

На правах рукописи

Александров Николай Сергеевич

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕЙ ПОЧЕК**

14.03.02 – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2019

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, доцент

Кириллов Юрий Александрович

Официальные оппоненты:

Забозлаев Федор Георгиевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр ФМБА России», патологоанатомическое отделение, заведующий отделением.

Столяревич Екатерина Сергеевна, доктор медицинских наук, ГБУЗ "Городская клиническая больница №52 ДЗМ", патологоанатомическое отделение, врач-патологоанатом.

Ведущая организация: ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» «_____» 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991 Москва, Трубецкая ул., д.8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1 и на сайте www.sechenov.ru

Автореферат диссертации разослан «__» «_____» 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
доцент

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Болезни почек и мочевыводящих путей традиционно относятся к категории наиболее распространенных заболеваний человека. Вместе с тем, опухоли почек в структуре заболеваемости и смертности населения Российской Федерации до недавнего времени составляли 3- 5%. Однако, всего за 12 лет (2000 – 2012 гг.) в большинстве стран мира, включая РФ, наметилась устойчивая тенденция к резкому повышению заболеваемости онкоурологическими болезнями на 15 – 31,4% (Алексеев Б.Я. и соавт., 2012) при безусловном доминировании злокачественных вариантов опухолей в этой группе (Давыдов М.И. и соавт., 2007). В отличие от новообразований других локализаций опухоли почек чаще и в течение более длительного времени развиваются бессимптомно и лишь в 10 – 15% случаев проявляют себя классической триадой симптомов: пальпируемым объёмным образованием в поясничной области, гематурией и болью в пояснице (Bullock et al., 1989). Злокачественные опухоли почек обычно и чаще по сравнению с опухолями других органов проявляют себя в период максимальной реализации опухолевого потенциала, распространенным метастазированием, прорастанием опухоли в паранефральную клетчатку, развитием паранеопластического синдрома (Patard J., 2003). Социальное значение опухолей почек обусловлено преимущественным поражением лиц работоспособного возраста (30 – 50 лет), трудностью их ранней диагностики, а для злокачественных форм ещё и резистентностью к лучевой и химиотерапии, низкой пятилетней выживаемостью больных после проведенного лечения и резким ухудшением качества жизни (Матвеев В.Б. и соавт., 2005). Следует подчеркнуть, что, несмотря на достигнутые определенные успехи в морфологической диагностике опухолей почек, вопросы научного обеспечения создания новых высокоточных и эффективных методов ранней диагностики опухолей почек представляют актуальную проблему современной урологии, нефрологии и морфологии.

Цель исследования: провести сравнительную характеристику некоторых злокачественных опухолей почек на основании результатов иммуноморфологического и спектроскопического исследования.

Задачи исследования

1. Получить спектральные характеристики различных вариантов почечно-клеточного рака с помощью метода раман-флуоресцентной диагностики.
2. Сопоставить данные спектроскопического анализа участков почечной ткани, пораженных опухолевым процессом, с результатами их традиционного стандартного

морфологического и иммуногистохимического исследования, подтверждающего наличие опухоли в почечной ткани.

3. На основании анализа спектроскопических оптических характеристик почечно-клеточного рака определить значение метода раман-флуоресцентной диагностики, объединяющего флуоресцентную спектроскопию и спектроскопию комбинационного (рамановского) рассеяния света для его дооперационной диагностики.

Научная новизна исследования

Научная новизна данного исследования заключается в том, что в нем впервые на основании использования метода раман-флуоресцентной диагностики для идентификации опухолей почек определены специфические оптические спектральные опухолевые маркеры, характерные для различных вариантов почечно-клеточного рака различной степени дифференцировки. При этом заключение о характере и распространенности опухолевого процесса было подтверждено стандартным морфологическим исследованием. Данное научное исследование является морфологическим сопровождением и обоснованием применения метода раман-флуоресцентной спектроскопии для более точной диагностики почечно-клеточного рака. На основании полученных данных впервые разработаны алгоритмы действий и выработаны стандартные режимы работы лазера (мощность, время эксплуатации, время вычисления светового и темнового спектров и др.).

Практическая значимость

Результаты проведенного исследования убедительно свидетельствуют о возможности использования в алгоритме диагностики опухолей почек метода раман-флуоресцентной спектроскопии. На основании спектрального анализа образцов различных вариантов почечно-клеточного рака стало возможным определить степень дифференцировки опухоли, наличие или отсутствие вторичных изменений в опухолевом узле. Поскольку диагностика опухоли осуществляется в режиме реального времени, появляются перспективы интраоперационного применения метода для диагностики опухолей и других локализаций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Спектральный анализ биоптата почечной ткани, пораженной опухолевым процессом, позволяет выявить и зарегистрировать своеобразные «отпечатки» молекул различных веществ и

соединений, которые могут быть отнесены к оптическим маркерам опухоли. Результаты спектрального анализа подтверждаются стандартным иммуноморфологическим исследованием образца опухолевой ткани, проводимом в установленном порядке.

2. В связи с гетерогенностью почечной ткани, как в норме, так и при патологии, и наличием в ней паренхиматозного и стромального компонентов спектральные характеристики и совокупность оптических маркеров, характеризующих состояние почечной ткани в норме и патологии могут существенно отличаться.

3. Неоднородность строения опухолевого узла и наличие в нем вторичных изменений обуславливает необходимость проведения анализа спектральных характеристик, полученных из разных участков опухолевого узла, с целью исключения как ложноположительных, так и ложноотрицательных заключений.

Апробация диссертационного материала

Материалы диссертации доложены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016), научно-практической конференции «Применение лазерной рамановской спектроскопии в медицине, народном хозяйстве и промышленности» (Москва, 2014), Международной конференции «Annual International Conference on Research, Education and Teaching by Russian Academics» (Афины, 2016), XXVIII Европейском патологическом конгрессе (Кёльн, 2016), Научно-практическая конференция 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).

Апробация диссертации состоялась на научной конференции кафедры патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова «28» января 2019 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 им. акад. А.И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02– патологическая анатомия, а также области исследования согласно пунктам 1, 2, 3 и 4.

Публикации результатов работы

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 работы (2 оригинальные и 2 обзорные) в журналах, рекомендованных ВАК, и 3 публикации в зарубежных изданиях.

Объем и структура диссертации

Диссертация построена по монографическому типу и изложена на 99 страницах машинописи, содержит 9 таблиц, 26 рисунков, 1 диаграммы. Диссертация состоит из введения, глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 51 отечественных и 68 иностранных источников.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

Для выполнения задач, поставленных в данном исследовании, был изучен материал, полученный у 85 больных раком почки (мужчин – 45, женщин – 40), находившихся на обследовании и лечении в НИИ Уронефрологии и репродуктивного здоровья человека Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России. Средний возраст больных составил $57 \pm 1,21$ лет. Исследовали почки или их фрагменты, удаленные в ходе операции радикальной нефрэктомии (93,2%) или частичной резекции почки (6,8%) по поводу злокачественного новообразования почки. Учитывая тот факт, что за исключением одного случая, при котором имело место диффузное поражение почек (1,2%), опухоль имела вид узла, расположенного в верхнем (48,2 %) или нижнем (36,5%) полюсах, либо в среднем сегменте почки (14,1%), участки опухолевой ткани были получены из его центра, имея в виду центр предполагаемой окружности. Кроме того, были исследованы по 2 образца ткани с периферии опухолевого узла, непосредственно примыкающие к так называемой «псевдокапсуле» опухоли и включающие её фрагменты. Помимо образцов опухолевой ткани исследовали по 2 участка почечной паренхимы из визуально неизменённых участков, максимально удаленных от опухолевого узла. Таким образом, у каждого пациента всего исследовали по 5 образцов почечной ткани размерами 0,5 x 0,5 x 0,5 см (I группа). Контрольную группу (II группа) составили образцы почечной ткани аналогичных размеров, полученные от 10 лиц (мужчин – 6, женщин – 4), умерших в возрасте до 40 лет от других заболеваний, клинически и морфологически не имевших признаков почечной

патологии. Образец был изъят из верхнего полюса почки, отступив от её капсулы на 0,5 см. Средний возраст больных составил $32,5 \pm 1,59$ года.

В соответствии с классификацией Робсона (1982 г.) и TNM (2009 г.) опухоли были распределены следующим образом: I стадии (T1N0M0) соответствовали 30 (35,3%) наблюдений, II стадии (T2N0M0) – 41 (48,2%) наблюдений, III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) – 13 (15,3%) наблюдений, IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, ЛюбаяNЛюбаяM0, ЛюбаяNЛюбаяM1) – 1 (1,2%) наблюдение.

Для выполнения гистологического исследования образцы тканей фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина, заливали в парафин. Срезы толщиной 5-7 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином и пикрофуксином по ван Гизону, подвергали обзорному морфологическому анализу, при котором определяли гистологический тип опухоли, степень дифференцировки, выраженность вторичных изменений и распространенность опухолевого процесса. Для определения гистологического варианта почечно-клеточного рака (ПКР) использовали классификацию ВОЗ (2004 г), согласно которой, в подавляющем большинстве случаев, был выявлен его светлоклеточный вариант - 67 (79 %) случаев, папиллярный – 10 (12 %) и хромофобный – 8 (9 %) наблюдений. Степень дифференцировки опухолевых клеток определяли согласно общепринятой шкале градаций по Фурману (1982) (Табл. 2).

В ходе исследования проводили гистохимические реакции, позволяющие оценить на наличие и распространенность склеротических изменений, выраженность экстрацеллюлярного матрикса с помощью трихрома по Массону.

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах с использованием стрептавидин-биотинового метода с применением двухшаговой полимерной системы визуализации «EnVision+DualLinkSystem-HRP» Dako Cytomation с помощью моноклональных антител к CK-7, Vimentin, CD10, позволяющих подтвердить или опровергнуть тот или иной вариант ПКР. Каждое иммуногистохимическое исследование предусматривало проведение процедуры положительного и отрицательного контроля для исключения вероятности получения ложнонегативных и ложнопозитивных результатов. Отрицательный контроль исключал неспецифическое окрашивание. На контрольный срез наносили фосфатно-солевой буфер без первичного антитела. Положительный контроль подтверждал поставленную иммуногистохимическую реакцию с данным антителом. По результатам иммуногистохимического исследования оценивали интенсивность экспрессии: менее 5% клеток— отрицательная (-), 5-24% - слабopоложительная (+) , 25-74% — умеренно положительная (++) , более 75%—выраженная (+++).

Раман-флуоресцентное исследование проводили с помощью программно-аппаратного комплекса – анализатора, состоящего из микроскопа Olympus и спектрометра ИнСпектр R532, 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) и мощность лазера (10 мВт) были стандартными, и их постоянство и стабильность обеспечивались техническими характеристиками программно-аппаратного комплекса. 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 и регистрировала изменения их количественного и качественного состава при различных состояниях, а в нашей работе – в изучаемых группах.

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). Все методы предобработки и многомерный анализ были реализованы в онлайн программном обеспечении TRcloudbeta.

Статистическую обработку данных выполняли на персональном компьютере с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica for Windows 7,0 (Stat.Softinc.США). Все полученные количественные, анамнестические, клинические, лабораторные и инструментальные данные обрабатывали методом вариационной статистики. Для оценки взаимосвязи нескольких признаков проводили корреляционный анализ по Спирмену и/или Пирсону. Различия считались статистически достоверными при значении p менее 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты иммуноморфологического и спектроскопического исследований образцов светлоклеточного почечно-клеточного рака

На светооптическом уровне при исследовании образца, полученного из центральной части опухолевого узла, опухоль состояла из полиморфных полигональных, либо округло-овальных клеток со светлой оптически пустой цитоплазмой, образующих альвеолярные или дольковые структуры, разделенные тонкопетливой сетью соединительной ткани. Клетки существенным образом отличались друг от друга размером и формой ядер, наличием или

отсутствием ядрышек, идентифицируемой или неидентифицируемой структурой хроматина, а также его расположением: очаговым, диффузным или маргинальным (Рис. 1Б).

Раман-флуоресцентные спектры образцов светлоклеточного рака, полученные непосредственно из центра опухолевого узла имели характерные особенности в виде набора специфических своеобразных «пиков» в диапазоне от 1000 до 2980 см^{-1} , которые отличались друг от друга положением и интенсивностью в зависимости от степени дифференцировки опухоли. Пик 1003 см^{-1} соответствовал рассеянию молекул фенилаланина, 1157 см^{-1} –метионина, 1517 см^{-1} и 2965 см^{-1} различным модификациям бета-каротина (данное сочетание рамановских пиков отмечено в 100% случаев), а 2977 см^{-1} молекулам холестерина (в 16,6% случаев). Локальный максимум флуоресценции соответствовал значению 2497 \pm 33,02 см^{-1} и был обусловлен флуоресценцией эндогенных порфиринов (Рис. 1А), интенсивный синтез которых можно рассматривать как некую «аварийную» ответную реакцию всего организма на развивающийся при опухолевом росте анаэробный гликолиз. Патогистологическая характеристика образца, полученного из участка, расположенного на периферии опухолевого узла, в целом, содержала набор признаков, свойственных центральному образцу, однако значительная часть клеток была лишена ядер, а сами клеточные элементы опухоли располагались более упорядочено. По своим спектральным характеристикам периферические участки по существу не отличались от центральных, но имели сравнительно низкую интенсивность рамановского рассеяния света, что на соответствующих спектрах проявлялось меньшей высотой регистрируемых пиков. Вместе с тем, и значения частот, и набор рассеиваемых молекул, был идентичен, однако локальный максимум флуоресценции эндогенных порфиринов был несколько снижен (Рис.1В).

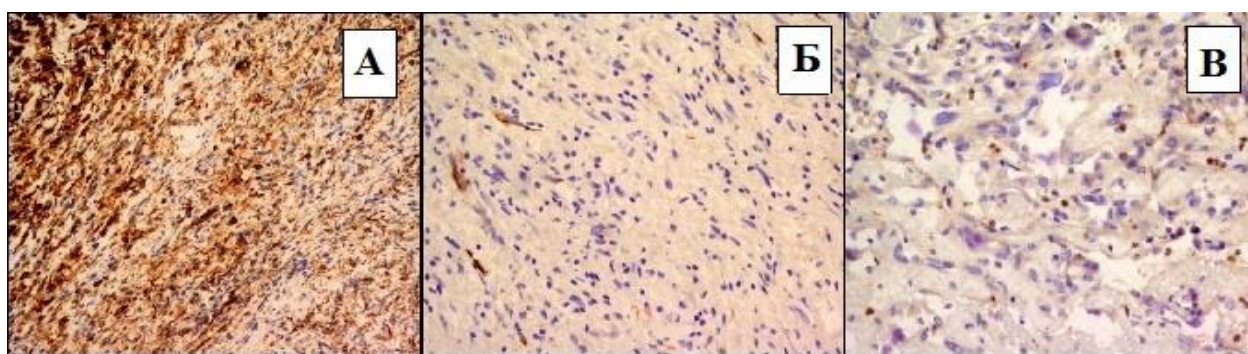


Рисунок 2. Результаты иммуногистохимического исследования образца светлоклеточного ПКР. А. Выраженная экспрессия виментина опухолевыми клетками. X100. **Б.** Отсутствие экспрессии СК-7 опухолевыми клетками. X200. **В.** Положительная экспрессия CD10 опухолевыми клетками. X400

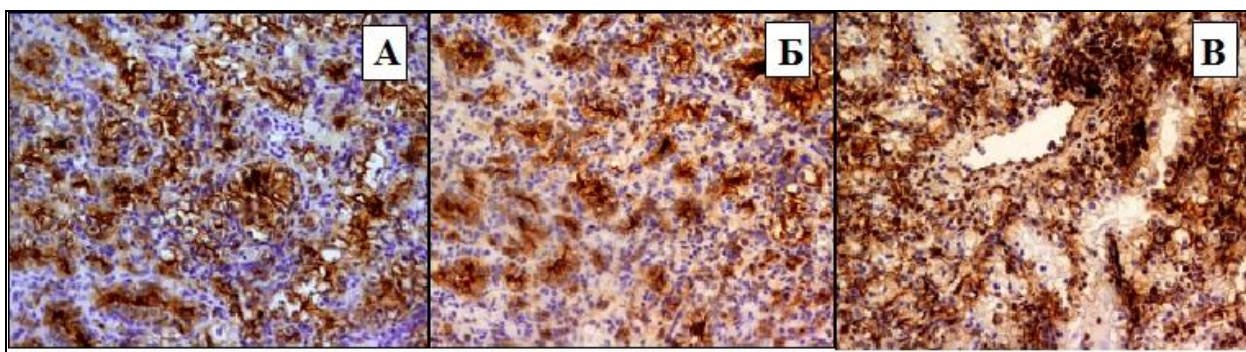


Рисунок 4. Результаты иммуногистохимического исследования образцов папиллярного ПКР. А. Выраженная экспрессия СК-7 опухолевыми клетками. X100. Б. Выраженная экспрессия виментина опухолевыми клетками. X200. В. Выраженная экспрессия CD10 опухолевыми клетками. X100.

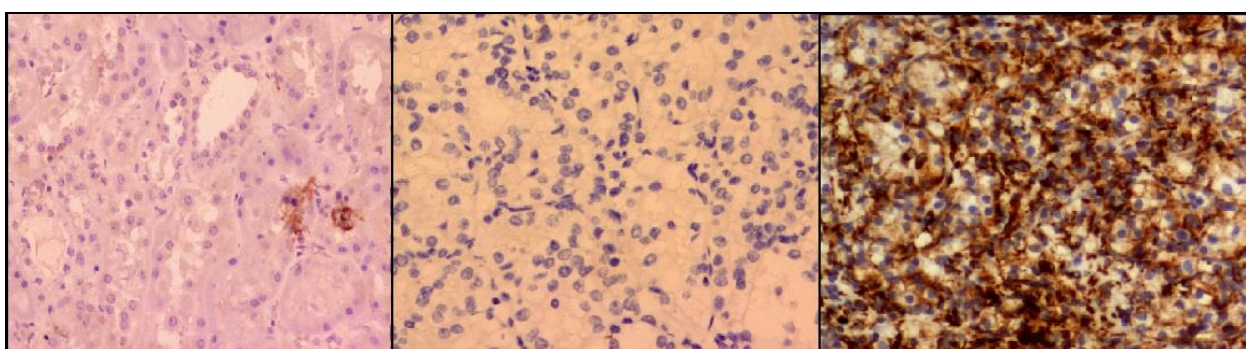


Рисунок 7. Результаты иммуногистохимического исследования образца хромофобного ПКР. А. Отсутствие экспрессии СК-7 опухолевыми клетками. X200. Б. Отсутствие экспрессии виментина опухолевыми клетками. X400. В. Выраженная экспрессия СК-7 опухолевыми клетками. X200.

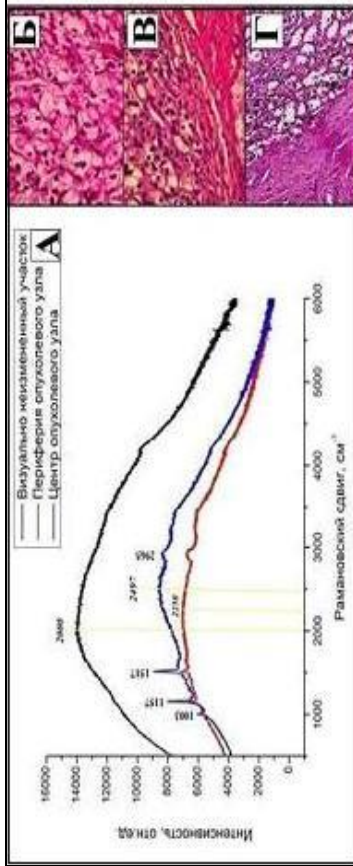


Рисунок 1. Сводный результат исследования светлоклеточного ПКР

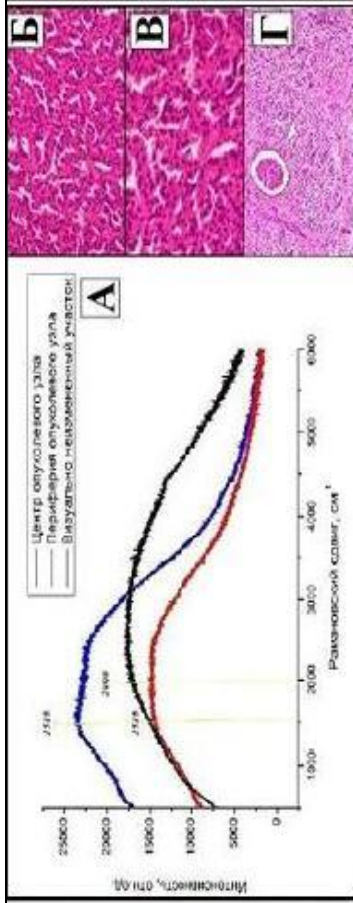


Рисунок 5. Сводный результат исследования образца папиллярного ПКР 1 типа

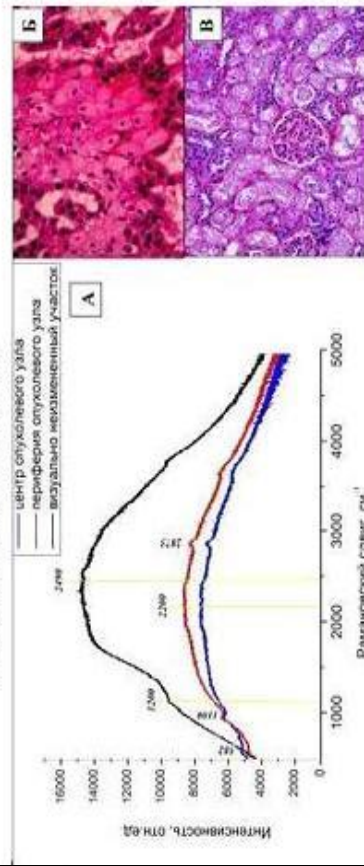


Рисунок 6. Сводный результат исследования образца папиллярного ПКР 2 типа

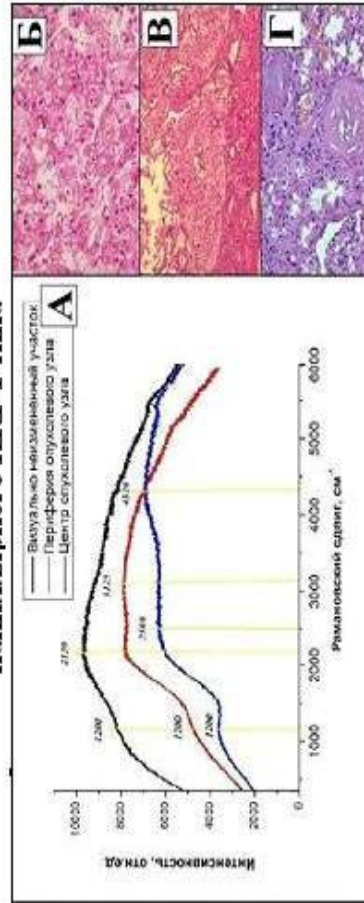


Рисунок 8. Сводный результат исследования образца хромофобного ПКР классического типа

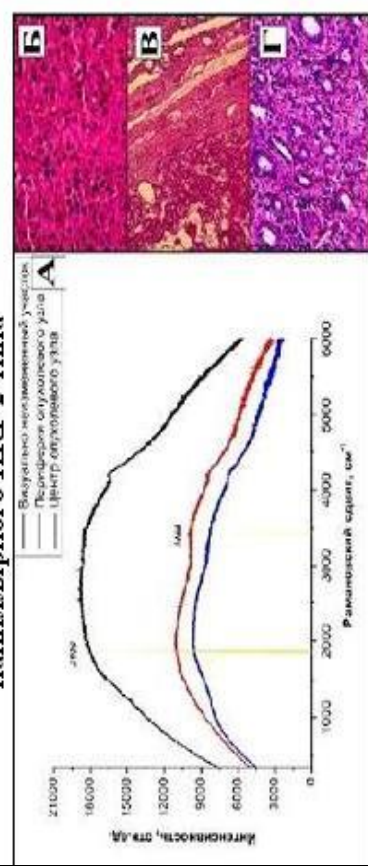


Рисунок 9. Сводный результат исследования образца хромофобного ПКР эозинофильного типа

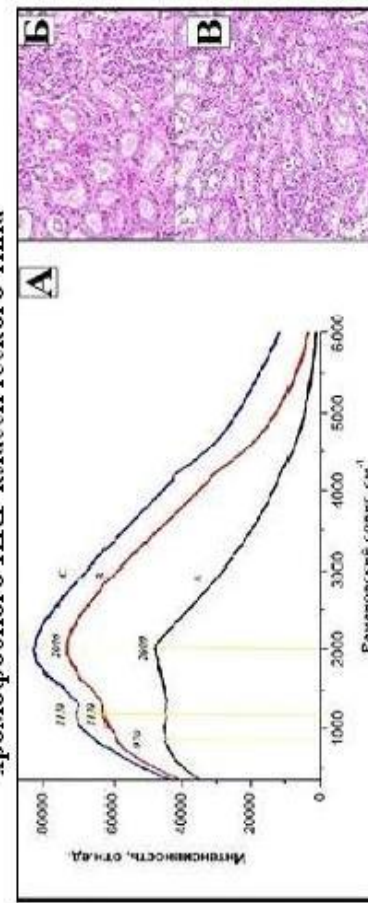


Рисунок 10. Сводный результат исследования образца из группы контроля из нескольких участков

В зависимости от наличия и вариабельности вышеперечисленных признаков все случаи светлоклеточного ПКР были распределены согласно общепринятой шкале градаций S.A.Fuhrman на четыре степени (G1 – 19 (23,3%), G2 – 33 (49,2%), G3 – 10 (14,92%), G4 – 5 (7,46%)) и гистологические характеристики сопоставлены с результатами, полученным в ходе раман-флуоресцентной спектроскопии. Наибольшая интенсивность пиков рамановского рассеяния отмечена у образцов светлоклеточного рака с высокой степенью дифференцировки, что соответствовало степени G1 согласно шкале градаций Фурмана. Кроме того, рамановские пики 582 см^{-1} , 2977 см^{-1} (холестерин) вообще не встречался в спектрах образцов светлоклеточного рака со степенью дифференцировки G2-4 ($p < 0.05$). Соотношения степени дифференцировки опухоли и интенсивности рамановского рассеяния пиков молекул фенилаланина, в-каротина и холестерина отражены в диаграмме 1. В образцах умереннодифференцированного (G2), низкодифференцированного (G3) и недифференцированного (G4) светлоклеточного ПКР значения интенсивности рамановского рассеяния имели стойкую тенденцию к снижению по всем показателям по мере уменьшения дифференцировки опухоли и достигали минимума к G4 степени ($p < 0,001$).

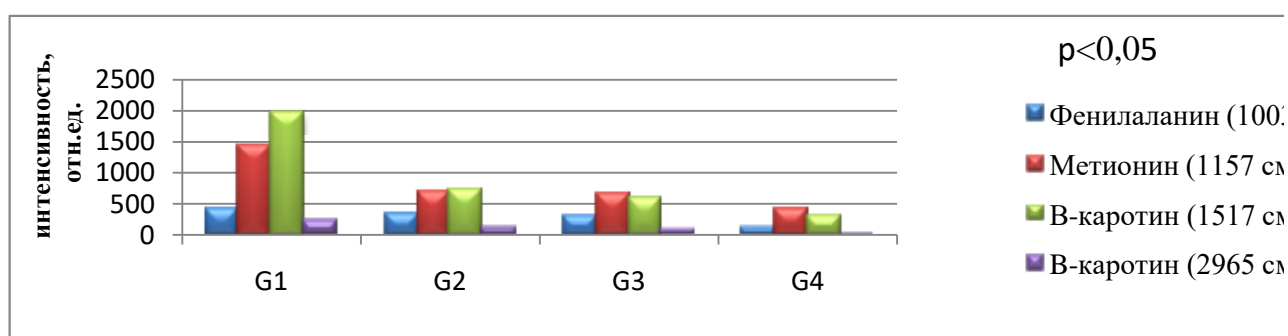


Диаграмма 1. Уровень интенсивности рамановских пиков в зависимости от степени дифференцировки светлоклеточного ПКР

Результаты гистологического исследования подтвердили с помощью иммуногистохимического анализа с использованием антител к виментину, цитокератину (СК-7) и CD 10. Во всех случаях светлоклеточного рака наблюдали выраженную положительную экспрессию виментина и CD 10 и отсутствие реакции с СК-7 ($p < 0,05$) (Рис. 2).

Кроме того, учитывая значительную частоту возникновения вторичных изменений при светлоклеточном раке, были изучены раман-флуоресцентные спектры, соответствующие участкам некроза, кровоизлияний, а также полям склероза. В первом случае для спектра оказалась типичной некоторая «нечеткость», «размытость» его линии, по-видимому, связанная с деструкцией ткани опухоли, поэтому и начальная интенсивность характеризовалась довольно низкими значениями. Умеренные показатели оказались характерными и для локальных

максимумов флуоресценции (Рис. 3). В случае попадания лазерного луча на участок более или менее выраженной стромы опухоли или поле склероза в интерстиции или паренхиме почки спектр имел характерную одногорбую конфигурацию и характеризовался высокими показателями интенсивности как начальной флуоресценции, так и её локального максимума за счет суммарной флуоресценции липопигментов и флавинов. Фокусу кровоизлияния в опухолевом узле была свойственна неправильная трех- четырехгорбая или причудливая бесформенная линия раман-флуоресцентного спектра. Локальным максимумам суммарной флуоресценции соответствовали нетипично высокие значения интенсивности флуоресценции, а их положение, как правило, было искаженным (Рис.2.)

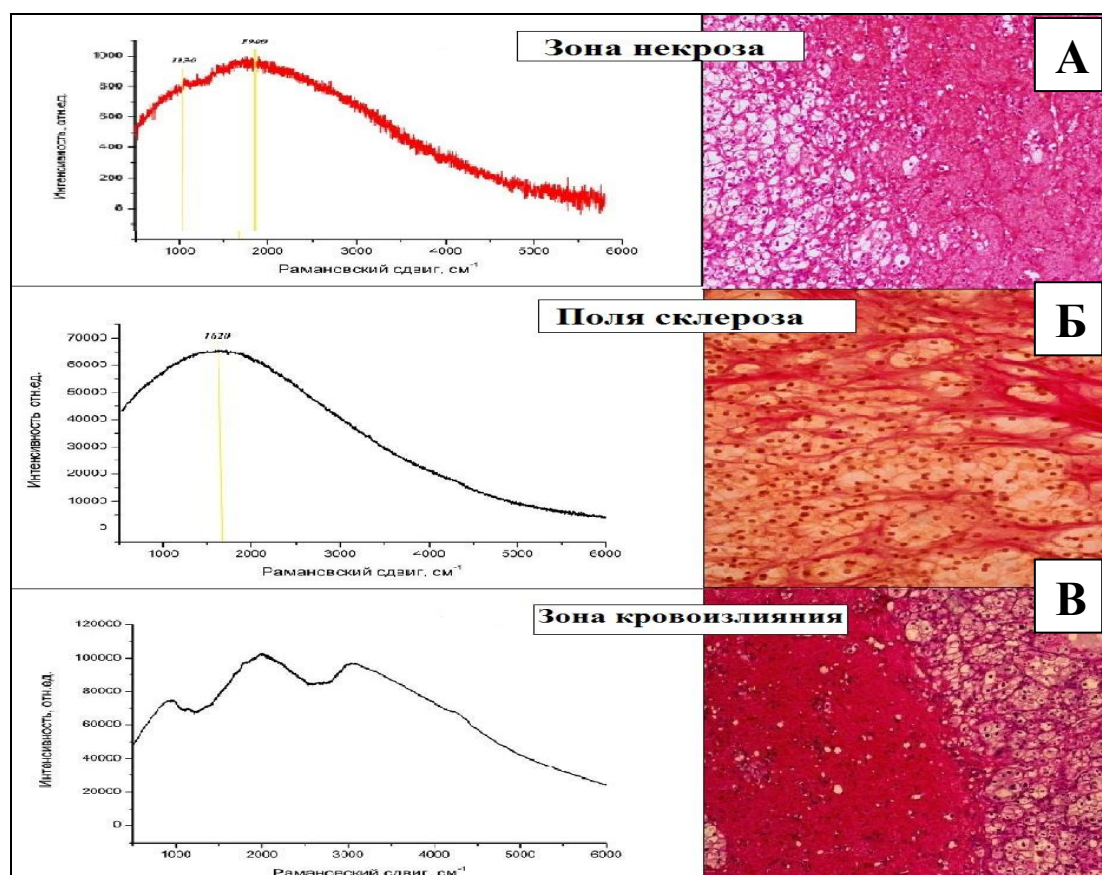


Рисунок 3. Спектральная и морфологическая картина вторичных изменений и участков склероза образца светлоклеточного ПКР. А. и В.- Ок. гем. и эоз. х200. Б. – Ок. Пикрофуксин по ван Гизону, х200.

При исследовании участков ткани почек, находящихся на максимальном удалении от опухолевого узла и визуально интактных, на светооптическом уровне наблюдали изменения, касающиеся преимущественно канальцевых структур нефронов (вакуольная дистрофия, атрофические и некробиотические изменения). В отдельных клубочках отмечали проявления фокального или тотального гломерулосклероза, либо умеренного гиалиноза капиллярных петлей. В интерстициальном пространстве почки практически во всех случаях обнаруживали

участки разрастания соединительной ткани различной степени выраженности от умеренного сетчатого до крупноочагового склероза, а также лимфогистиоцитарную инфильтрацию. Наряду с измененными отмечали участки, лишённые вышеописанных признаков, и соответствующие неизменной паренхиме почки. Спектральные особенности данных образцов ткани характеризовались, с одной стороны, отсутствием рамановских пиков и, с другой стороны, еще большим снижением локального максимума флуоресценции ($2000 \pm 28,6 \text{ см}^{-1}$), обусловленного флуоресценцией эндогенных порфиринов, свойственных опухолевым узлам (Рис.1Г). Еще одной характерной особенностью спектральной картины визуально неизменной ткани почки были различия спектров, регистрируемых с полей склероза и участков неизменной паренхимы. Они существенно отличались друг от друга как количеством, так и положением локальных максимумов в спектре флуоресценции. Сводный результат спектроскопического исследования образца светлоклеточного ПКР показан на рисунке 1.

Анализируя результаты морфологического и спектроскопического исследований светлоклеточного ПКР можно сделать вывод о том, что появление пиков и идентификация фенилаланина, метионина и в-каротинов на спектре объясняется усилением синтеза как онкобелков, так и свойственных опухолевым клеткам эмбиональных белков, происходящего в опухолевом узле. Каротины, напротив, не принимают участия в формировании опухолевых и эмбриональных белков, являясь пигментами и провитаминами, и подвергаются метаболизму в печени с образованием активных форм витамина А. Что касается экскреции каротинов, то последняя является, в основном, прерогативой почек, а в условиях развития в одной из них опухоли, резко затрудняется и сопровождается повышением их концентрации в паренхиме почки, что и регистрируется спектроскопически.

*Результаты иммунофологического и спектроскопического исследований образцов
папиллярного почечноклеточного рака*

В отличие от светлоклеточных форм рака почки опухолевый узел макроскопически имел нечеткие неровные границы, диаметр его варьировал от 1,0 до 4,8 сантиметров. Гистологическая картина в 7 случаях соответствовала 1 типу папиллярного рака и характеризовалась наличием множественных сосочковых структур, образованных некрупными компактно расположенными клетками, большинство из которых содержали мелкие ядра и наличием единичных ксантомных клеток. При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к виментину, СК-7 и CD10 в 7 случаях (70%) было выявлено выраженная положительная экспрессия всех трех маркеров и лишь в трех случаях (30%) экспрессия маркера CD10 соответствовала умеренно положительной ($p < 0,05$) (Рис.4).

Раман-флуоресцентное спектроскопическое исследование образца из центральной части опухолевого узла выявило две особенности спектров этого типа рака. С одной стороны, максимум флуоресценции наблюдался на частоте рамановского сдвига, соответствующей 1510 см^{-1} , что соответствовало суммарной флуоресценции липопигментов и флавинов, с другой стороны, рамановские пики, столь характерные для светлоклеточного рака, отсутствовали (рис.5А.)

Другая особенность этой формы была выявлена при исследовании образца, полученного из периферической части опухоли, и выражалась в почти полном сходстве как патогистологической, так и раман-спектроскопической характеристик (рис. 5А) за исключением того обстоятельства, что по шкале интенсивности относительных единиц флуоресценции центру опухоли соответствовали более высокие ($22575+1227,7$) по сравнению с периферией опухоли ($15250+372,68$) значения, как локального максимума, так и инициальной флуоресценции – $17570+1345,6$ и $9050+407,1$ соответственно.

Образцы папиллярного рака, отнесенного ко второму гистологическому типу характеризовались выраженным как морфологическим, так и спектроскопическим разнообразием. Образец, полученный из центра опухолевого узла, содержал ткань опухоли, представленную сочетанием бесформенных скоплений и компактных гнёзд крупных клеток с яркой эозинофильной цитоплазмой и тубулярно-сосочковых структур, сформированных мелкими клетками. Рамановская спектроскопия выявила несколько рамановских пиков, соответствовавших колебаниям молекул гидроксильного радикала (582 см^{-1}), комплекса жирных кислот (1100 см^{-1}) и идентифицировала углеводородную связь липидов и белков на частоте рамановского сдвига 2873 см^{-1} . При этом максимум флуоресценции соответствовал частоте в $2200+2,52 \text{ см}^{-1}$ и был обусловлен флуоресценцией эндогенных порфиринов (рис. 6А.). Исследование периферии опухолевого узла выявило еще большую гетерогенность морфологических проявлений опухоли, расцененную нами, как возможное сочетание двух гистологических типов папиллярного рака. Что касается спектральных характеристик опухоли, то они соответствовали центральному и по наличию рамановских пиков, и по их качественным характеристикам, а также по частоте рамановского сдвига и шкале интенсивности относительных единиц (рис. 6А).

При изучении участка ткани почки, находящегося на максимальном удалении от основного опухолевого узла, структурно-функциональные элементы нефрона выглядели относительно сохранными, и лишь в эпителии проксимальных и дистальных извитых канальцев наблюдали признаки гидропической дистрофии и фокального некроза. Раман-флуоресцентный спектр, напротив, имел особенности в виде наличия двух локальных максимумов

флуоресценции, соответствующих суммарной флуоресценции липопигментов и флавинов (1200 см^{-1}) и флуоресценции эндогенных порфиринов на совершенной иной частоте рамановского сдвига (2490 см^{-1}) (рис. 6Б).

Результаты иммуноморфологического и спектроскопического исследований образцов хромофобного почечно-клеточного рака

В 4 случаях классического варианта хромофобного рака опухоль была построена из крупных округлых или полигональных клеток с бледной плохо прокрашиваемой цитоплазмой и четкими, хорошо выраженными клеточными мембранами и внутриклеточными перегородками, а также клеток меньших размеров, располагающихся беспорядочно. Результаты иммуногистохимического исследования определили отрицательную экспрессию маркеров CD10 и виментина во всех 8 случаях и умеренно положительную экспрессию СК-7, что также подтверждает диагноз хромофобного ПКР, поставленный патогистологически ($p < 0,05$) (Рис.7). Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий центральной части опухолевого узла характеризовался отсутствием рамановских пиков и наличием сразу трёх локальных максимумов флуоресценции в точках рамановского сдвига 1200 см^{-1} , обусловленной суммарной флуоресценцией липопигментов и флавинов, и в точках 2500 см^{-1} и 4310 см^{-1} , связанной с флуоресценцией эндогенных порфиринов (Рис. 5). Периферическая часть опухолевого узла спектроскопически характеризовалась началом флуоресценции $2500+15,95$ отн. ед., локальный максимум флуоресценции липопигментов и флавинов соответствовал центроузловому, Что касается максимума флуоресценции эндогенных порфиринов, то он также, как и в центре узла имел два значения, но существенно отличавшихся от центроузловых ($2130+17,24\text{ см}^{-1}$ и $3125+49,74\text{ см}^{-1}$). При исследовании визуально неизмененного участка почечной ткани, максимально удаленного от узла опухоли, наблюдали умеренно выраженные явления гидронефроза, дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных канальцев, единичные гиалинизированные клубочки и мелкие артериолы, очаговый склероз и лимфогистиоцитарную инфильтрацию интерстициального пространства. Раман-флуоресцентное исследование зарегистрировало относительно высокие значения начальной флуоресценции (5000 отн. ед.) и локальные максимумы флуоресценции в точках рамановского сдвига $1200\pm 11,32\text{ см}^{-1}$ и $2130+19,14\text{ см}^{-1}$, обусловленные флуоресценцией липидов и флавинов и эндогенных порфиринов соответственно (Рис. 8).

Эозинофильный вариант хромофобного почечно-клеточного рака при гистологическом исследовании характеризовался значительным преобладанием клеточной паренхиматозной составляющей над стромальной. Опухоль состояла из разнообразных клеток с яркой

эозинофильной цитоплазмой (Рис. 9Б), причем данная особенность оказалась свойственной как центральному, так и периферическому участку. Раман-флуоресцентные спектры центральных и периферических участков опухолевого узла оказались полностью идентичными по всем показателям: начальной интенсивности флуоресценции, локальным максимумам флуоресценции и их значениям в точках рамановского сдвига. (Рис.9А). Спектр участка интактной ткани почки, находящегося на максимальном удалении от опухолевого узла, отличался значением начальной флуоресценции и наличием только одного локального максимума флуоресценции (Рис.9А).

Результаты морфологического и спектроскопического исследований образцов контрольной группы.

Образцы ткани почек контрольной группы были получены у лиц, причина смерти которых была не связана с почечной патологией. Отсутствие патологии почек было подтверждено при жизни больных как клиническими данными, так и лабораторными исследованиями, предусмотренными Стандартами обследования и лечения больных с соответствующей патологией. Гистологически во всех исследованных случаях признаков патологии на светооптическом уровне обнаружено не было (Рис. 10Б, 10В). Спектроскопически образцы почек контрольной группы характеризовались выраженной «двугорбой» формой спектра, свойственной нормальным неповрежденным тканям. Показатели начальной флуоресценции соответствовали высоким значениям интенсивности и располагались в промежутке от 36000 до 42000 относительных единиц по оси интенсивности. Локальные максимумы флуоресценции, обусловленные суммарной флуоресценцией липопигментов и флавинов и эндогенных порфиринов характеризовались относительно невысокими значениями ($970+9,42 \text{ см}^{-1}$, $1130+10,25 \text{ см}^{-1}$ и $2000+13,54 \text{ см}^{-1}$ соответственно) (Рис. 10А).

Анализ эффективности раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике почечно-клеточного рака.

Анализ эффективности раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике почечноклеточного рака оценивали с помощью метода проекций на латентные структуры с последующим дискриминантным анализом (PLS-DA). В результате проведения PLS-DA была построена аналитическая модель, согласно которой было осуществлено разделение раман-флуоресцентных спектров образцов группы контроля и образцов рака почки на категории «рак» и «норма» (Рис. 11). Точность разделения составила 95,3%, при этом чувствительность и специфичность метода составили 89,2% и 100%, соответственно. Сходство некоторых спектров

различных вариантов почечноклеточного рака обусловлено общностью их конфигурации, связанной с воздействием лазерного луча на участки стромы или сосудистых стенок, которые во всех тканях имеют общие структурные компоненты.

Результаты сопоставления спектроскопических характеристик трех наиболее часто встречающихся форм почечноклеточного рака показали, что каждый из них характеризуется определенным набором показателей: количество и положение локальных максимумов флуоресценции, значение интенсивности флуоресценции, инициальной, максимальной и остаточной, наличие и расположение пиков рамановского рассеяния, что зависит от составных компонентов опухолевых клеток при том или ином варианте рака, а также их концентрации. Однако данные особенности характерны лишь для «специфического» паренхиматозного компонента опухолевого узла. Стромальный компонент опухоли, морфологически более однородный у большинства опухолей, на спектре характеризовался единичным локальным максимумом флуоресценции и отсутствием рамановских пиков рассеяния. Кроме того, частое развитие в опухоли вторичных изменений в виде некроза, кровоизлияний, ослизнений также «искажает» специфические характеристики опухолевой ткани, что было продемонстрировано на примере светлоклеточного варианта ПКР. Принимая во внимание небольшую площадь, занимаемую лазерном лучом, необходимым условием является обязательная регистрация спектров из нескольких участков опухолевого узла.

В ходе нашего исследования были выявлены дополнительные возможности диагностического метода раман-флуоресцентной спектроскопии. Метод, обладая высокой чувствительностью и специфичностью в обнаружении рака почки, позволяет диагностировать не только его гистологический тип, но его разновидности, а также степень дифференцировки. С помощью раман-флуоресцентной спектроскопии оказалось возможным определить как специфические признаки паренхиматозного компонента опухоли, так и неспецифические особенности присущие строме опухолевого узла, а также вторичные изменения, что также повышает её диагностическую ценность. Кроме того, с помощью данного метода стало возможным определить биохимические изменения, происходящие при изучаемой патологии и оценить их роль и значение в патогенезе рака почки. К несомненным преимуществам метода также относится возможность получения результатов в режиме реального времени в течение нескольких минут, что раскрывает перспективы его последующего применения в интраоперационной диагностике рака почки, особенно с целью исключения, так называемых «положительных» краев резекции образования. Учитывая, что гистологическая классификация опухолей почек в настоящее время включает более 50 вариантов, в том числе редкие наследственные формы, спектральные характеристики большинства из которых еще не

изучены, морфологическое исследование по-прежнему остается ключевым для установления окончательного диагноза.

ВЫВОДЫ

1. Раман-флуоресцентная спектроскопия является эффективным методом диагностики почечноклеточного рака, позволяющим идентифицировать как опухоль, так и неизмененную ткань почки с точностью разделения до 95,3%, при этом чувствительность и специфичность метода составляют 89,2% и 100%, соответственно, открывая перспективу его использования не только в лабораторных условиях, но и на до- и интраоперационном этапах диагностики.
2. На основании сравнительного анализа данных раман-флуоресцентной спектроскопии с результатами патоморфологического исследования были выделены специфические «оптические маркеры» и показатели для самых частых вариантов почечноклеточного рака: начальная (инициальная) флуоресценция, локальные максимумы флуоресценции, пики рамановского рассеяния и значения остаточной флуоресценции.
3. При светлоклеточном варианте рака почки специфические «оптические маркеры» выявляли в виде набора пиков рамановского рассеяния в точках 1003см^{-1} (фенилаланин), 1157см^{-1} (метионин), 1517см^{-1} и 2965см^{-1} (различные модификации бета-каротина), что свидетельствует о повышении концентраций данных веществ по сравнению с группой контроля и специфических изменениях клеточного метаболизма в опухоли.
4. Папиллярный вариант почечноклеточного рака в зависимости от морфологического варианта характеризуется различной конфигурацией спектров. Для папиллярного рака 1 типа характерно максимальное значение интенсивности флуоресценции в точке $1510+17,34\text{см}^{-1}$ и отсутствие рамановских пиков. Папиллярный рак 2-го типа обладает пиками рамановского рассеяния в точках 582см^{-1} (гидроксильный радикал), 1100см^{-1} (жирные кислоты), 2873см^{-1} (СН-связь липидов и белков), а также одиночным локальным максимумом в точке $2200+25,21\text{см}^{-1}$.
5. Хромофобный вариант почечно-клеточного рака (классический тип) характеризуется множеством локальных максимумов в точках $1200+11,32\text{см}^{-1}$, $2130+17,24\text{см}^{-1}$, $3125+49,74\text{см}^{-1}$, и невысокой интенсивностью флуоресценции (7-10 тыс. отн.ед.). Эозинофильный его тип отличается значениями локальных максимумов флуоресценции ($1920+21,52\text{см}^{-1}$ и $3460+31,87\text{см}^{-1}$) и значительной интенсивностью его флуоресценции (10-15 тыс. отн.ед.).
6. Спектральные характеристики могут изменяться в зависимости от степени дифференцировки опухоли и точки измерения. Опухоли с неоднородным строением и наличием в них вторичных изменений, характеризуются несколькими видами спектров,

отражающими как их специфический (паренхиматозный) и мезенхимальный компоненты, так вторичные изменения (некроз, кровоизлияния). Высота пиков рамановского рассеяния находится в прямой пропорциональной зависимости от степени дифференцировки опухоли.

7. Учитывая неоднородность строения опухолевого узла, имея в виду сочетание паренхиматозной и стромальной составляющих, а также частых вторичных изменений, с целью исключения ложноположительных и ложноотрицательных заключений необходимым условием адекватной диагностики рака почки является анализ спектральных характеристик, полученных из разных участков опухолевого узла.

Практические рекомендации

Пациентам с подозрением на почечноклеточный рак, рекомендуется проводить диагностический поиск во время проведения биопсии или операционного вмешательства с использованием портативного раман-флуоресцентного спектроскопа, сопряженного с портативным компьютером с целью ориентировочного определения морфологической разновидности опухоли, а также максимально точно определить края резекции.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Александров Н.С.**, Авраамова С.Т., Кириллов Ю.А., Кукушкин В.И. Опыт использования раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике ангиомиолипомы почки // **Лазерная медицина**. -Т.20,- выпуск 3,- М.:- 2016,- с. 42.
2. **Aleksandrov N. S.**, Kirillov U. A., AvraamovaS. T. The study of the Application of Laser spectroscopy in the Diagnosis of clear cell carcinoma of Kidney Cancer//Annual International Conference on Research, Education and Teaching by Russian Academics, 16-19 May 2016, Athens, Greece. P.15-17.
3. **Aleksandrov N.S.**, Avraamova S, Kirillov U.,Poluectov U.Application of Raman-fluorescence spectroscopy for diagnosis of kidney cancer//VirchowsArchiv. XXXI International Congress of the IAP and 28th Congress of the ESP. 2016.P. - S224.
4. **Александров Н. С.**, Авраамова С. Т., Бабичева Т.О., Кириллов Ю. А., Кукушкин В. И.Современные технологии дооперационной диагностики опухолей почек//**Медицинская наука и образование Урала**. -№1.-2017.-С.136-141.
5. **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».- №4(24)-2017.-С. 59-66.

6. Авраамова С. Т., Александров Н.С., Бабичева Т.О., Кириллов Ю. А., Кукушкин В. И. Возможности применения рамановской спектроскопии в онкоурологии//Пространство и время.-№1.-2017.- С. 247-251

7. Александров Н.С., Авраамова С.Т., Кириллов Ю.А. Применение лазерной спектроскопии в диагностике рака почки //Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов./М.-2017.-С.17

8. Лыкина А.А., Артемьев Д.Н., Кукушкин В.И., Братченко И.А., Александров Н.С., Захаров В.П. Рамановская спектроскопия для исследования тканей почек и ее патологических образований//Сборник трудов ИТНТ-2018/Самара.-2018.-С. 233-238.

9. Александров Н.С., Авраамова С.Т., Кириллов Ю.А., Безруков Е.А., Кондрашина А.В., Кукушкин В.И. Перспективы использования раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике почечно-клеточного рака//**Вопросы урологии и андрологии.** -№4.-Т.6.-2018.- С.43-49.

10. A.A.Lykina, D.N. Artemyev, V.I.Kukushkin, I. A.Bratchenko, **N.S. Aleksandrov**, V.P. Zakharov. Raman spectroscopy for kidney tissue and its neoplasms research [Электронный ресурс] / Journal of Physics: Conf. Series 1096. (2019) 012116. P. 1-6. – Режим доступа: URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1096/1/012116/meta>

Список сокращений:

ПКР – почечно-клеточный рак

Отн.ед. – относительные единицы

См⁻¹ – обратный сантиметр

TNM - аббревиатура от Tumor, Nodus и Metastasis

Ок. гем. и эоз. – окрашивание гематоксилином и эозином

CCD– charge-coupled device (ПЗС-матрица (Прибор с зарядовой связью))

PLS-DA - Partial least squares - Discriminant Analysis (метод дискриминантного анализа с помощью проекции на латентные структуры)