1061.
51. Devpuraa S., Thakura J. S., Sarkar F. H. et al. Detection of benign epithelia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer regions in radical prostatectomy tissues using Raman spectroscopy // *Vibrational Spectroscopy.* — 2010. № 53. — P. 227-232.
52. Eberhardt K<sup>1</sup>, Stiebing C, Matthäus C, Schmitt M, Popp J. Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update // *Expert RevMolDiagn.*—2015.—15(6):—P.773-87.[doi:10.1586/14737159.2015.1036744](https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1036744)

53. Eichler K., Hempel S., Wilby J., Myers L., Bachmann L. M., Kleijnen J. Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: A Systematic Review // *J Urol.* — 2006. — Vol 175 (5). — P. 1605-1612
54. El-Sharabasy M.M.H., El-Wassel A.M., Hafez M.M., Salim S.A. Porphyrin metabolism in some malignant diseases // *Br. J. Cancer.* — 1992. — V. 65. — P. 409–412.
55. Epstein J.I. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy // *Mod Pathol.* — 2004; — 17: P.307–315.
56. Ergun D. L. The technology behind Prostate Histoscanning TT: a complete ultrasound solution for patients at risk of prostate cancer // *Advanced Medical Diagnostics (AMD).* -2014. – P. 1-5.
57. Felgueiras, J., Silva, J. V., & Fardilha, M. (2014). Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets // *Journal of Zhejiang University. Science.* — *B*, 15(1), — P. 16–42. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1300106>
- 58.<sup>1</sup> Galletti, G., Matov, A., Beltran, H., Fontugne, J., Miguel Mosquera, J., Cheung, C., MacDonald, T. Y., Sung, M., O'Toole, S., Kench, J. G., Suk Chae, S., Kimovski, D., Tagawa, S. T., Nanus, D. M., Rubin, M. A., Horvath, L. G., Giannakakou, P., & Rickman, D. S. (2014). ERG induces taxane resistance in castration-resistant prostate cancer // *Nature communications.* — 5, 5548. <https://doi.org/10.1038/ncomms6548>
59. Gan, W., Dai, X., Lunardi, A., Li, Z., Inuzuka, H., Liu, P., Varmeh, S., Zhang, J., Cheng, L., Sun, Y., Asara, J. M., Beck, A. H., Huang, J., Pandolfi, P. P., & Wei, W. (2015). SPOP Promotes Ubiquitination and Degradation of the ERG Oncoprotein to Suppress Prostate Cancer Progression // *Molecular cell.* — 59(6). — P. 917–930. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.026>
60. Gautama K.A., Singhb A.N., Srivastavc A.N., Sankhwar S.N.. Angiogenesis in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia assessed by VEGF and CD-34 IHC: A comparative clinico-pathological study // *African Journal of Urology.* — Volume 24. — Issue 2. — June 2018. — Pages 98-103.

61. González-Solís JL, Luévano-Colmenero GH, Vargas-Mancilla J. Surface enhanced Raman spectroscopy in breast cancer cells // *Laser Ther.* — 2013. 22(1): — P. 37–42.
62. Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA, Nazemi J, Lyons J, Hicks D, Fitzmaurice M, Dasari RR, Crowe JP, Feld MS. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy // *Cancer Res.* — 2006 Mar 15; — 66(6): — P. 3317–22.
63. Haka, A. S., Volynskaya, Z., Gardecki, J. A., Nazemi, J., Shenk, R., Wang, N., Dasari, R. R., Fitzmaurice, M., & Feld, M. S. (2009). Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis // *Journal of biomedical optics.* — 14(5). — 054023. <https://doi.org/10.1117/1.3247154>
64. Hamann M.F., Meyer D., Knüpfer S., Fuchs J., Jünemann K.P., Naumann C.M. Application of ultrasound imaging biomarkers (HistoScanning™) improves staging reliability of prostate biopsies // *BMC Res Notes.* — 2017 Nov 9; — 10(1): — P. 579. doi: 10.1186/s13104-017-2896-y.
65. Hameed O., Humphrey P. A. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology of the prostate // *Semin Diagn Pathol.* — 2005 22:88–104.
66. Harper K.L., Taupenot L., O'Connor D. T. The Chromogranin– Secretogranin Family // *The new England journal of medicine.* 2003. — № 348. — P. 1134–49.
67. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer // *Endocrine Reviews.* — 2011. — 25(2). — P. 276–308.
68. Huang Z.H., Lui A., McWilliams, Lam S., McLean D.I., Zeng H. Near-infrared Raman spectroscopy detects lung cancer // *Proc. SPIE 5630, Optics in Health Care and Biomedical Optics: Diagnostics and Treatment II*, (18 January 2005); <https://doi.org/10.1117/12.577419>
69. Hodge K.K., McNeal J.E., Terris M.K. et al. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate // *J.Urol.* — 1989. — Vol. 142. — № 1. — P. 71–75.
70. Hori S., Blanchet J.S., McLoughlin J. From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSA in

- the detection and management of early prostate cancer // *BJU International* 2013; — 112: — P. 6.
71. Jiang, N., Zhu, S., Chen, J., Niu, Y., & Zhou, L. (2013). A-methylacyl-CoA racemase (AMACR) and prostate-cancer risk: a meta-analysis of 4,385 participants// *PloS one*, 8(10), e74386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074386>
72. Jones R. R., Hooper D. C., Zhang L., Wolverson D., Valev V. K.. [Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers](#) // *Nanoscale Res Lett.* — 2019; — 14: — P.231/ doi: 10.1186/s11671-019-3039-2
73. Kamińska A., Szymborski T., Witkowska E , Kijeńska-Gawrońska E , Ieswieszkowski W , Niciński K , Trzcńska-Danielewicz J , Girstun A. Detection of Circulating Tumor Cells Using Membrane-Based SERS Platform: A New Diagnostic Approach for ‘Liquid Biopsy’ // *Nanomaterials.* — 2019. — 9(3). — 366. — P.1-15.
74. Kast RE, Tucker SC, Killian K, Trexler M, Honn KV, Auner GW. Emerging technology: applications of Raman spectroscopy for prostate cancer // *Cancer Metastasis Rev.* — 2014. — Sep;33(2-3): — P.673-93. doi: 10.1007/s10555-013-9489-6.
75. Kapustin V.V., Shirokorad V.I., Gromov A.I., Koshurnikov D.S.. The first experience in using the ultrasound and magnetic resonance image fusion technology in the diagnosis of prostate cancer // *Онкоурология.* — 2010. — №3. — С. 33-36.
76. Kong K<sup>1</sup>, Rowlands CJ, Varma S, Perkins W, Leach IH, Koloydenko AA, Williams HC, Notingher I. Diagnosis of tumors during tissue-conserving surgery with integrated autofluorescence and Raman scattering microscopy// *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2013 Sep 17; — 110(38):15189-94. doi: 10.1073/pnas.1311289110.
77. Kong K1, Zaabar F, Rakha E, Ellis I, Koloydenko A, Notingher I. Towards intra-operative diagnosis of tumours during breast conserving surgery by selective-

- sampling Raman micro-spectroscopy // *Phys Med Biol.* — 2014 Oct 21; — 59(20): — P.6141-52. doi: 10.1088/0031-9155/59/20/6141
78. Kron K, Liu L, Trudel D, Pethe V, Trachtenberg J, Fleshner N, et al. Correlation of ERG expression and DNA methylation biomarkers with adverse clinicopathologic features of prostate cancer // *Clin Cancer Res.* — (2012) 18: — 2896–904. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2901
79. D. Lee, C. Lee, T. Kwon, D. You, I.G. Jeong, J. Hyuk Hong, H. Ahn, C-S. Kim. Clinical features and prognosis of prostate cancer with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia // *Korean J Urol.* — 2015 Aug; — 56(8): — P. 565–571.
80. Lopez M. A., Losa C. A., Fernando A. B. et al. Incidental prostatic cancer: T1a-T1b. Our experience after observation/radical surgery and literature review // *ActasUrolEsp.* — 2006; — 30(8): — P. 749-53; discussion 753
81. Linder B J , Frank I , Umbreit E C , Shimko M S , Fernández N , Rangel L J , Karnes R J Standard and saturation transrectal prostate biopsy techniques are equally accurate among prostate cancer active surveillance candidates // *Int J Urol.* — 2013. — V. 20. — P. 860-864.
82. Lindahl, O. A., Nyberg, M., Jalkanen, V., & Ramser, K. Prostate cancer detection using a combination of Raman spectroscopy and stiffness sensing. // In: 1st global conference on biomedical engineering & 9th Asian-Pacific conference on medical and biological engineering // Springer. — 2015. — P. 267–27.
83. [Q. Liu](#) Role of optical spectroscopy using endogenous contrasts in clinical cancer diagnosis // *World J Clin Oncol.* — 2011 Jan 10; — 2(1): — P. 50–63.
84. Lloyd M D , Darley D J , Wierzbicki A S Alpha-methylacyl-CoA racemase – an «obscure» metabolic enzyme takes centre stage // *FEBS J.* — 2008. — № 275. — P.1089-1102.
85. Lopes R M , Silveira L Jr et al Diagnostic model based on Raman spectra of normal, hyperplasia and prostate adenocarcinoma tissues in vitro // *Spectroscopy.* — 2011. — № 25. — P 89-102.

- 86.A.A. Lykina, D. N. Artemyev, V.I. Kukushkin, I.A. Bratchenko, S.T. Avraamova, N.S. Aleksandrov. Multivariate analysis of tissues Raman spectra using regression methods. *Journal of Physics: Conf. Series.* 1368 (2019). doi:10.1088/1742-6596/1368/2/022042
87. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia // *Nature.* — (2012). — 481: — P.380–4.
- 88.Melegh, Z., & Oltean, S. (2019). Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer // *International journal of molecular sciences.* — 20(11). — 2676 <https://doi.org/10.3390/ijms20112676>
- 89.Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4. Lyon: IARC Press; — 2016.
- 90.Morais CLM, Lilo T, Ashton KM, Davis C, Dawson TP, Gurusinghe N, Martin FL. Determination of meningioma brain tumour grades using Raman microspectroscopy imaging // *Analyst.* — 2019 — Nov 18; — 144(23): — P. 7024-7031.
91. Nogueira L.; Corradi R.; Eastham J. A.. Prostatic specific antigen for prostate cancer detection. // *Int. braz j urol.* — 2009 — vol. — no.5. Rio de Janeiro Sept./Oct. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-55382009000500003>
92. Noguchi M., Yahara J., Koga H. et al. Necessity of repeat prostate biopsies in men for suspected prostate cancer. *Int J Urol.* - 1999. - Vol.6. N.1. - P.7-12.
- 93.Orozco R, O'Dowd G, Kunnel B, Miller MC, VeltriRW.Observations on pathology trends in 62,537 prostate biopsies obtained from urology private practices in the United States. // *Urology* — 1998 — Mar;51(3): — P.523
94. Osunkoya A.O. Update on prostate pathology // *Pathology.* - 2012.-Vol.44(5).— P.391-406.
95. Prathibha S, Goyal KG, ZyngerDL.Initial diagnosis of insignificant cancer, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, atypical small acinar proliferation, and

- negative have the same rate of upgrade to a Gleason score of 7 or higher on repeat prostate biopsy // *Hum Pathol.* — 2018. — Sep; — 79: — P.116-121.
96. Pu Y., Wang W., Tang G., R Robert. Changes of collagen and nicotinamide adenine dinucleotide in human cancerous and normal prostate tissues studied using native fluorescence spectroscopy with selective excitation wavelength // *Alfano Journal of Biomedical Optics.* — 2010. — № 154. — P. 1-5.
97. Santos L F , Wolthuis R , Koljenović S , Almeida R M Puppels G J Fiber-optic probes for in vivo Raman spectroscopy in the highwavenumber region // *Anal Chem* — 2005 — № 77 — P. 6747-52.
98. Savitzky A. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedure / A. Savitzky, M.J.E. Golay // *Analytical Chemistry.* — 1964. — 36: P.1627 – 1639.
99. Scattoni V., Roscigno M., Freschi M. et al. Predictors of prostate cancer after initial diagnosis of atypical small acinar proliferation at 10 to 12 core biopsies// *Urology.* — 2005. — Vol.66. — P.1043-7.
100. O. R. Šćepanović, Z. Volynskaya, C-R. Kong, L. H. Galindo, R. R. Dasari, M. S. Feld. A multimodal spectroscopy system for real-time disease diagnosis // [Rev Sci Instrum.](#) — 2009. — Apr; 80(4): —043103.
101. Shah R B, Kunju L P, Shen R. et al Usefulness of basal cell cocktail (34betaE12+p63) in the diagnosis of atypical prostate glandular proliferations. // *Am J ClinPathol* — 2004122517–P. 523.
102. Sharma V, Kashyap D, Mathker A, Narvenkar S, Bensalah K, Kabbani W, Tuncel A, Cadeddu JA, Liu H Optical reflectance spectroscopy for detection of human prostate cancer. // *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* — 2009; — P.118-21.
103. Schiffmann J, Beyer B, Fischer J, Tennstedt P, Boehm K, Michl U, Graefen M, Salomon G. Histoscanning has low sensitivity and specificity for seminal vesicle invasion. // *Urology.* — 2014. — Nov;84. — (5):1168-71. doi:10.1016/j.urology.2014.06.050. Epub 2014 Oct 24.

104. Schiffmann J, Manka L, Boehm K, Leyh-Bannurah SR, Karakiewicz PI, Graefen M, Hammerer P, Salomon G. Controversial evidence for the use of HistoScanning™ in the detection of prostate cancer. // [World J Urol.](#) — 2015 — Dec;33(12): — 1993-9. doi: 10.1007/s00345-015-1555-y.
105. Shen P.F., Zhu Y.C., Wei W.R. The results of transperineal versus transrectal prostate biopsy: a systematic review and meta-analysis. // *Asian J Androl.* – 2012. – № 14(2). – P. 310–315
106. Siddiqui M.M., Rais-Bahrami S., Truong H. et al. Magnetic resonance imaging/ultrasound-fusion biopsy significantly upgrades prostate cancer versus systematic 12-core transrectal ultrasound biopsy. // *Eur. Urol.* 2013; 64 (5): 713—9.
107. Suh JH, Park JW, Lee C, Moon KC. ERG immunohistochemistry and clinicopathologic characteristics in Korean prostate adenocarcinoma patients. // *Korean J Pathol.* (2012) 46:423–8. doi: 10.4132/KoreanJPathol. — 2012. — 46.5. — P. 423
108. Sufang Qiu Qingting Huang Lingling Huang Jinyong Lin et al. Label-free discrimination of different stage nasopharyngeal carcinoma tissue based on Raman spectroscopy. // *Oncology Letters/ Volume 11 Issue 4\2016.* Pages: 2590-2594
109. Sung M T , Jiang Z , Montironi R , MacLennan G T , Mazzucchelli R , Cheng L Alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) /34betaE12/ p63 triple cocktail stain in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy // *Hum Pathol* — 2007. — № 38 (2). — P. 332-41
110. Swami M. KGupta., P. K.. Optical Spectroscopy for Biomedical Diagnosis. // *Proceedings of the National Academy of Sciences, India - Section A/ 2018/ 88(3)* —P.1-8.
111. Schwartzmann I, Celma A, Gallardo I, Moreno O, Regis L, Placer J, Planas J, Trilla Herrero E, Morote Robles J. In Search for risk predictors at the

- microscopic scenario of a negative biopsy. A systematic review. // *Actas Urol Esp.* 2019. — Sep;43(7): — P.337-347.
112. Väänänen RM, Ochoa NT, Vertosick EA, Bjartell A, Boström PJ, Taimen P, Pettersson K. Global expression of AMACR transcripts predicts risk for prostate cancer - a systematic comparison of AMACR protein and mRNA expression in cancerous and noncancerous prostate. // *BMC Urol.* — 2016 Feb 29; — 16: — P.10. doi: 10.1186/s12894-016-0128-8.
113. Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & DePinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. // *Genes & development*, 32(17-18), 1105–1140. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
114. Warburg O. On the origin of cancer cells (англ.) // *Science.* — 1956. — Vol. 123, no. 3191. — P. 309—314.
115. Wilson, R. H., Chandra, M., Scheiman, J. M., Lee, S. Y., Lee, O. E., McKenna, B. J., Simeone, D. M., Taylor, J. M., & Mycek, M. A. (2017). Tissue Classification Using Optical Spectroscopy Accurately Differentiates Cancer and Chronic Pancreatitis. // *Pancreas*, 46(2), 244–251
116. Woolford L, Chen M, Dholakia K, Herrington CS. Towards automated cancer screening: Label-free classification of fixed cell samples using wavelength modulated Raman spectroscopy. // *JBioPhotonics.* — 2018 Apr; — 11(4):e201700244.
117. Wojno K J, Epstein J I. The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34 beta E12) in the diagnosis of prostate cancer. A review of 228 cases. // *Am J SurgPathol.* — 1995. — 19251–260.
118. Zheng C, Qing S, Wang J, Lü G, Li H, Lü X, Ma C, Tang J, Yue X. Diagnosis of cervical squamous cell carcinoma and cervical adenocarcinoma based on Raman spectroscopy and support vector machine. // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* — 2019 — Sep; — 27: — P.156-161.

119. Zhou M., Jiang Z., Epshtein J. Expression and diagnostic utility of alpha-methylacyl-CoA-rasemase (p504S) in foamy gland and pseudohyperplastic cancer. // *Am J Surg Pathol.* — 2003. — 27. — P. 772-778.
120. Zlotta A.R., Raviv G., Schulman C.C. Clinical prognostic criteria for later diagnosis of prostate carcinoma in patients with initial isolated prostatic intraepithelial neoplasia.// *Europ. Urol.* – 1996. – Vol.30. – P.249-255
121. Zúñiga WC, Jones V, Anderson SM, Echevarria A, Miller NL, Stashko C, Schmolze D, Cha PD, Kothari R, Fong Y, Storrie-Lombardi MC. Raman Spectroscopy for Rapid Evaluation of Surgical Margins during Breast Cancer Lumpectomy. // *Sci Rep.* — 2019. — Oct 10; — 9(1). — P.1463-69.