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

Александров Николай Сергеевич

Сравнительная иммуноморфологическая и спектроскопическая характеристика опухолей почек

14.03.02 – Патологическая анатомия

диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
доцент
Кириллов Ю.А

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение ……. 4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Современный алгоритм дооперационной диагностики опухолей почек …….. 9

1.1. Инструментальные методы диагностики опухолей почек …….. 9

1.2. Морфологические методы исследования опухолей почек …… .13

1.3. Современные возможности рамановской спектроскопии в диагностике онкологических заболеваний …….. .20

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ……. 28

2.1. Материал исследования …….28

2.2. Гистологический метод исследования …….. 30

2.3. Гистохимический метод исследования ……. 30

2.4. Иммуногистохимический метод исследования ……31

2.5. Раман-флуоресцентная спектроскопия ……32

2.6. Статистические методы исследования ……..35

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ …..... 36

3.1. Результаты иммуноморфологического и спектроскопического исследований образцов светлоклеточного почечно-клеточного рака .. 36

3.2. Результаты иммуноморфологического и спектроскопического исследований образцов папиллярного почечно-клеточного рака…….. 51

3.3. Результаты иммуноморфологического и спектроскопического исследований образцов хромофобного почечно-клеточного рака …… 61

3.4. Результаты морфологического и спектроскопического исследований образцов контрольной группы ……67

3.5. Анализ эффективности раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике почечно-клеточного рака …….. 69

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ …… 71

ВЫВОДЫ ……... 83

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ …….. 84

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ …… 86

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

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% [5] при безусловном доминировании злокачественных вариантов опухолей в этой группе [16]. 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 [110]. 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 [98]. 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 [34]. 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 доброкачественных и 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 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 конференция «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.

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- оригинальных, 2- обзорных) в журналах, рекомендованных ВАК, и 3 публикации в зарубежных изданиях.

Объем и структура исследования

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Современный алгоритм дооперационной диагностики опухолей почек

1.1. Инструментальные методы диагностики опухолей почек

В настоящее время медицина располагает множеством различных методов и технологий, позволяющих с большей или меньшей долей вероятности диагностировать объёмные патологические образования почек, к числу которых относятся опухолевые и опухолеподобные заболевания и патологические состояния. Применение и использование этих диагностических методов и приемов осуществляется в строгом соответствии со стандартами диагностики и лечения больных с данным видом патологии, утвержденными в установленном порядке Минздравом Российской Федерации и территориальными органами управления здравоохранением.

Основным инструментальным методом дооперационной диагностики опухолей почки до настоящего времени продолжает оставаться ультразвуковое исследование органов брюшной полости (УЗИ) [4, 7]. Ультразвуковое исследование позволяет идентифицировать в почке фокус тканевой акустической плотности, с большой долей вероятности свидетельствующий о наличии опухоли, а в сочетании с изменением контура почки, наличием гипоэхогенных участков, свидетельствующих о развитии вторичных изменений в узле (некроз, распад) - существование опухоли можно считать доказанным [31]. Однако в случаях развития в почке простых единичных или множественных кист или поликистоза, которые часто осложняются кровотечением или инфицированием, акустическая способность последних может изменяться и иметь сходные характеристики с кистозным раком. Помимо реализации дифференциально-диагностических возможностей, ультразвуковое исследование позволяет оценить наличие или отсутствие обструкции мочевыводящих путей, степень расширения чашечно-

лоханочной системы органа, состояние прилежащих к почкам тканей [26]. К существенным недостаткам метода относится его низкая чувствительность в обнаружении опухолей размером менее 2 см в диаметре [43]. Обычно эффективность исследования в таких случаях не превышает 70% [89], что является обстоятельством, снижающим диагностическую ценность метода.

Рентгенологические методы исследования (обзорная рентгенография, экскреторная урография и ангиография) позволяют оценивать функциональное состояние пораженной почечной карциномой и контралатеральной почек. При обзорной рентгенографии, как правило, можно наблюдать изменения контура поврежденной опухолью почки за счет выбухания опухолевого образования или, наоборот, появление зоны инвагинации в соседних с опухолью участках. Этот метод также позволяет выявить очаги кальцификации, нередко локализующиеся в злокачественных опухолях [26].

Признаками опухоли почки, выявляемыми при ангиографическом исследовании, являются, во-первых, изменение калибра почечной артерии с пораженной стороны, во-вторых, наблюдаемое здесь же изменение сосудистого рисунка в виде появления участков повышенной или пониженной васкуляризации, в-третьих, качественное изменение ангиоархитектоники в опухолевом узле в виде истончения сосудов и образования микроаневризм, что проявляется наличием беспорядочных скоплений рентгенконтрастного вещества в виде своеобразных «лужиц» [48]. Ангиография нередко может выступать в качестве метода выбора для определения органопринадлежности опухоли в случаях распространения её на прилежащие ткани и органы с образованием единого опухолевого конгломерата. Информативность метода в этих случаях может составлять 90-97% [24, 47]. Ключевым признаком наличия опухолевого процесса в почке, выявляемого при экскреторной урографии, является дефект наполнения лоханки и/или чашечек, изменение их расположения и конфигурации (смещение, укорочение, деформация, расширение), а нередко и их полное

исчезновение, наблюдаемое на урограмме [26]. Вместе с тем, в настоящее время экскреторная урография используется не столь часто, как ранее, в связи с малоинформативностью метода, особенно проявляющейся при небольших размерах опухолевого узла. Так, при опухоли диаметром менее 1 см — точность диагностики составляет лишь 10%, от 1 до 2 см — 21%, от 2 до 3 см — 52 %, и свыше 3 см — 85% [37]. Кроме того, метод не позволяет определить морфологическую характеристику объемного образования — опухоль, абсцесс, кисты и другие процессы, особенно при их экстраренальном расположении [33].

По сравнению с предыдущими визуальными методами диагностики, компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) обладают наибольшей информативностью. На компьютерных томограммах и МРТ-изображениях рак почки обычно имеет вид мягкотканного узла, располагающегося в корковом слое и деформирующего его. В случаях сочетания КТ и внутрисосудистого контрастирования становится возможным более точно определить размеры опухоли и ее принадлежность к паренхиме или чашечно-лоханочной системе, а также предположить гистологический тип новообразования [43]. Эффект контрастного усиления проявляется вследствие различного кровоснабжения опухоли и неповрежденных опухолью тканей, что обуславливает различный уровень их контрастирования, регистрируемый на КТ-изображениях. Так, опухоли, плотность которых после введения контрастного вещества быстро повышается, являются по своей ангиоархитектонике гиперваскулярными, и по своему гистологическому строению чаще всего соответствуют светлоклеточному раку, и, наоборот, сравнительно медленное накопление контрастного вещества характерно для других гистологических типов рака почки [102]. Появление трехмерных реконструкций при КТ сканировании почек расширило возможности метода, благодаря чему стало возможным оценить пространственную локализацию, распространенность, сосудистую архитектонику опухоли, наличие и степень венозной инвазии, вовлечение в

процесс регионарных лимфатических узлов и состояние мочевыводящих путей. Полученная при использовании метода КТ и сканировании информация способствует выбору оптимальной тактики оперативного вмешательства [6, 57].

Метод МРТ чаще всего применяется в случае первичного локального местонахождения опухоли с целью определения ее возможного прорастания в соседние анатомические структуры, а также при наличии подозрений на формирование опухолевых тромбов в почечной или нижней полой вене. Кроме того, МРТ применяется в тех случаях, когда использование КТ не представляется возможным (аллергическая реакция на контрастное вещество, почечная недостаточность) [1, 2]. По сравнению с компьютерной томографией, МРТ, обладая большими возможностями и разрешающими способностями, позволяет идентифицировать опухоли небольшого (менее 1,0 см) диаметра, расположенные внутри паренхимы почки [11, 26]. На сегодняшний день МРТ является методом выбора в диагностике опухолевого тромба и определения его верхней границы при непрекращающемся росте последнего [117].

К сожалению, вышеописанные методы не лишены ряда недостатков, безусловно снижающих их диагностическую ценность и ограничивающих применение. К их числу относятся: малая информативность в определении опухолей при их локализации на передней или задней поверхностях почки; существование трудности в дифференциации между опухолями и различными очаговыми поражениями почек неопухолевого характера (врожденные и приобретенные кисты, абсцессы, карбункулы, инфаркты и др.); отсутствие сведений о предполагаемой стадии опухолевого процесса и морфологических характеристиках объемного образования почки [114].

1.2. Морфологические методы исследования опухолей почек

В современной морфологии для гистологического исследования биоптата почечной ткани, подозрительного на опухоль, гистохимическое исследование проводится далеко не всегда. Однако, учитывая особенности сочетания и распределения структурных стромальных и паренхиматозных компонентов, входящих в состав опухолевой ткани, нарушение их соотношения, разнообразие и полиморфизм последних, в настоящее время ведется дискуссия о целесообразности включения гистохимического исследования в стандарт исследования биоптата почечной ткани с данной патологией. Гораздо большее внимание уделяется исследованию прогностических маркеров, экспрессируемых клетками большинства опухолей почки и ПКР, в частности, поэтому частым условием их морфологической диагностики, а в сложных случаях, как правило, является проведение иммуногистохимического исследования биоптата почечной ткани [100].

Экспрессия маркера ki-67, зарекомендовавшего себя в качестве маркера пролиферации многих злокачественных новообразований [18], в большинстве случаев опухолей почек имеет сравнительно низкие значения [36, 72]. ПКР также характеризуется относительно невысоким уровнем экспрессии данного маркера, за исключением случаев папиллярного ПКР 2 типа, при котором его положительная экспрессия отмечается более чем в 60% случаев [12, 32] и прямо пропорциональна размерам опухолевого узла и степени его дифференцировки [51, 97]. Кроме того, высокие показатели индекса пролиферации Ki-67 считаются неблагоприятным прогностическим фактором возникновения отдаленных метастазов при ПКР и коррелируют с показателями общей выживаемости [15] . В работе Черданцевой Т.М., 2014, отмечено, что в группе больных с низкой экспрессией данного маркера регионарные и отдаленные метастазы не были обнаружены ни у одного из пациентов, а в группе с высокой степенью пролиферативной активности

обнаружены в 36,4% случаев [49].

Другой маркер пролиферации – ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) также применяется в качестве прогностического маркера, повышение экспрессии которого выше 5% позволяет предположить снижение пятилетней выживаемости больных с ПКР [17, 23]. Однако, работы, посвящённые изучению данного маркера в качестве своеобразного показателя пролиферативной активности ПКР, отмечают низкую селективность экспрессирующих его клеток [45]. В многочисленных исследованиях, посвященных изучению морфогенеза опухолей, достоверно установлена прямая зависимость интенсивности развития рака почки, имея в виду рост первичного опухолевого узла, от плотности развития сосудистой сети опухоли [13, 56]. Отсюда становится понятным и объяснимым интерес патоморфологов к изучению роли сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в качестве важнейшего маркера, способствующего и свидетельствующего об интенсивной пролиферации эндотелиальных клеток в условиях физиологического и патологического ангиогенеза [18, 82]. VEGF стимулирует активность урокиназы и коллагеназы, что приводит к лизису эндотелиального матрикса, повышает способность эндотелиальных клеток к пролиферации, вызывает усиление способности опухолевых клеток к инвазии и метастазированию [70]. У больных светлоклеточным ПКР, маркер коррелирует с уровнем инактивации VHL, и находится с ним в обратно пропорциональной зависимости: чем ниже показатель экспрессии VEGF, тем более быстрым и прогрессирующим предполагается течение заболевания [21]. В противоположность при папиллярном варианте ПКР за неблагоприятный прогностический признак принимается гиперэкспрессия данного маркера [85] .Однако, существует и мнение об отсутствии взаимосвязи гистологической картины опухоли с уровнем экспрессии маркера в качестве показателя течения заболевания [79].

Одним из важнейших этапов реализации метастатического каскада является момент инвазии опухоли, который осуществляется путем

повреждения базальной мембраны эпителия и стромы [93]. В последнее время значительная роль в этом процессе отводится действию матриксных металопротеиназ (ММР), большинство из которых секретируются клетками в небольших количествах в виде неактивных ферментов [39]. Активация их осуществляется под действием протеаз (плазмин, активатор плазминогена урокиназного типа), и, возникающий при этом протеолиз тканей, в обычных условиях, имеет ограниченный характер, обусловленный подавлением функций ММР их тканевыми ингибиторами, экспрессируемыми клетками стромы (TIMP) [9, 54]. Для ПКР характерна гиперэкспрессия ММР-2 и ММР-9, причем уровень экспрессии напрямую коррелируют со стадией заболевания [9, 19, 101, 107].

В настоящее время деятельность исследователей по разработке и внедрению новых молекулярных маркеров, а также их комбинаций проводится не только по направлению оценки прогнозирования развития опухолей, но и с целью дифференциальной диагностики между различными гистиотипами ПКР и другими первичными опухолями почек [34, 88]. Однако, анализ используемых для диагностики ПКР-прогностических маркеров, позволяет сделать вывод об их недостаточной специфичности. Так, показатели экспрессии p53, транскрипционного фактора, регулирующего клеточный цикл и репликацию ДНК, могут с одной стороны, варьировать от 12 (светлоклеточный рак) до 70% (папиллярный рак) [59, 119], а с другой стороны, вообще не иметь связи с гистологическим типом опухоли [32, 87, 115]. К такому же выводу можно придти, анализируя уровни экспрессии (идентификации) другого представителя группы ингибиторов апоптоза сурвивина, который выделяется клетками опухолей большинства локализаций и фетальных тканей [68].

Наиболее распространенной является точка зрения о высокой диагностической ценности и чувствительности виментина – белка промежуточных филаментов соединительной ткани, обычно продуцируемого в сосудах и других производных мезенхимы. И действительно, начиная с

2007 года [60] бытует мнение об идентификации виментина во всех случаях светлоклеточного варианта ПКР, имеющего специфическую ангиоархитектонику опухолевого узла, и её, как правило, повышенную васкуляризацию.

Аналогичный вывод можно сделать на основании данных о снижении или отсутствии экспрессии Е-кадгерина (эпителиального кадгерина), представителя класса молекул клеточной адгезии, обеспечивающего кальций-зависимое гомофильное соединение клеток [84]. Поскольку в большинстве злокачественных опухолей клеточная адгезия резко снижена, наблюдение о её уменьшении в случае ПКР выглядит убедительным.

Особо следует отметить данные о содержании и экспрессии цитокератинов (СК) – белков промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток в случае с ПКР [18, 29]. Ткань почки, невовлеченная в патологический процесс (воспалительный, опухолевый и др.), характеризуется положительной экспрессией СК-7 эпителием дистальных извитых канальцев и собирательных трубочек, которая сохраняется и имеет тенденцию к повышению при папиллярном и хромофобном вариантах ПКР. В случае развития светлоклеточной формы ПКР уровень экспрессии СК-7, наоборот, резко снижается или совсем отсутствует [56]. В настоящее время предпринимаются попытки идентификации других типов цитокератинов (СК 17-20), обладающих более интенсивной экспрессией по сравнению с СК-7 [30, 83], особенно в случаях, когда необходимо провести дифференциальную диагностику между опухолями различной степени зрелости [14].

Маркер CD10, получивший название общего антигена острой лимфобластной лейкемии, является полезным не только для диагностики лейкоза или лимфом, но и для дифференциации различных типов опухолей почек и ПКР [52]. Большинство светлоклеточных карцином характеризуются положительной экспрессией CD10, тогда как в случаях хромофобного ПКР большинство исследователей отмечают противоположную или слабоположительную экспрессию маркера в случаях с его эозинофильным

вариантом [64, 84, 106]. Папиллярный вариант ПКР проявляется положительной цитоплазматической экспрессией CD10, интенсивность которой может варьировать и, как правило, не зависит от типа папиллярного рака [65] .

В исследованиях последних лет, посвященных изучению опухолей почек, немалая роль отводится паренхиматозно-стромальным взаимоотношениям, имеющим место в ткани опухолей. Стромальные клетки, находящиеся в микроокружении опухоли, не только ускоряют её рост в месте первичной локализации, но и способствуют метастазированию в отдаленные органы. Некоторые элементы микроокружения опухолей способствуют эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) [78]. Светлоклеточный ПКР обладает фенотипом ЭМТ. Уровни факторов, ассоциированных с эпителиально-мезенхимальной трансформацией, таких как Е-кадерин, виментин, β-катенин ассоциируются с неблагоприятными изменениями, увеличением частоты рецидивов и сокращением периода выживаемости. Увеличение уровня цитокинов, хемокинов и факторов роста, включая трансформирующий фактор роста-β, ИЛ6 и фактор роста фибробластов играют важную роль как медиаторы ЭМТ в раковых клетках. Более того, ЭМТ, способствующая движению клеток, приводит к значительным изменениям их механических свойств [58].

Содержание миофибробластоподобных клеткок (α-SMA) и CD4+ Т лимфоцитов увеличивается при 3 и 4 стадии по Фурману (Ryu, 2010). Интерлейкин 6, выделяющийся CD4+ Т, является триггером эпителиально-мезенхимальной трансформации в светлоклеточном ПКР и может усиливать метастазирование опухоли [55, 58, 105].

Усиление опухолевого стресса способствует ЭМТ и изменению свойств стволовых клеток, индуцированных ИЛ6 в светлоклеточном ПКР через сигнальный путь Akt / GSK-3β / β-catenin [58]. В строме опухолей с высокой градацией по Фурману по сравнению с низкой больше α-SMA-положительных клеток, что коррелирует с прогрессией опухоли и

выживаемости пациентов. Строма светлоклеточного ПКР также содержит значительное количество CD4+ лимфоцитов с провоспалительными свойствами, которые являются главным источником ИЛ 6, однако данные о значении плотности воспалительного инфильтрата в прогрессии заболевания немногочисленны и противоречивы [55, 80, 96].

Механический стресс значительно усиливает индуцированную ИЛ 6 эпителиально-мезенхимальную трансформацию раковой клетки и может вызывать клеточную гибель, также усиливать прогрессию опухоли и является триггером для деления раковых клеток. Накопление β-катенина в ядрах опухолевых клеток способствует ЭМТ и механической трансдукции при различных раковых заболеваниях, включая карциномы почек. Как β-catenin, так и CD 44 являются мощными прогностическими биомаркерами, подчас определяющими алгоритм клинической терапии пациентов с опухолями почек, включая светлоклеточный ПКР [58, 120].

Электронномикроскопическое исследование в качестве метода диагностики опухолей почек, в настоящее практически не используется и представляет больше теоретический интерес, нежели практический. Не смотря на это, ультраструктурные особенности и различия в морфологии доброкачественных и злокачественных опухолей почек, определяемые на ультраструктурном уровне, имеют ключевое значение в понимании морфогенеза заболевания, и являются основанием для разработки новых технологий их диагностики и лечения. В большинстве случаев опухолей почек, включая светлоклеточный вариант ПКР, на ультраструктурном уровне в опухолевых клетках определяется, как правило, увеличенное ядро, повышение ядерно-цитоплазматического индекса, изменение его формы с появлением своеобразных инвагинаций и «выпячиваний» кариолеммы и маргинальным распределением ядерного хроматина. В цитоплазме опухолевых клеток обнаруживается большое скопление липидов (холестерин и его эфиры, фосфолипиды) и редукция органелл [50]. Наряду с этим обнаруживаются клетки с развитыми клеточными органеллами

(митохондрии, лизосомы, профили гранулярной эндоплазматической сети) и большим количеством гликогена в цитоплазме, при отсутствии липидных включений. При низкой степени дифференцировки опухоли, различают клетки со скудной цитоплазмой, единичными клеточными органеллами и крупным ядром [28].

В исследовании W. Yua и соавт. (2013), посвященному изучению ПКР, отмечены существенные различия между двумя вариантами папиллярного рака почки, выявляемые на ультраструктурном уровне. Так, цитоплазма опухолевых клеток, относящихся к папиллярному раку 1 типа, была заполнена большим количеством гранул гликогена и вторичных лизосом с включенными в их состав липидными вакуолями, и содержала единичные канальцы и трубочки гладкого эндоплазматического ретикулума.Для папиллярного рака второго типа, напротив, было характерно большое количество гладкого эндоплазматического ретикулума и митохондрий, и практически полное отсутствие липидных включений [116].

Для большинства наблюдений хромофобного ПКР опухолевые клетки с эозинофильной цитоплазмой содержали митохондрии с тубуловезикулярными и тубулоцистическими кристами и были окружены скоплениями везикулярных структур. Опухолевые клетки при классическом варианте хромофобной карциномы содержали многочисленные митохондрии, лишенные тубуловезикул и тубулоцист, а микровезикулы были единичными [113]. Как при стандартном гистологическом, так и при электронномикроскопическом исследовании, сохранялись определенные трудности в дифференциальной диагностике эозинофильного хромофобного ПКР и онкоцитомы почки в связи с практически идентичным качественным составом опухолевых клеток. До недавнего времени, единственным диагностическим критерием, позволяющим диагностировать онкоцитому, являлось обнаружение в клетках данной опухоли цитоплазматических канальцев [81], однако, недавние работы опровергли этот факт [41, 117].

1.3. Современные возможности рамановской спектроскопии в диагностике онкологических заболеваний

В 1928 году индийские физики Ч. Раман и К. Кришнан в опытах по изучению рассеяния света в жидкостях открыли явление комбинационного неупругого рассеяния, используя в качестве источника возбуждающего излучения солнечный луч [103]. Неупругое рассеяние — столкновение частиц, сопровождающееся изменением их внутреннего состояния, превращением в другие частицы или дополнительным рождением новых частиц. Излучение, рассеиваемое молекулами, содержит фотоны той же частоты, что и падающее излучение, а также некоторое количество фотонов с изменённой или смещённой частотой. Появление дополнительных компонент в спектре обусловлено взаимодействием падающего излучения с молекулами облучаемого вещества, которым свойственны колебания на строго определённых частотах [10, 14]. В дальнейшем данный эффект получил название «эффект Рамана», а метод на его основе – «рамановская спектроскопия». В рамановской спектроскопии образец облучается монохроматическим светом (источником обычно является лазер). Большая часть рассеянного образцом излучения будет иметь ту же частоту, что и падающая – процесс известен как Рэлеевское рассеяние. Тем не менее, некоторое количество излучения, рассеянного образцом, примерно один фотон из миллиона (0.0001 %) – будет иметь частоту, смещённую по отношению к частоте исходного излучения лазера [20]. Поскольку частоты колебаний определяются характером внутри- и межмолекулярных связей, то спектр уникален для каждого химического соединения и зависит от его аллотропной формы и агрегатного состояния. Таким образом, спектроскопия комбинационного рассеяния света (рамановская спектроскопия) позволяет определять элементный состав, аллотропную модификацию и агрегатное состояние вещества.

Методика рамановской спектроскопии нашла широкое применение в различных областях науки и промышленности. В медицине - для анализа взаимодействия медицинских препаратов с живыми клетками; выявления ранних стадий злокачественных новообразований; диагностики атеросклероза, воспалительных заболеваний различных тканей и органов и т.д. [42, 44, 69].

Рамановская спектроскопия содержит ряд преимуществ по сравнению с другими методами диагностики: простота пробоподготовки (не требуется отмывка, лизис клеток, разделение белков, выделение ДНК/РНК); большой объём получаемой информации; неразрушающий характер анализа - нет ,необходимости растворять твёрдые тела, прессовать таблетки, прижимать химическую структуру образца; метод позволяет получать как количественную, так и качественную информацию об образце; спектральный диапазон не зависит от изучаемых колебательных особенностей, а также позволяет изучать колебательные состояния, связанные с частотами в дальней инфракрасной области. Также, говоря о преимуществах рамановской спектроскопии, стоит отметить высокую скорость анализа и возможность проводить исследование без прямого физического контакта с биологическим агентом, что нашло отражение при идентификации патогенных вирусов, находящихся внутри инфицированных клеток [46]. Кроме того, не существует двух молекул, которые имеют одинаковые рамановские спектры, а интенсивность рассеянного света связана с количеством вещества [38]. Это позволяет получать как количественную, так и качественную информацию об образце, даёт возможность интерпретировать спектр, пользоваться библиотекой спектров, обрабатывать данные с применением компьютерных методов количественного анализа [25].

В современных условиях методы рамановской спектроскопии нашли применение в приборах «ИнСпектр», с помощью которых можно проводить экспресс-анализ органических и неорганических субстанций (РУ № РЗН 2015/2419 от 18.05.2015 г.). Толщина образца не вызывает неудобств при

проведении рамановской спектроскопии, а окружающая среда не влияет на раман-спектры, поэтому всё, что требуется для сбора спектра – это направить падающий луч точно на образец, а затем собрать рассеянный свет [22]. Данный вид исследования тканей не требует специальной подготовки образца и нечувствителен к полосам поглощения, так как рамановский эффект наблюдается в рассеянном свете от образца, а не в спектре поглощения. Это свойство рамановской спектроскопии облегчает процесс непосредственного измерения как в твёрдых образцах, так и жидких и газообразных средах. Запись спектра исследуемого объекта проводится в течение нескольких секунд с последующим определением спектрального положения и относительных интенсивностей рамановских и люминесцентных линий. Происходит своеобразная регистрация «отпечатков пальцев» исследуемой субстанции, поиск и сравнение этих «отпечатков» со спектральной базой данных известных объектов [40]. Применяется сочетание силы и чувствительности рамановской спектроскопии и микроскопии, что позволяет получить ряд значительных преимуществ для анализа очень мелких образцов (гистологических объектов). Целью данной микроскопии является анализ микроскопических структур и выявление интересующего вещества в его окружении [25].

Изучена диагностическая ценность рамановской спектроскопии при сравнении измерений биоптатов стенки мочевого пузыря ex vivo с результатами его последующего гистологического исследования. Чувствительность метода, в среднем, составляет 90-95%, специфичность – 94-98%. Благодаря разработкам эндоскопического зонда для рамановской спектроскопии появилась возможность внедрить данный метод in vivo [35, 62, 92]. Подобное исследование было проведено Draga R.O. с соавт., которые для определения инвазивности рака мочевого пузыря использовали эндоскопический зонд in vivo. В ходе работы установлено, что увеличение интенсивности рассеяния света молекулами ДНК позволяет отличить рак мочевого пузыря от нормальной ткани [66].

Лабораторные исследования показали, что метод комбинационного рассеяния света может быть использован для идентификации и характеристики карциномы переходных клеток и аденокарциномы предстательной железы in vitro. В исследованиях Crow P. с соавт. зарегистрированы рамановские спектры мочевого пузыря и предстательной железы, которые коррелировали с патоморфологическими особенностями тканей, что использовалось для построения отдельных диагностических алгоритмов для мочевого пузыря и предстательной железы. Применение алгоритма диагностики заболеваний мочевого пузыря позволяет дифференцировать образцы нормальных тканей и тканей при цистите от образцов с карциномой мочевого пузыря с точностью до 84%. Использование методики диагностики заболеваний простаты помогает с точностью до 86% отличить рак предстательной железы от доброкачественной гиперплазии или простатита [62, 63].

Возможности использования рамановского эффекта для диагностики в акушерско-гинекологической практике отражены в работе Александрова М.Т. с соавт. по анализу спектральных характеристик органов малого таза у женщин. В ходе данного исследования были выявлены характерные отличия спектральных характеристик здоровых и опухолевых тканей, а также плазмы крови здоровых женщин и больных эндометриозом, злокачественными опухолями органов малого таза и беременных с преэклампсией. Спектры интактных тканей имеют схожую двугорбую форму (во всех исследованных тканях — неспецифический индикатор отсутствия патологии). Спектры злокачественных опухолей отличаются друг от друга (по форме люминесценции) в зависимости от ткани и точки, в которой записываются спектры. Авторы приходят к выводу, что если в ткани будет накапливаться какое-то специфичное вещество, и клеточные структуры будут меняться, то по изменению рамановского спектра можно сказать, что это за вещество, и определить его концентрацию. Таким образом, открывается перспектива в ещё большей степени повысить специфичность и чувствительность

рамановской спектроскопии [3]. Кроме того, в работе исследована плазма крови доноров, здоровых спортсменов, больных с эндометриозом и беременных с преэклампсией, рамановские спектры которых имеют существенные отличия.

Исследование Duraipandian S. с соавт. иллюстрирует, что рамановская спектроскопия позволяет с высокой точностью диагностировать предраковые изменения шейки матки. С использованием рамановского зонда in vivo при кольпоскопии проводилось исследование, в результате которого получено 1240 спектров (993 – нормальная ткань, 247 – дисплазия). Чувствительность метода в данном случае составила 81,0%, специфичность – 87,1% [67]. В исследованиях Robichaux-Viehoever A. с соавт. отражено сравнение эффективности спектроскопии комбинационного рассеяния и кольпоскопии. Раман спектры позволяют отличить дисплазию от доброкачественной ткани с чувствительностью 89% и специфичностью 81%, а кольпоскопия в руках экспертов помогает отдифференцировать новообразования с чувствительностью и специфичностью 87 % и 72% соответственно [104]. Для спектроскопических измерений in vivo была разработана специальная система рамановской спектроскопии, связанная с шарико-линзовым оптоволоконным рамановским зондом. Значительная разница в интенсивностях комбинационного рассеяния видных комбинационных полос наблюдалась между образцами нормальной ткани шейки матки и образцами с дисплазией. Диагностические алгоритмы, основанные на анализе основных компонентов раман спектров in vivo, дали диагностическую чувствительность 93,5% и специфичность 97,8% для идентификации ткани дисплазии [19]. Таким образом, применение рамановской спектроскопии при проведении диагностической кольпоскопии позволит выявить диспластические процессы в шейке матки на самых ранних стадиях.

В диагностике злокачественных новообразований пищевода рамановская спектроскопия применяется для повышения эффективности прицельной эксцизионной биопсии [76]. В работе Kendall C. с соавт.

проведено сопоставление результатов «золотого стандарта» диагностики внутриэпителиальной неоплазии (дисплазии) пищевода Барретта – гистологического метода с результатами комбинационного рассеяния (рамановской спектроскопии). Рамановское спектральное комбинационное рассеяние давало чувствительность от 73% до 100% и специфичность от 90 до 100%. Рамановская спектроскопия обеспечивает высокочувствительную и специфическую идентификацию неоплазии пищевода Барретта [77].

Высококачественные спектры комбинационного рассеяния in vivo могут быть получены и из нормальной слизистой оболочки желудка и ткани с дисплазией в течение 0,5 с при гастроскопии. Значительные различия наблюдаются в рамановских спектрах in vivo между нормальной тканью и тканью желудка при дисплазии, которая, в основном, содержат частоты, связанные с белками, нуклеиновыми кислотами и липидами. Многомерный анализ спектров комбинационного рассеяния ткани желудка in vivo даёт диагностическую чувствительность 94,4% и специфичность 96,3%. Это исследование показывает, что рамановская спектроскопия потенциально эффективна для неинвазивной ранней диагностики in vivo и обнаружения предраковых состояний желудка при клиническом гастроскопическом исследовании [73, 112].

Рамановская спектроскопия представляет диагностическую ценность при полипах толстой кишки и колоректальном раке. Создана принципиально новая технология, включающая три этапа: первичная культуральная обработка образцов тканей человека для производства одноклеточных суспензий, обнаружение рамановских спектров на захваченных в «лазерную ловушку» клетках и диагностика ракового перерождения клеток с помощью классификации искусственных нейронных сетей. В настоящее время обсуждаются преимущества данного метода по сравнению с классической тканевой рамановской спектроскопией [118]. Molckovsky A. с соавт. проанализировали 52 рамановских спектра ex vivo (20 образцов гиперпластических полипов, 32 - аденоматозных). На основе спектральных

диагностических алгоритмов были определены аденоматозные полипы с чувствительностью 91%, специфичностью 95%. In vivo аденокарциномы можно отличить от гиперпластических полипов с чувствительностью 100% и специфичностью 89%. Инфракрасная рамановская спектроскопия дифференцировала гиперпластические полипы с высокой диагностической точностью [92]. В работе Кручининой М.В. с соавт. методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (раман спектроскопии) сыворотки крови выявлены различия в интенсивности спектров у пациентов с колоректальным раком разных стадий и с различной локализацией метастазов. Площади пиков раман спектров оказались достоверно ниже у больных колоректальным раком по сравнению со здоровыми, коррелируя со стадией процесса и наличием метастазов [27].

В единичных работах, посвященных использованию рамановской спектроскопии в диагностике рака почки, исследователи, в качестве отличительных особенностей светлоклеточного варианта ПКР, отмечают усиленную интенсивность рамановского рассеяния молекул фенилаланина [73], что, по их мнению, дает основание отнести их к группе опухолевых маркеров [75]. Применение спектрометров с высокими разрешающими характеристиками позволило выявить изменения интенсивности рамановского рассеяния света молекулами нуклеиновых кислот в ткани опухоли по сравнению с сохранной тканью почки, а также зарегистрировать существенные различия в интенсивности рамановского рассеяния в опухолях различной степени зрелости. Кроме того, в ряде случаев применение рамановской спектроскопии позволило не только идентифицировать отдельные аминокислоты (тирозин, триптофан) по интенсивности рамановского рассеяния света, но и выделить характерные для них диапазоны в качестве ключевых диагностических критериев. Так, группой ученых Stewart S., et al (2014) было отмечено гораздо более высокие значения интенсивности рамановского рассеяния света молекулами фенилаланина, тирозина и триптофана в случаях хромофобного варианта почечно-

клеточного рака в сравнении с онкоцитомой почки [111].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал 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±1,21 лет (Табл. 1). 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 х 0,5 х 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± 1,59 года.

Таблица 1. Распределение больных раком почки по возрасту и полу

Пол		Возраст больных (годы)					Всего
	25-35	36-45	46-55	56-65	66-75	>75	
Мужской (абс,%)	2 (2,35%)	4 (4,7%)	17 (20%)	15 (17,65%)	6 (7,06%)	1 (1,18%)	45 (53,0%)
Женский (абс, %)	2 (2,35%)	3 (3,53%)	14 (16,47%)	14 (16,47%)	5 (5,88%)	2 (2,35%)	40 (47,0%)
Всего (абс, %)	4 (4,7%)	7 (8,23%)	31(36,5%)	29 (34,1%)	11(13%)	3 (3,52%)	85(100%)

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, ТлюбаяN2M0, ТлюбаяNлюбаяM1) – 1 (1,2%) наблюдение.

В работе использовали следующие морфологические методы исследования:

- Гистологический
- Гистохимический
- Иммуногистохимический

Гистологический метод

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

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).

Таблица 2.Распределение пациентов по группам в зависимости от морфологической картины новообразования почки

Параметр	Значение
Группа контроля, n *(абс)*	10 (100%)
Почечноклеточный рак, *n (абс, %)* *Светлоклеточный вариант* *Папиллярный вариант* *Хромофобный вариант*	85 (100%) 67 (78,8%) 10 (11,7%) 8 (9,41%)
Светлоклеточный, *n (абс, %)* Степень дифференцировки (согласно шкале Фурмана), *n (абс, %)* -G1 -G2 -G3 -G4	67 (100%) 19 (23,3%) 33 (49,2%) 10 (14,92%) 5(7,46%)
Папиллярный, *n (абс, %)* -1 тип -2 тип Степень дифференцировки (согласно шкале Фурмана), *n (абс, %)* -G1 -G2 -G3 -G4	10 (100%) 7 (70%) 3 (30%) 4 (40%) 6 (60%) 0 0
Хромофобный, *n (абс, %)* -классический вариант -эозинофильный вариант	8 (100%) 4 (50%) 4 (50%)

Гистохимический метод

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

Иммуногистохимический метод

Иммуногистохимическое исследование опухолей почек проводили на парафиновых срезах с использованием стрептавидин-биотинового метода с применением двухшаговой полимерной системы визуализации «EnVision+DualLinkSystem-HRP» Dako Cytomation.

Каждое иммуногистохимическое исследование проводилось с постановкой 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 специфическую поставленную иммуногистохимическую реакцию с данным антителом.

На основании изучения основополагающих работ [91, 133], посвященных дифференциальной диагностике между разновидностями почечноклеточного рака, нами были отобраны антитела к СК-7, Vimentin, CD10, позволяющие подтвердить или опровергнуть тот или иной вариант (Табл. 3).

Таблица 3. Панель антител, использованная в исследовании

Маркер	Антитела (клон, производитель)	Локализация	Характеристика
СК-7	OV-TL 12/30, Dako	Цитоплазма	Относится к семейству белков промежуточных филаментов. Антитела клона OV-TL окрашивают цитоплазму различных видов клеток нормального и неопластического железистого эпителия, включая эпителий протоков.
Vimentin	cloneVimV9, Dako	Цитоплазма	Виментин экспрессируетс ямезенхимальными клетками, фибробластами, клетками гладкой мускулатуры, эндотелиальными клетками.

CD10	56C6, Dako	Мембрана	Данные антитела используются для характеристики популяций злокачественных лимфом, в которых экспрессируется CD10. Антитела используются в составе панели для дифференциации светлоклеточного рака и паппилярно-клеточного рака почки.

По результатами иммунногистохимического исследования оценивали интенсивность экспрессии: при полном отсутствии экспрессии или экспрессии менее 5% клеток— отрицательная (-), 5-24% - слабоположигельная (+) , 25-74% — умеренно положительная (++) , более 75%—выраженная (+++).

Метод раман-флуоресцентной спектроскопии

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 изучения (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.

Раман-флуоресцентный программно-аппаратный комплекс использовался по следующей схеме: (Рис. 1):

1. Между лазером и полупрозрачным зеркалом располагали узкополосный интерференционный фильтр, который пропускал излучение, соответствующее лазерной частоте, определяемой техническими характеристиками прибора.
2. После фильтра лазерное излучение попадало на полупрозрачное зеркало и после прохождения через линзу фокусировалось на образец ткани, предварительно фиксированный в 10% растворе формалина.
3. Свет, рассеянный биологическим или любым другим веществом, после отделения линии лазера Edge-фильтром попадал в спектрометр ИнСпектр R532® SpecialEdition. В конструкции ИнСпектр R532® ScientificEdition была предусмотрена голографическая дифракционная решетка 1800 штрихов/мм, комбинация высокоэффективных селективных и отрезающих фильтров, а также 30 мВт одномодовый лазер, обеспечивающий качественное спектральное разрешение 4 см-1 и гарантирующий высокую точность измерения в спектральном диапазоне от 120 до 4000 см-1. Свет, разложенный по длинам волн, попадает на регистрирующее устройство – малошумную 3648-пиксельную CCD - линейку, работающую при комнатной температуре. Для данного комплекса была специально разработана система подавления рэлеевского рассеяния и встроенный программируемый микроконтроллер, который обеспечивает гибкость в управлении спектрометром.
4. Спектры неупругого рассеяния света и сигналы флуоресценции с исследуемых веществ фиксировались в компьютере с помощью специальной программы, написанной для управления данным комплексом. Программное обеспечение EnSpectrPro® автоматически управляло всеми элементами, задействованными в процессе измерения спектрального сигнала. Кроме того, математический блок программы производил автоматическое сравнение полученного спектрального сигнала с эталонными спектрами веществ, хранящимися в

спектральной базе данных [94], и выдавал результат распознавания спектра.

Уникальная комбинация параметров прибора позволяла в течение одной секунды производить измерение спектра исследуемого вещества, определение спектрального положения и относительных интенсивностей рамановских и флуоресцентных линий – своеобразных “отпечатков пальцев” исследуемой субстанции, а также их поиск и сравнение со спектральной базой данных известных веществ.

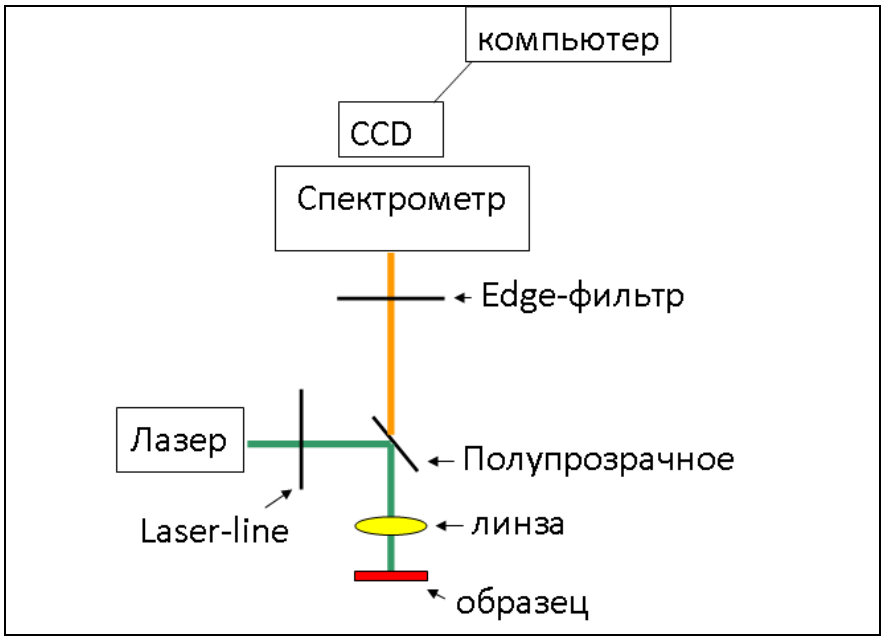


Рисунок 1. Схема устройства раман-флуоресцентного программно-аппаратного комплекса.

Полученные данные, будучи по своей сути многомерными и многопараметрными (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 [108] и фонового излучения методом коррекции опорной линии с использованием ассиметричных наименьших квадратов [53] . Все методы предобработки и многомерный анализ были реализованы в онлайн программном обеспечении TPtcloudbeta.

Статистические методы исследования

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 с помощью метода вариационной статистики.

В описательной статистике использовались минимальные и максимальные значения, средние арифметические значения, средние квадратические отклонения, средние квадратические (стандартные) ошибки средних значений, относительные величины частоты и распределения.

Для оценки взаимосвязи нескольких признаков проводили корреляционный анализ по Спирмену и/или Пирсону. Различия считались статистически достоверными при значении p менее 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Результаты иммуноморфологического и спектроскопического исследований образцов светлоклеточного почечно-клеточного рака

Макроскопически опухоль, за исключением одного случая диффузного поражения, имела вид светло-жёлтого узла, диаметр которого варьировал от 2,2 до 5,8 см (средний размер составил 3,96±0,41 см), окруженного более или менее выраженной псевдокапсулой, толщиной от 0,1 до 0,4 см, белесоватого вида едва заметного волокнистого строения. Благодаря наличию псевдокапсулы опухолевый узел сохранял свои очертания. Во всех случаях поверхность разреза опухолевого узла носила отпечаток реализовавшихся вторичных изменений, среди которых преобладали очаговые или очагово-сливные фокусы кровоизлияний и некрозов. В половине случаев, псевдокапсула опухолевого узла была отделена от визуально неизмененной ткани почки зоной повышенного кровенаполнения.

Несколько чаще опухолевый узел локализовался в левой почке - у 35 больных, чуть реже в правой почке - у 32 пациентов ($p>0,05$). Прорастание опухоли в близлежащие органы и ткани было отмечено в 15 (22,38%) случаях, при этом в половине случаев в патологический процесс были вовлечены околопочечная клетчатка, сосудистая ножка и почечная лоханка. В 3 случаях (4,47%) развитие опухоли осложнилось распространенным гематогенным метастазированием в легкие, печень, кости таза и позвоночник.

В случае светлоклеточного варианта 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 тонкопетлистой 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.

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. 2).

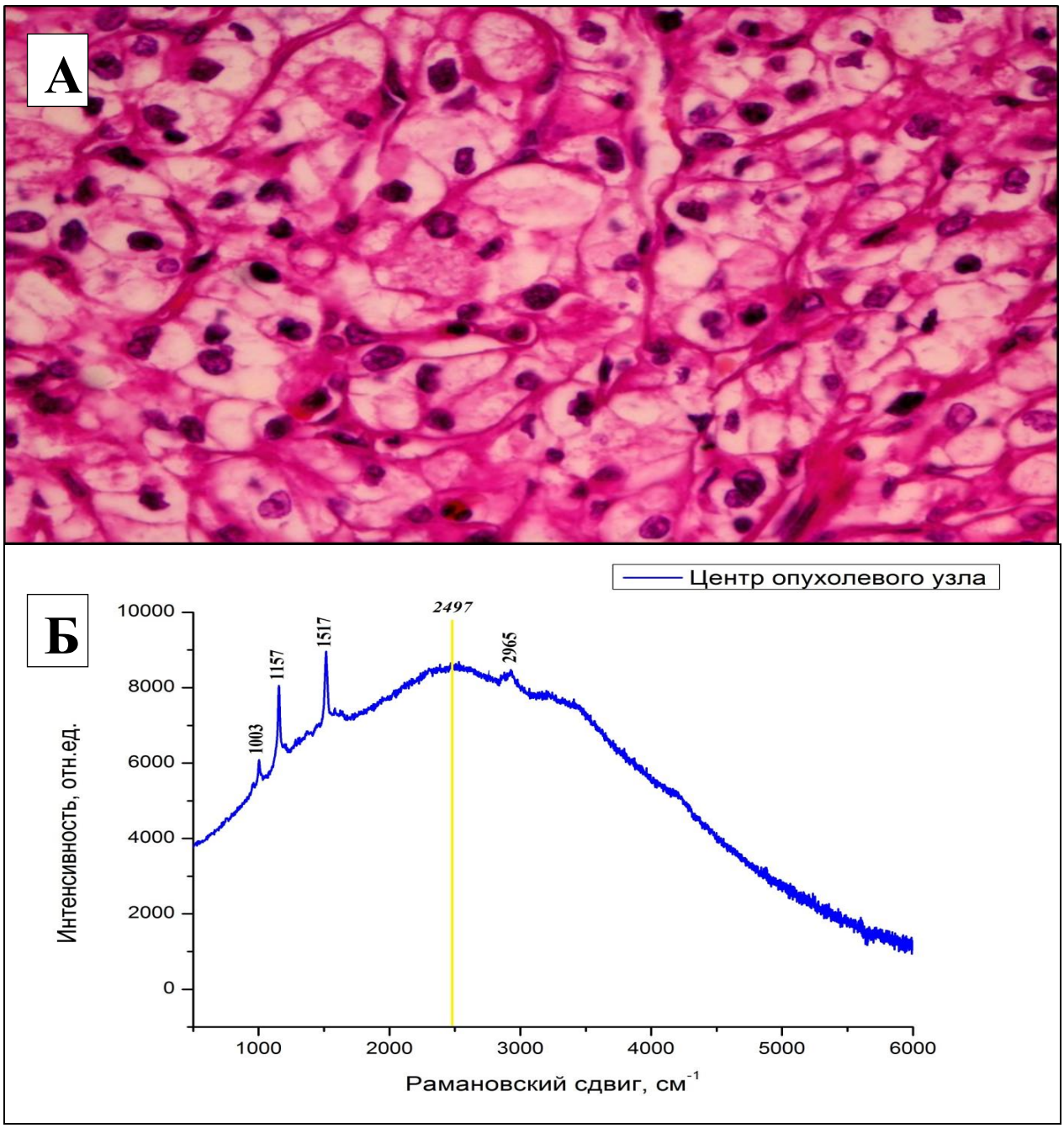


Рисунок 2. Результаты гистологического и спектроскопического исследований образца светлоклеточного варианта ПКР в центральном участке опухолевого узла. А. Опухолевые клетки с оптически пустой цитоплазмой, наличие единичных мелких ядрышек (степень дифференцировки G2 по Фурману) Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х400. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий центральной области опухолевого узла. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией и соответствует флуоресценции эндогенных порфиринов (2497 $см^{-1}$). Рамановские пики обозначены числовыми значениями, соответствующие рассеянию молекул фенилаланина (1003 $см^{-1}$), метионина (1157 $см^{-1}$), различным модификациям бета-каротина (1517 $см^{-1}$ и 2965 $см^{-1}$).

Патогистологическая характеристика образца, полученного из участка, расположенного на периферии опухолевого узла, в целом, содержала набор признаков, свойственных центроузловым образцам, 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 центроузловых, 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.3).

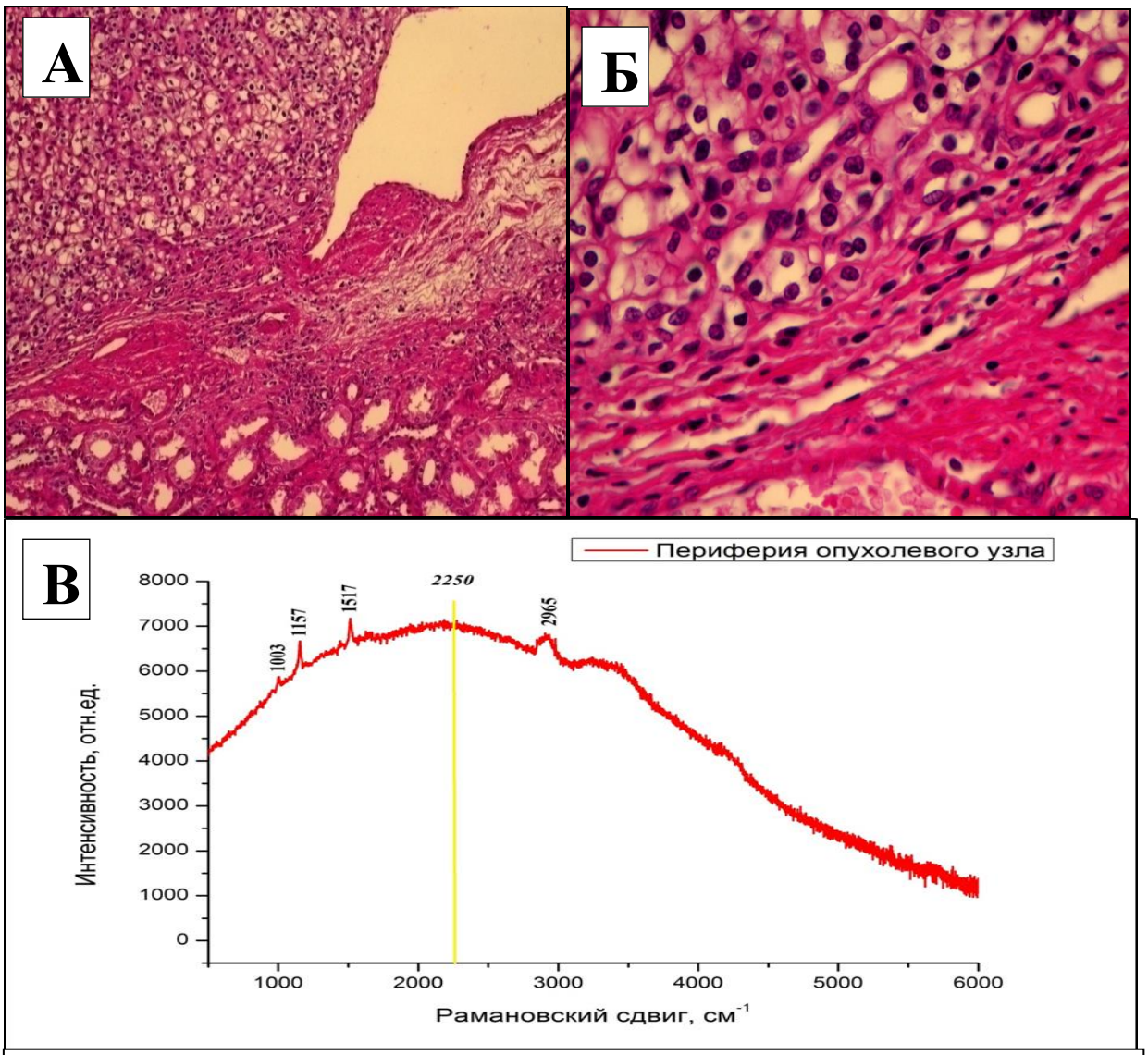


Рисунок 3. Результаты гистологического и спектроскопического исследований образца светлоклеточного варианта ПКР участка на периферии опухолевого узла. А. Опухолевые клетки с оптически пустой цитоплазмой, наличие единичных мелких ядрышек (степень дифференцировки G2 по Фурману) Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х100**. Б.** Тот же участок. Ув. Х400. **В.**Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий периферической области опухолевого узла. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией и соответствует флуоресценции эндогенных порфиринов (2250 $см^{-1}$). Рамановские пики обозначены числовыми значениями, соответствующие рассеянию молекул фенилаланина (1003 $см^{-1}$), метионина (1157 $см^{-1}$), различным модификациям бета-каротина (1517 $см^{-1}$ и 2965 $см^{-1}$).

В дальнейшем, в зависимости от наличия и вариабельности вышеперечисленных признаков все случаи были распределены по степеням дифференцировки на четыре стадии (S.A.Fuhrman) 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 ($p<0.05$) (Рисунок 4). Соотношения степени дифференцировки опухоли и интенсивности рамановского рассеяния пиков молекул фенилаланина, в-каротина и холестерина отражены в диаграмме 1. В образцах умереннодифференцированого (G2), низкодифференцированного (G3) и недифференцированного (G4) светлоклеточного ПКР значения интенсивности рамановского рассеяния имели стойкую тенденцию к снижению по всем показаниям по мере уменьшения дифференцировки опухоли и достигали минимум к G4 степени.

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

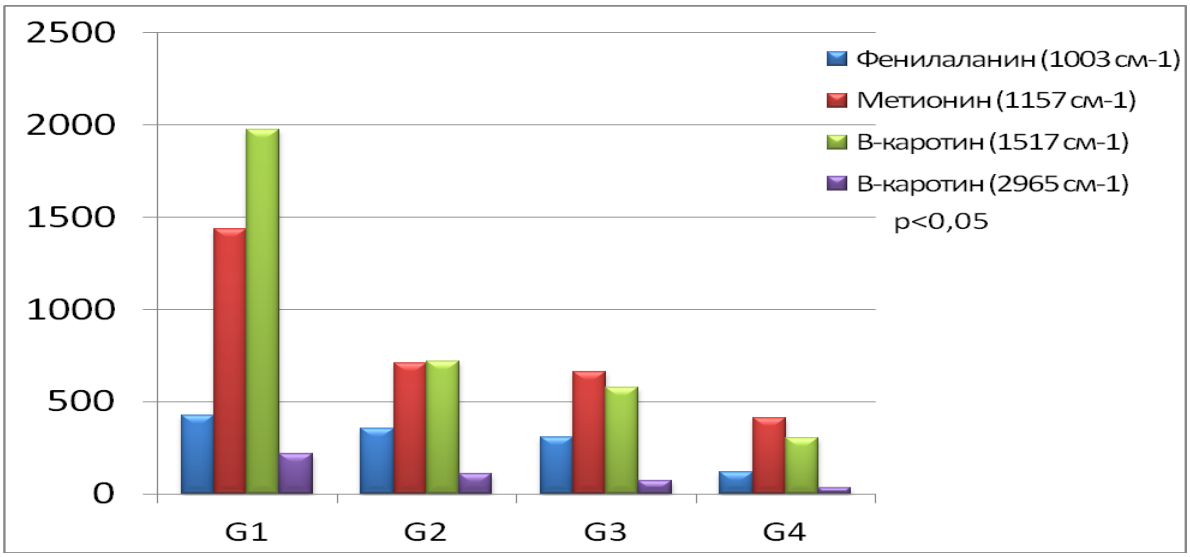


Таблица 5. Сопоставление интенсивности рассеяния рамановских пиков и степени дифференцировки светлоклеточного варианта ПКР (согласно шкале Фурмана).

Пик рамановского рассеяния	Значения интенсивности рассеяния
1003 см-1 (фенилаланин)	G1- 427,1± 41,54 отн.ед. G2 - 354,2± 64,12 отн.ед. G3 - 310,1± 17,61 отн.ед. G4– 118,3± 23,17 отн.ед.
1157 см-1 (метионин)	G1 - 1435,2± 103,28 отн.ед. G2 – 710,6± 78,9 отн.ед. G3 – 664,5±42,3 отн.ед. G4 – 413,7± 64,5 отн. ед.
1517 см-1 (в-каротин)	G1- 1975,3± 197,58 отн. ед. G2– 721,3 ± 32,22 отн.ед. G3– 578,5 ± 81,58 отн.ед. G4– 303,7± 58,32 отн.ед.
2965 см-1 (в-каротин)	G1 - 217,2± 28,6 отн.ед. G2 – 112,1± 23,12 отн.ед. G3 – 75,5 ± 24,11 отн.ед. G4 – 33,5± 14,17 отн.ед.

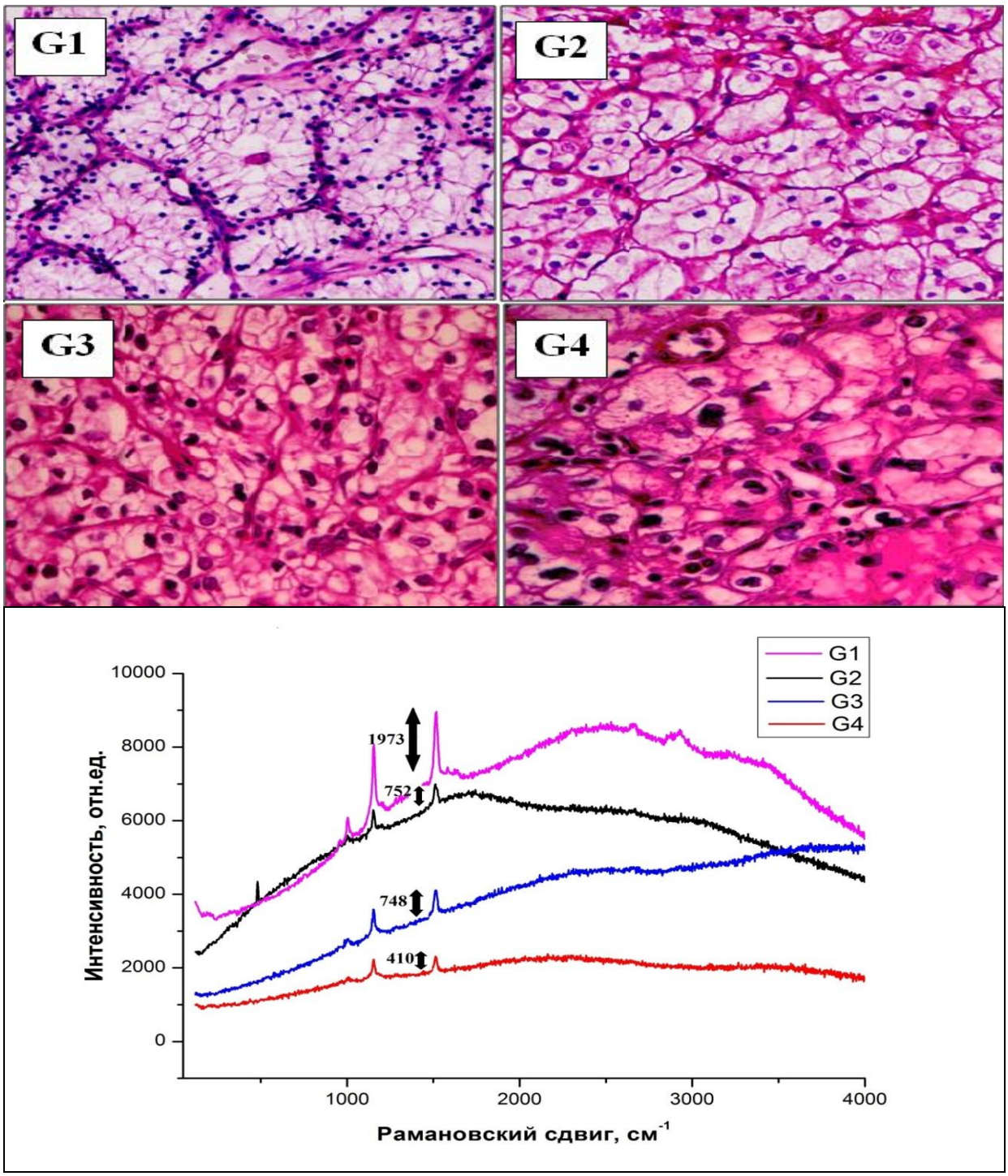


Рисунок 4. Корреляция интенсивности рамановского рассеяния в зависимости от степени дифференцировки (на примере пика 1517 см-1 (молекула В-каротина)) светлоклеточного ПКР.

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 (Рис.5) (Табл. 6).

Кроме того, учитывая значительную частоту возникновения вторичных изменений при светлоклеточном раке, 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. 6). 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 (Рис. 7).

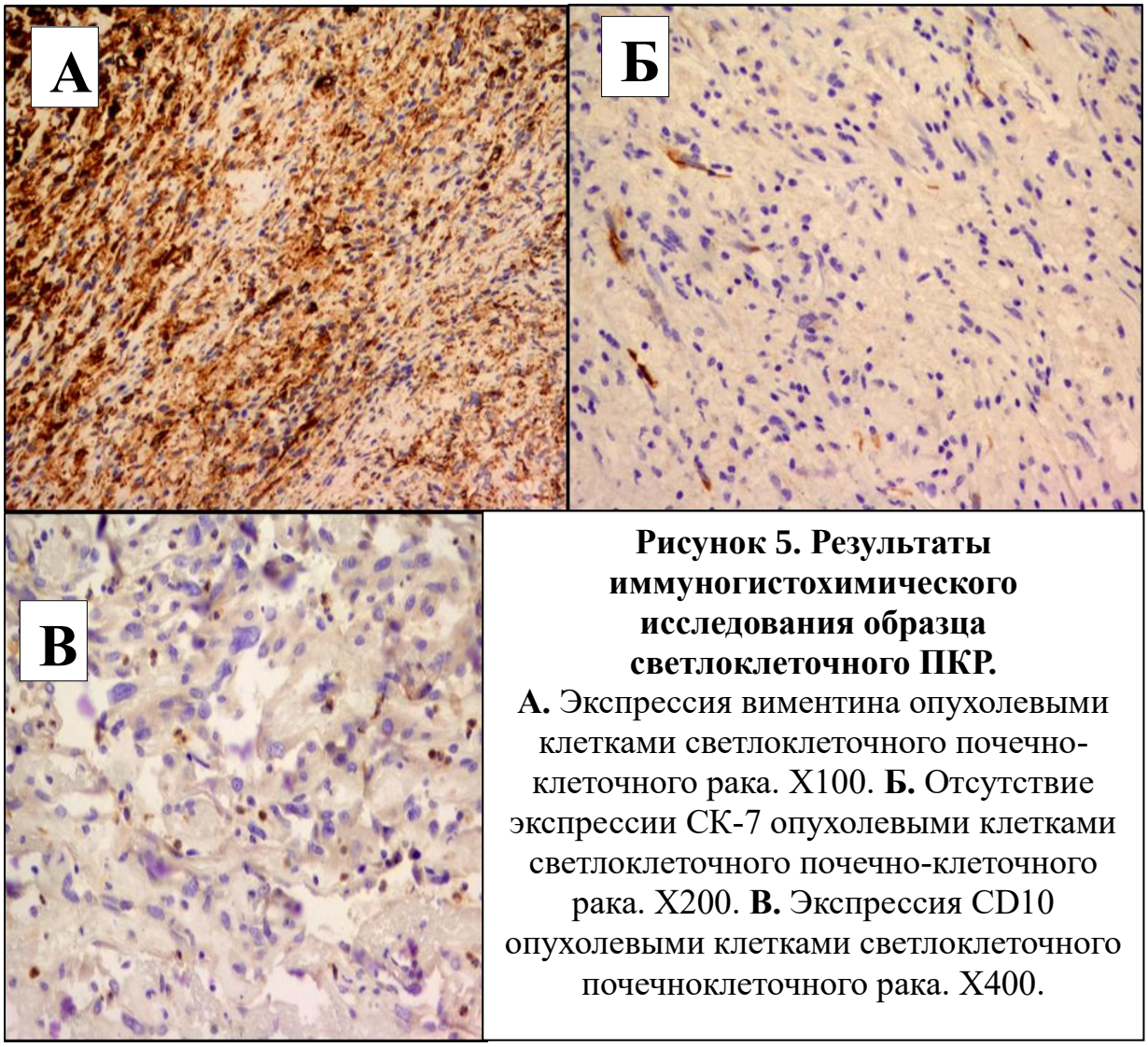


Рисунок 5. Результаты иммуногистохимического исследования образца светлоклеточного ПКР.
А. Экспрессия виментина опухолевыми клетками светлоклеточного почечно-клеточного рака. Х100. **Б.** Отсутствие экспрессии СК-7 опухолевыми клетками светлоклеточного почечно-клеточного рака. Х200. **В.** Экспрессия CD10 опухолевыми клетками светлоклеточного почечноклеточного рака. Х400.

Таблица 6. Результаты иммуногистохимического исследования образцов светлоклеточного ПКР.

Онкомаркер	Оценка экспрессии	Образцы светлоклеточного ПКР (№=67)
Vim	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	0 0 0 67 (100%)
CD10	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	0 15 (22,4%) 13 (19,4%) 39 (58,2%)
СК-7	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	64 (95,5%) 3 (4,5%) 0 0

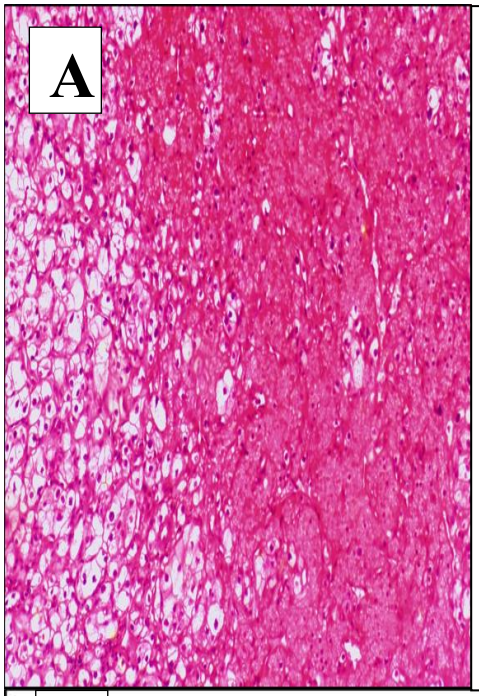
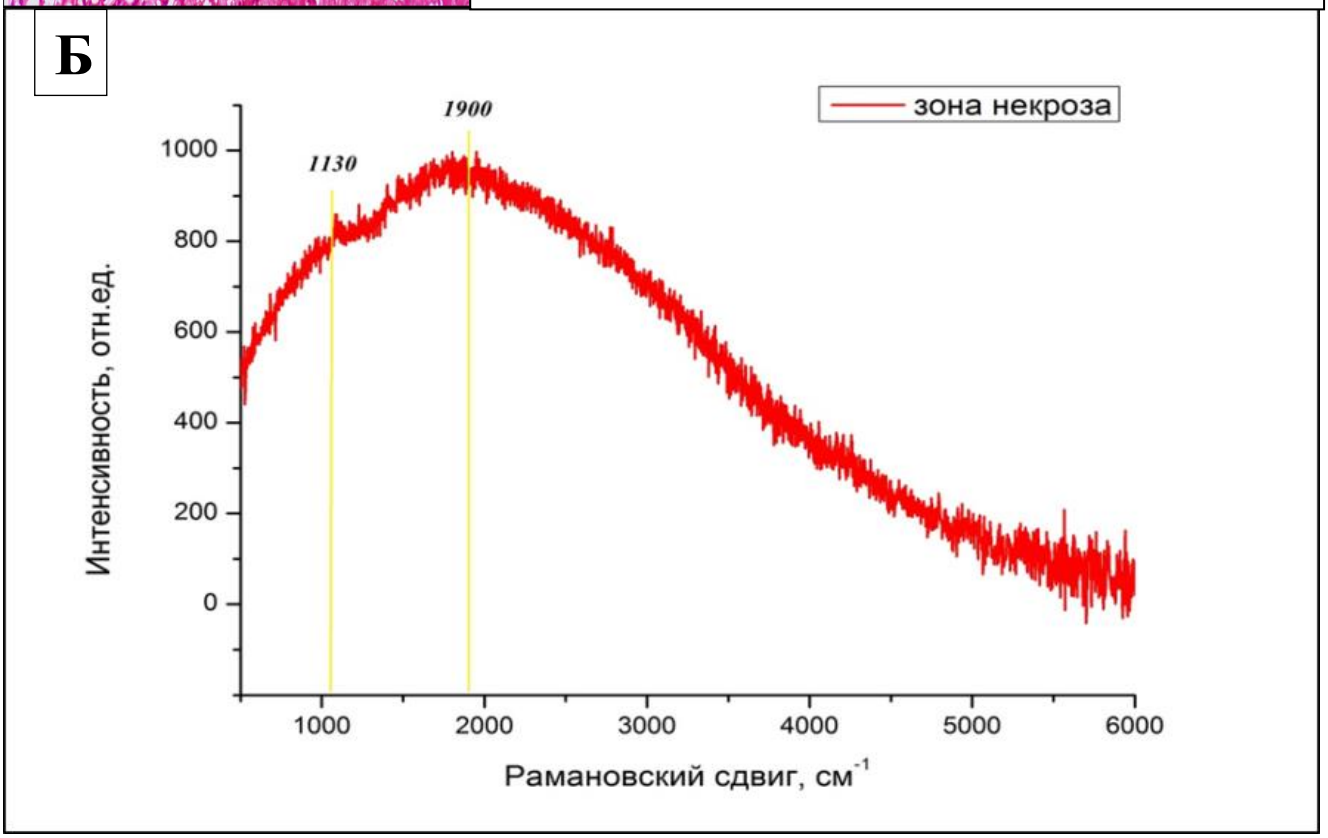


Рисунок 6. Результаты гистологического и спектроскопического исследований в области некротических изменений на примере образца светлоклеточного варианта ПКР. А. Обширный участок некроза опухолевого узла. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х100. **Б.**Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий некротизированной ткани опухолевого узла. Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтыми вертикальными линиями в точках 1130 $см^{-1}$ (суммарная флуоресценция липопигментов и флавинов) и 1900 $см^{-1}$ (флуоресценция эндогенных порфиринов), с интенсивностью не превышающей 1000 отн.ед.. Рамановские пики отсутствуют.



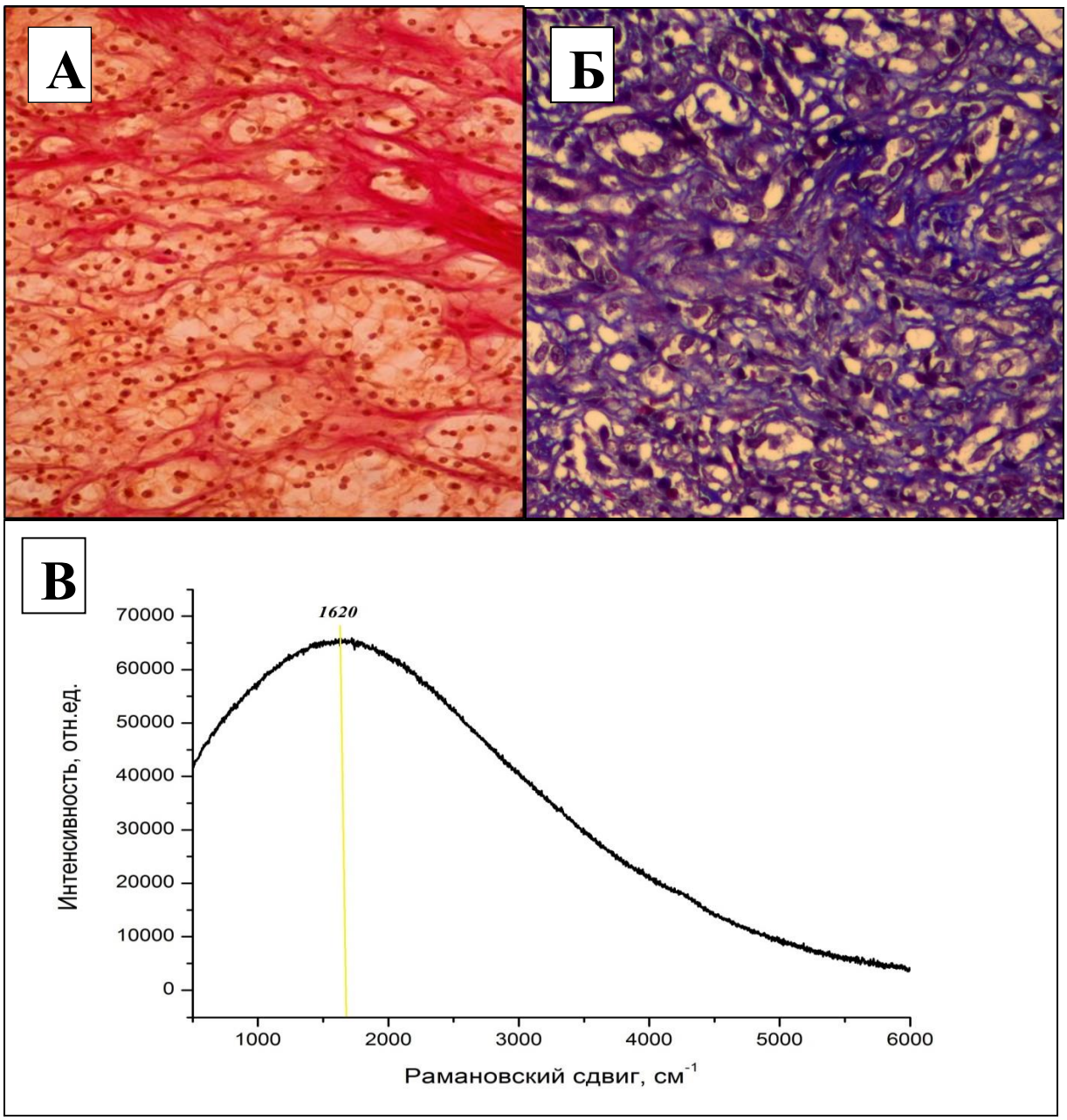


Рисунок 7. Результаты гистологического и спектроскопического исследований стромального компонента опухолевого узла на примере образца светлоклеточного варианта ПКР. А. Тяжи соединительнотканных волокон между скоплениями опухолевых клеток (красное окрашивание). Окраска пикрофуксин по ван Гизону. Ув. Х200. **Б.** То же (синее окрашивание). Окраска трихромом по Массону. Ув. Х200. **В.**Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий стромальному компоненту опухолевого узла. Локальный максимум желтой вертикальной линией в точке 1620 см-1 (суммарная флуоресценция липопигментов и флавинов), с интенсивностью 64 тыс. отн.ед. Рамановские пики отсутствуют.

Кровоизлиянию 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. 8.)

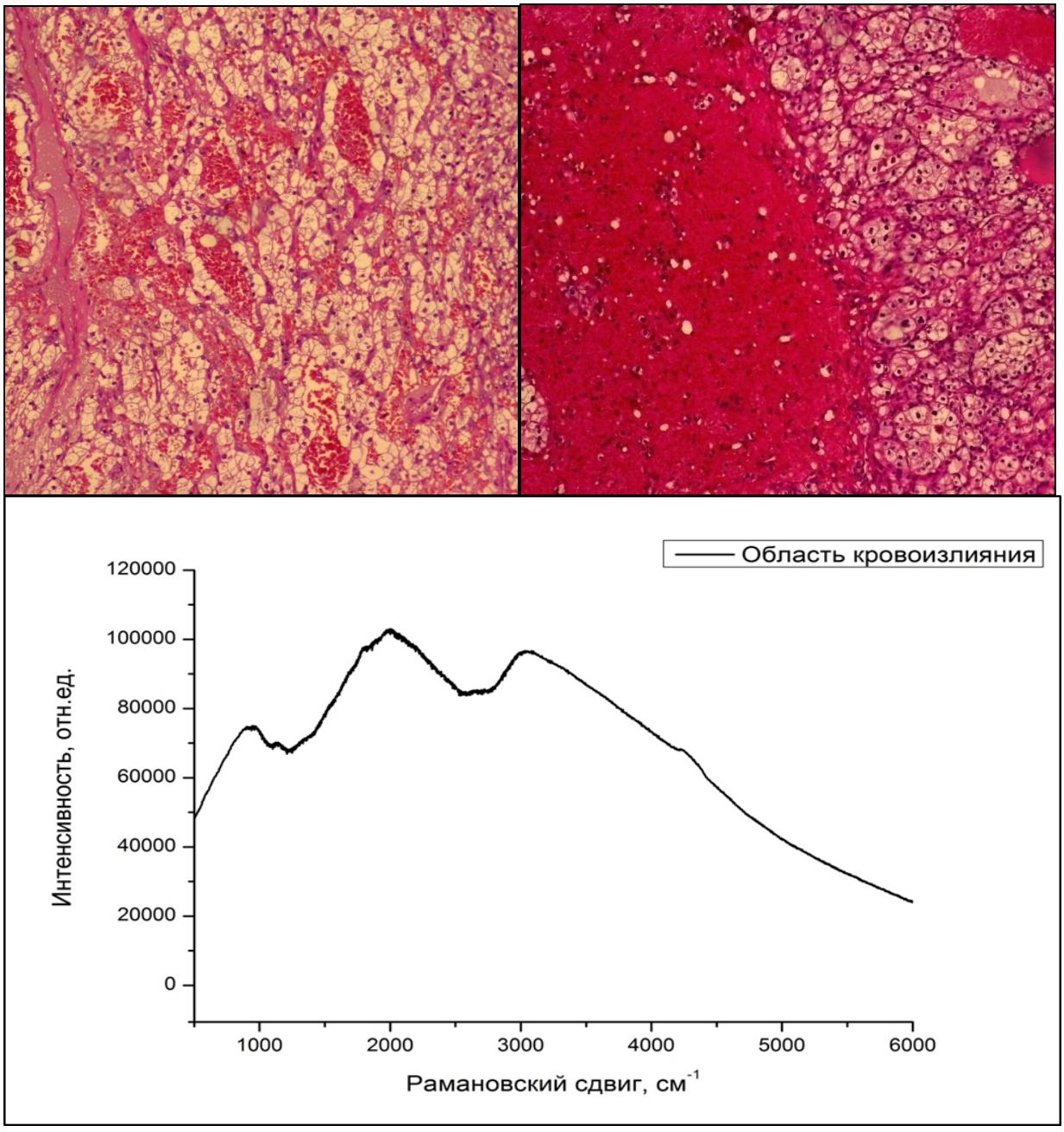


Рисунок 8. Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий участкам кровоизлияний. Характеризуется непостоянной причудливой формой и искажением положения локальных максимумов флуоресценции в связи с их высокой интенсивностью (свыше 80 тыс.отн.ед.).

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. В большинстве проксимальных и дистальных извитых канальцев на фоне значительного расширения их просвета были обнаружены интенсивные дистрофические (вакуольная дистрофия), атрофические и некробиотические изменения. В отдельных клубочках отмечали проявления фокального или тотального гломерулосклероза, либо умеренного гиалиноза капиллярных петель. 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, лишенные вышеописанных признаков, и соответствующие неизмененной паренхиме почки. Спектральные особенности данных образцов ткани характеризовались, с одной стороны, отсутствием рамановских пиков и, с другой стороны, еще большим снижением локального максимума флуоресценции ($2000 \pm 28{,}6$ см$^{-1}$), обусловленного флуоресценцией эндогенных порфиринов, свойственных опухолевым узлам (Рис.9).Еще одной характерной особенностью спектральной картины визуально неизмененной ткани почки были различия спектров, регистрируемых с полей склероза и участков неизмененной паренхимы. Они существенно отличались друг от друга как количеством, так и положением локальных максимумов в спектре флуоресценции. Особенно ярко это проявлялось при регистрации спектра с различных точек одного и того же участка, для чего необходимым условием было перемещение по нему лазерного луча. Сводный результат спектроскопического исследования образца светлоклеточного ПКР показан на рисунке 10.

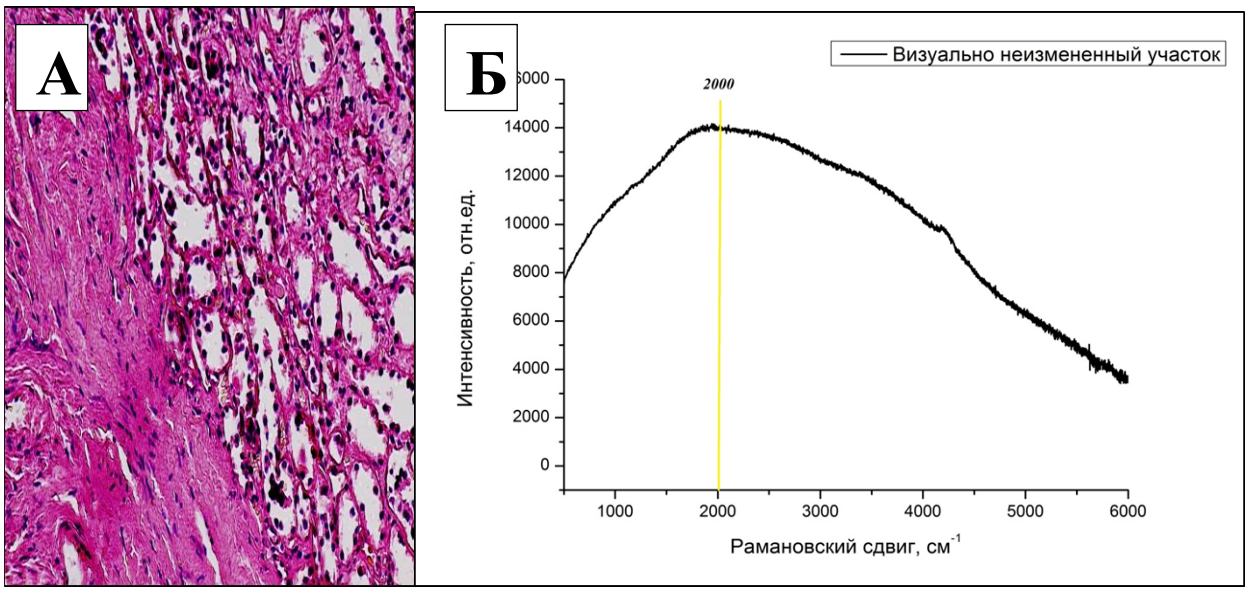


Рисунок 9. Результаты гистологического и спектроскопического исследований визуально неизмененной ткани почки в максимальной удалении от опухолевого узла А. В поле зрения некротические изменения извитых канальцев нефрона, участок широкого поля соединительной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х200. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий периферической области опухолевого узла. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией и соответствует флуоресценции эндогенных порфиринов (2000 $см^{-1}$). Рамановские пики отсутствуют.

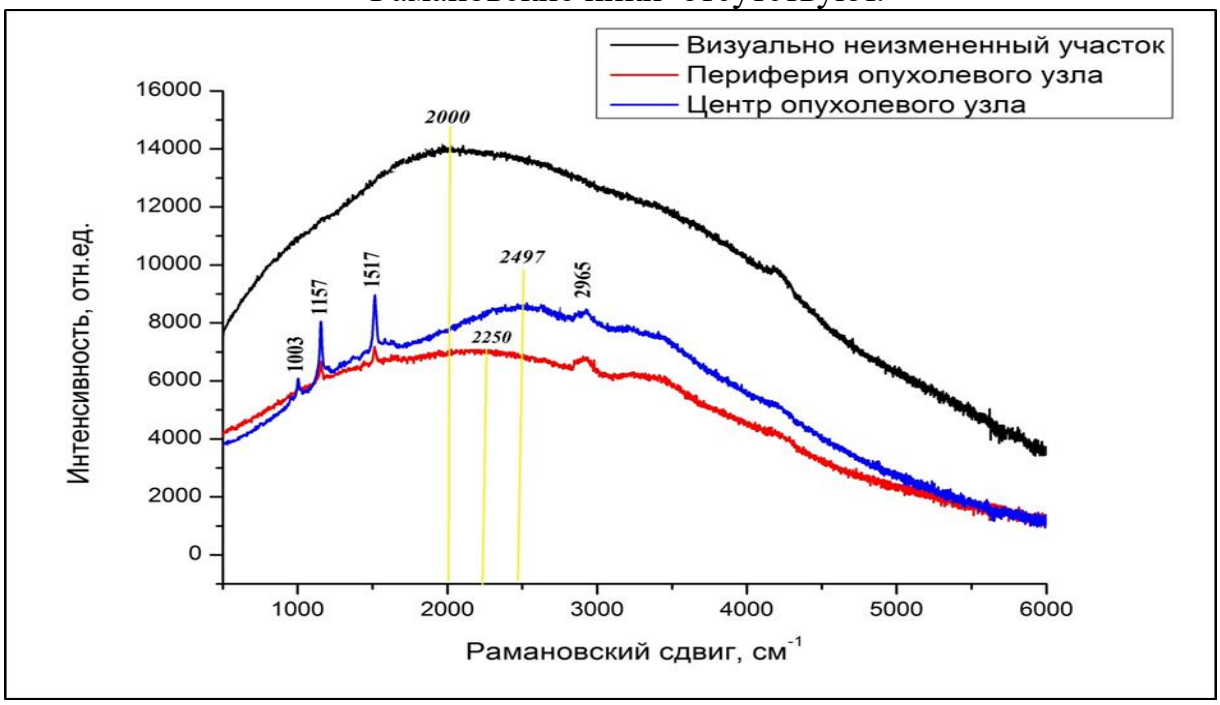


Рисунок 10. Сводный результат спектроскопического исследования образца светлоклеточного ПКР, G2 степени дифференцировки по Фурману. Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтыми вертикальными линиями. Рамановские пики обозначены числовыми значениями ($см^{-1}$).

3.1.1. Результаты иммуноморфологического и спектроскопического исследований образцов папиллярного почечно-клеточного рака

Во всех исследованных нами наблюдениях макроскопически опухоль имела вид узла, расположенного в 6 случаях в верхнем и в 4 случаях в нижнем полюсе правой почки. В отличие от светлоклеточных форм рака почки опухолевый узел имел нечеткие неровные границы, диаметр его варьировал от 1,0 до 4,8 сантиметров. Опухолевый узел локализовался преимущественно в корковом веществе почки, поверхность разреза имела белесовато-желтый вид, лишь в одном случае в массе опухоли был обнаружен участок некроза. Гистологическая картина в 7 случаях соответствовала 1 типу папиллярного рака и характеризовалась наличием множественных сосочковых структур, образованных мелкими компактно расположенными клетками, большинство из которых содержали мелкие ядра и наличием единичных ксантомных клеток. Раман-флуоресцентное спектроскопическое исследование 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.11.)

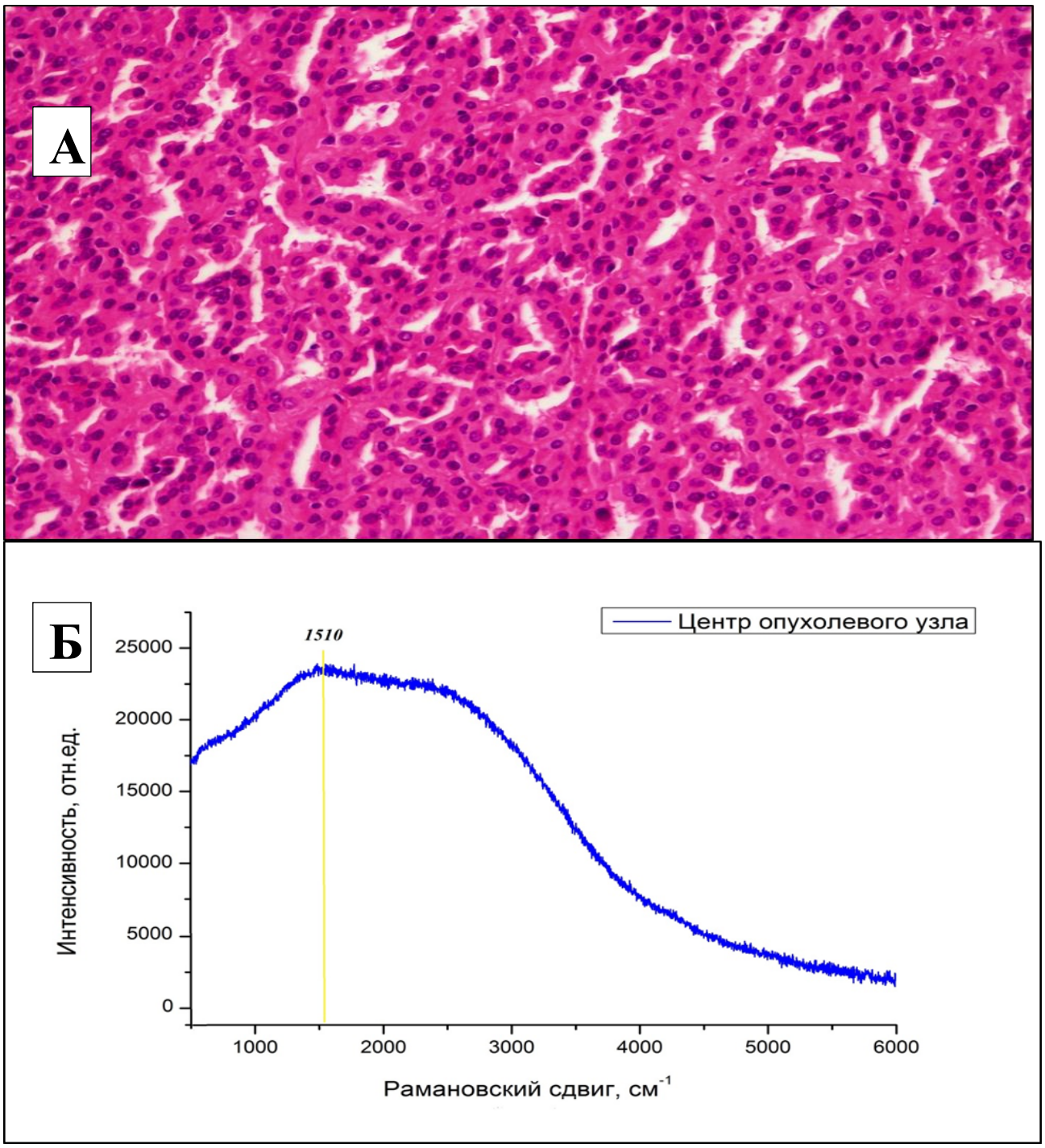


Рисунок 11. Результаты гистологического и спектроскопического исследований образца папиллярного варианта 1 типа ПКР в центральном участке опухолевого узла. А. Опухолевые клетки с небольшими ядрами образуют множественные сосочковые структуры (степень дифференцировки G1 по Фурману) Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х200. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий центральной области опухолевого узла. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией и соответствует суммарной флуоресценции липопигментов и флавинов (1510 $см^{-1}$). Рамановские пики отсутствуют.

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. 12) 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 (рис. 13).

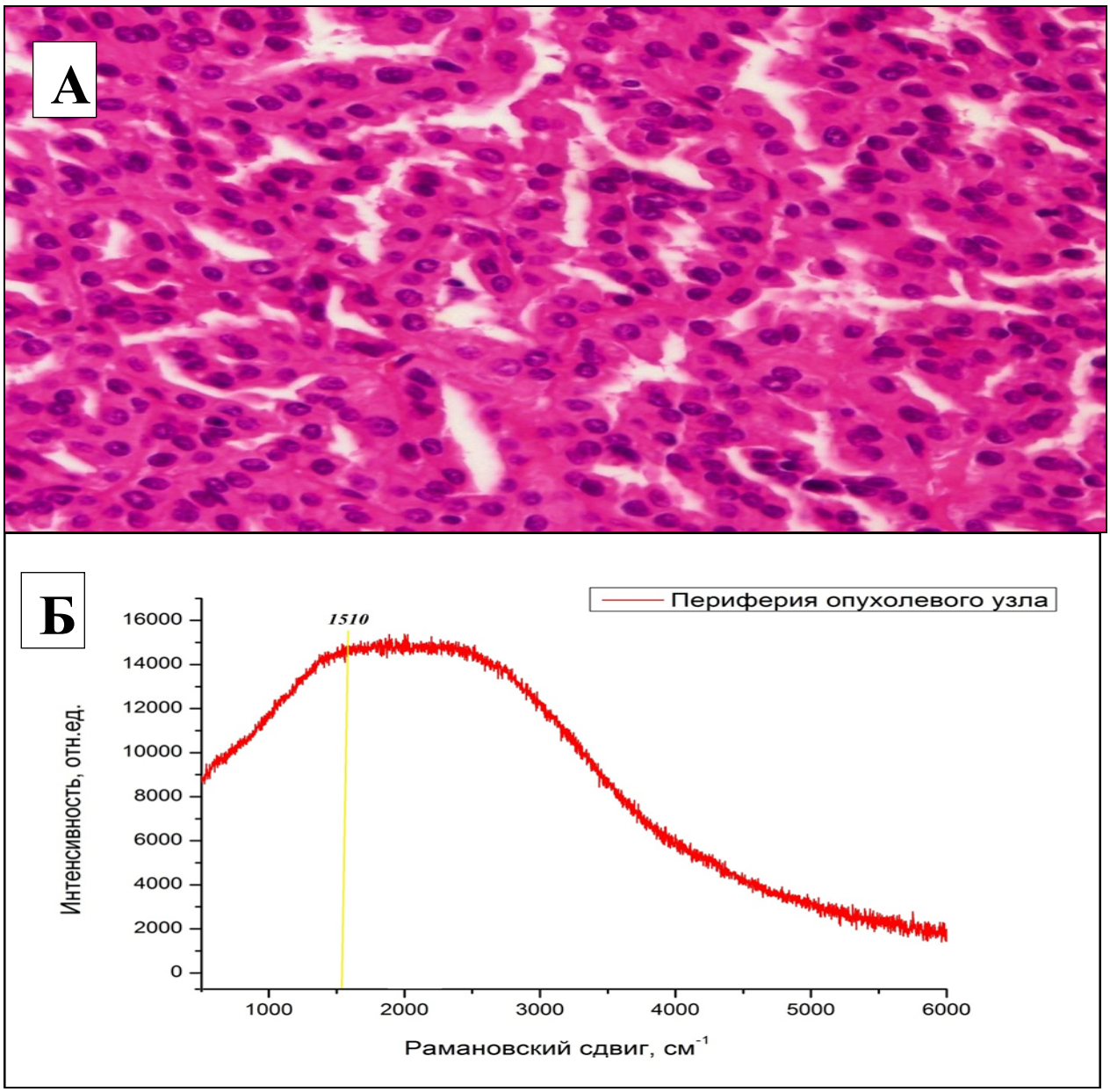


Рисунок 12. Результаты гистологического и спектроскопического исследований образца папиллярного варианта 1 типа ПКР в периферическом участке опухолевого узла. А. Опухолевые клетки с небольшими ядрами образуют множественные сосочковые структуры (степень дифференцировки G1 по Фурману) Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х200. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий периферической области опухолевого узла. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией и соответствует суммарной флуоресценции липопигментов и флавинов (1510 см-^{1}). Рамановские пики отсутствуют.

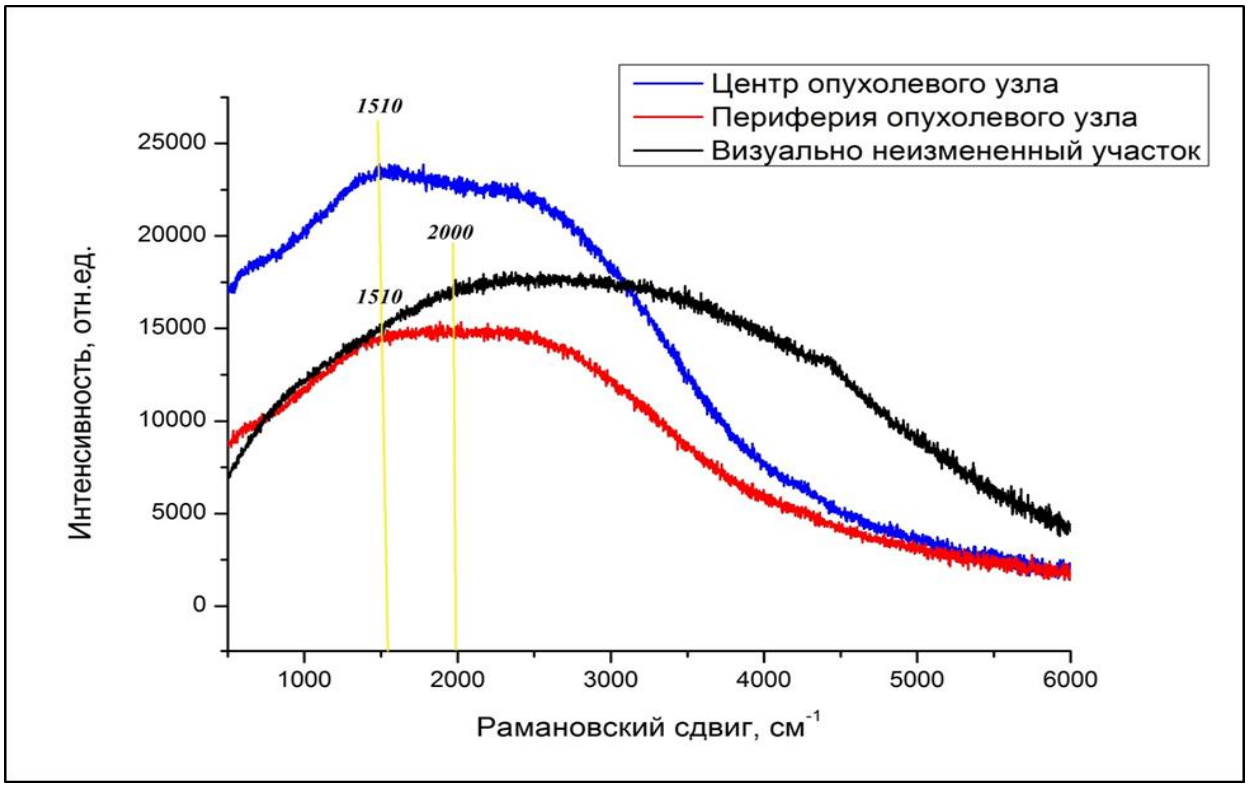


Рисунок 13. Сводный результат спектроскопического исследования образца папиллярного варианта 2 типа ПКР. Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтыми вертикальными линиями. Рамановские пики отсутствуют.

Папиллярный рак, отнесенный ко второму гистологическому типу характеризовался 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$\pm$2,52 $см^{-1}$ и был обусловлен флуоресценцией эндогенных порфиринов (рис. 14.). 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 центроузловым и по наличию рамановских пиков, и по их качественным характеристикам, а также по частоте рамановского сдвига и шкале интенсивности относительных единиц (рис. 15).

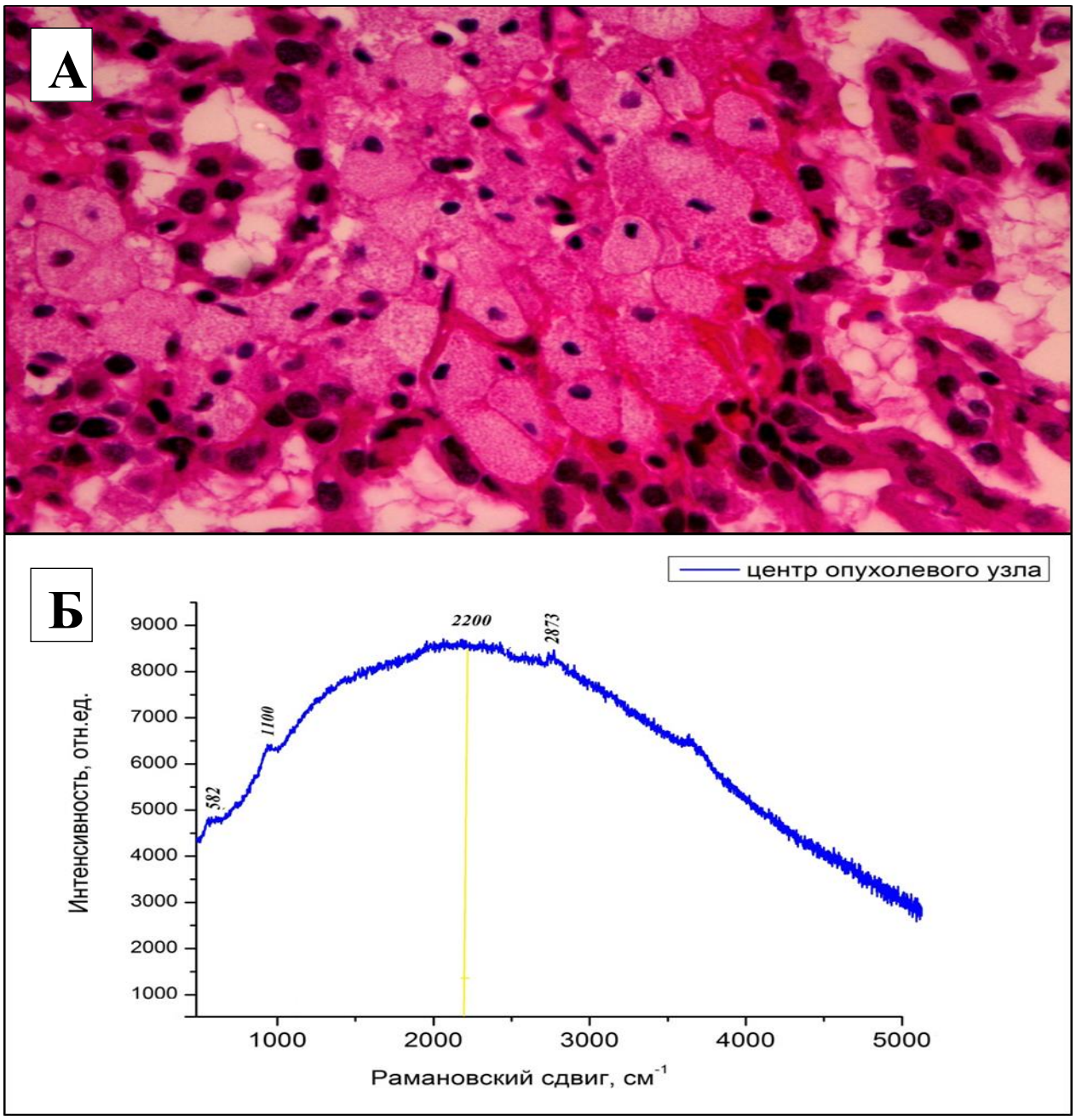


Рисунок 14. Результаты гистологического и спектроскопического исследований образца папиллярного варианта ПКР в центральном участке опухолевого узла. А. Опухолевые клетки с яркой эозинофильной цитоплазмой, гиперхромными ядрами, среди которых располагаются скопления ксантомных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х400. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий центральной области опухолевого узла. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией и соответствует флуоресценции эндогенных порфиринов (2200 $см^{-1}$). Рамановские пики обозначены числовыми значениями, соответствующие колебаниям молекул гидроксильного радикала (582 $см^{-1}$), жирных кислот (1100 $см^{-1}$), углеводородной связи липидов и белков (2873 $см^{-1}$).

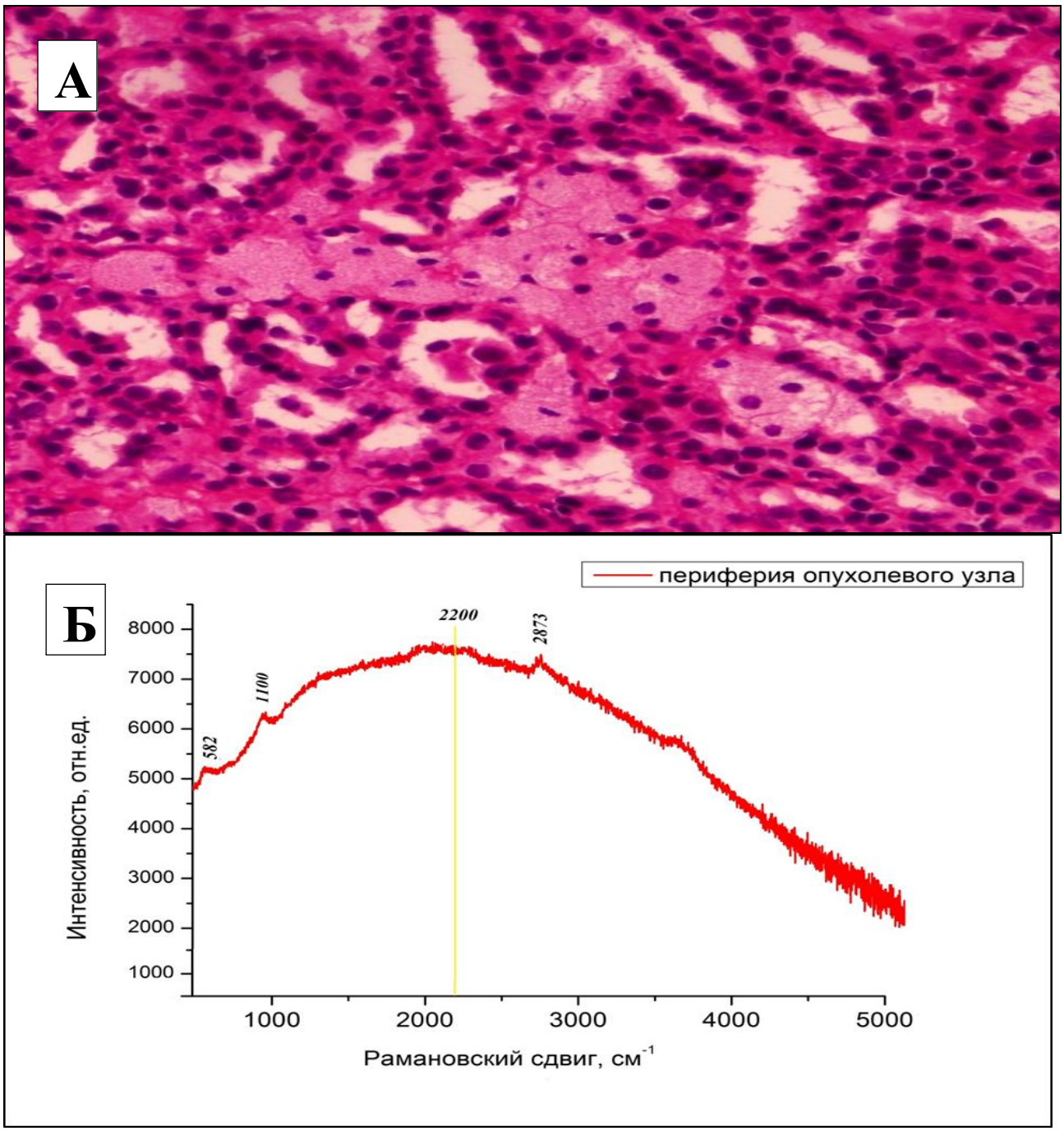


Рисунок 15. Результаты гистологического и спектроскопического исследований образца папиллярного варианта 2 типа ПКР в периферическом участке опухолевого узла. А. Опухолевые клетки с яркой эозинофильной цитоплазмой, гиперхромными ядрами, среди которых располагаются скопления ксантомных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х400. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий периферической области опухолевого узла. Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией и соответствует флуоресценции эндогенных порфиринов (2200 $см^{-1}$). Рамановские пики обозначены числовыми значениями, соответствующие колебаниям молекул гидроксильного радикала (582 $см^{-1}$), жирных кислот (1100 $см^{-1}$), углеводородной связи липидов и белков (2873 $см^{-1}$).

Как и в случаях с образцами светлоклеточного ПКР, результаты гистологического исследования также были подтверждены с помощью иммуногистохимического анализа с использованием антител к виментину, цитокератину (СК-7) и CD 10. В 7 случаях (70%) наблюдали выраженную положительную экспрессию всех трех маркеров и лишь в трех случаях только экспрессия маркера CD10 определялась умеренно положительной (Рис. 16) (Табл. 7)

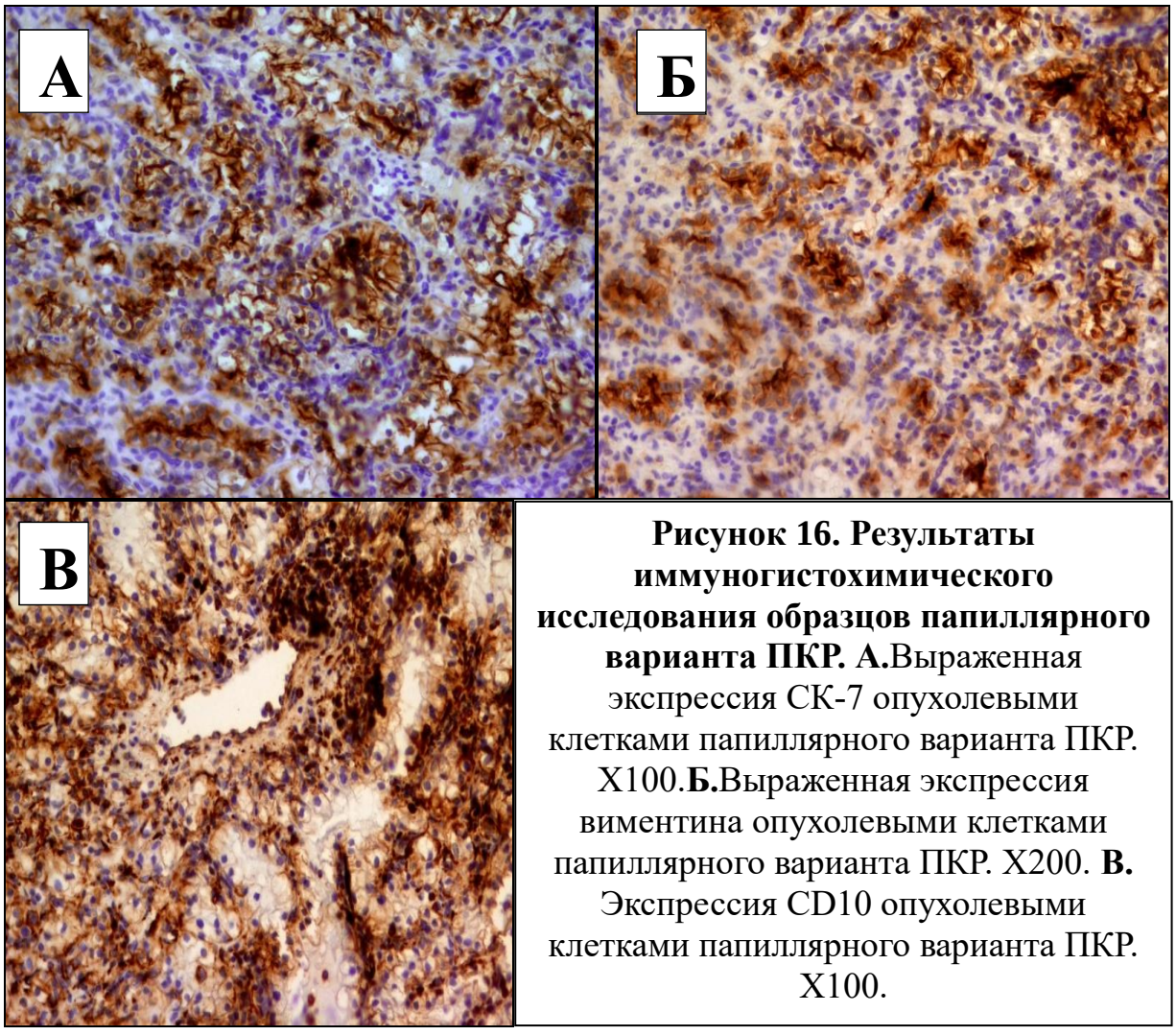


Рисунок 16. Результаты иммуногистохимического исследования образцов папиллярного варианта ПКР. А.Выраженная экспрессия СК-7 опухолевыми клетками папиллярного варианта ПКР. Х100.**Б.**Выраженная экспрессия виментина опухолевыми клетками папиллярного варианта ПКР. Х200. **В.** Экспрессия CD10 опухолевыми клетками папиллярного варианта ПКР. Х100.

Таблица 7. Результаты иммуногистохимического исследования образцов папиллярного ПКР.

Онкомаркер	Оценка экспресии	Образцы папиллярного ПКР (№=10)
Vim	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	0 0 0 10 (100%)
CD10	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	0 0 3 (30%) 7 (70%)
CK-7	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	0 0 5 (50%) 5 (50%)

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 проявления 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. 17).

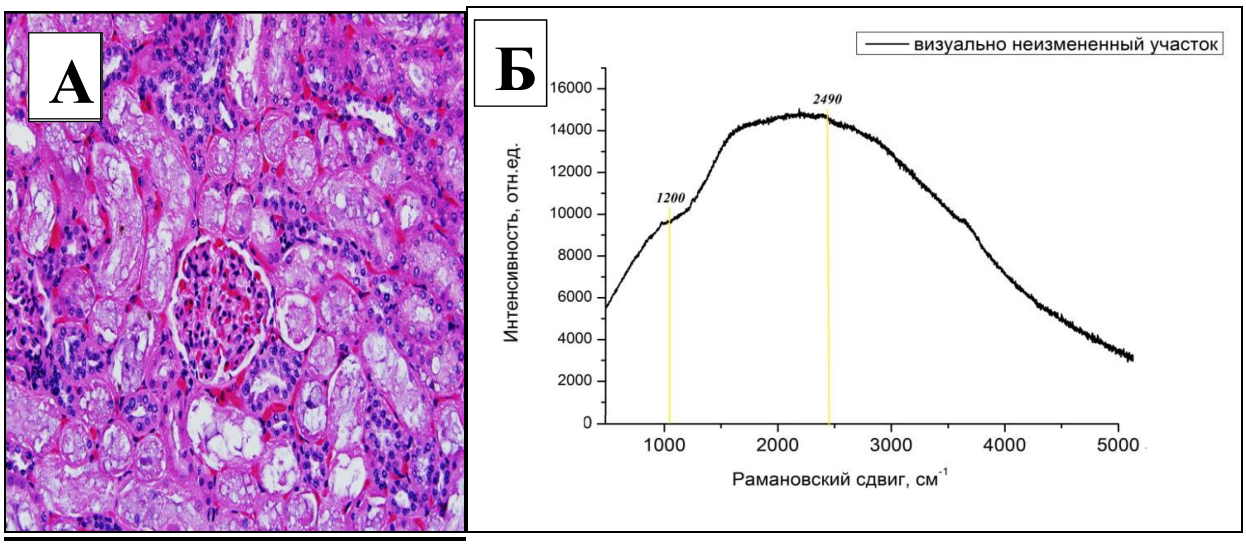


Рисунок 17. Результаты гистологического и спектроскопического исследований визуально неизмененной ткани почки в максимальной удалении от опухолевого узла папиллярного ПКР 2 типа

А. Большая часть извитых канальцев нефрона с явлением гидропической дистрофии эпителиоцитов, местами некроза. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х100. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий визуально неизмененной области в максимальном удалении от опухолевого узла. Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтой вертикальной линией и соответствуют суммарной флуоресценции липопигментов и флавинов (1200 $см^{-1}$) и флуоресценции эндогенных порфиринов (2490 $см^{-1}$). Рамановские пики отсутствуют.

3.3. Результаты иммуноморфологического и спектроскопического исследований образцов хромофобного почечно-клеточного рака

Во всех 8 случаях, исследованных в нашей работе, опухоль также имела вид узла белесовато-желтого вида с коричневым оттенком, расположенного в паренхиме почки на некотором отдалении от её капсулы. Таким образом, создавалось впечатление о локализации первичного опухолевого зачатка, имея в виду центр предполагаемой окружности, в интермедиарной зоне с последующим распространением в корковое и мозговое вещество почки и прорастанием в одном случае почечной лоханки. Опухолевый узел имел на разрезе дольчатый вид, причем дольки опухоли выбухали над поверхностью разреза, придавая ей неровный мелкобугристый вид. В 4 случаях классического варианта хромофобного рака [8] 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 трех случаях и умеренно положительную экспрессию СК-7, что согласовывается с диагнозом хромофобного ПКР (Рис. 18) (Табл. 8).

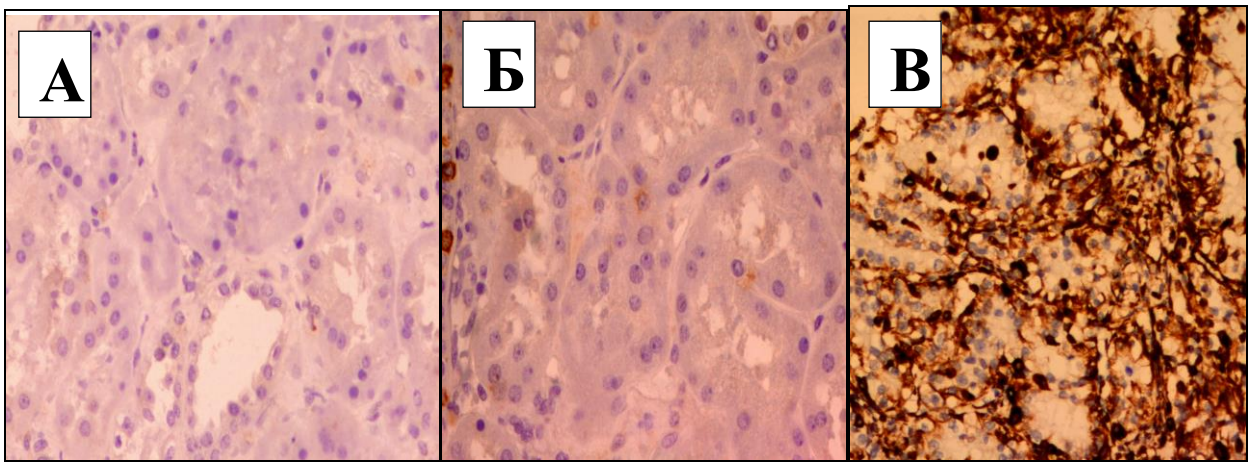


Рисунок 18. Результаты иммуногистохимического исследования образцов хромофобного варианта ПКР. А.Отсутствие экспрессии виментина опухолевыми клетками папиллярного варианта ПКР. Х200.**Б.** Отсутствие экспрессии CD10 опухолевыми клетками хромофобного варианта ПКР. Х200. **В.** Экспрессия СК-7 опухолевыми клетками хромофобного варианта ПКР. Х100.

Таблица 8. Результаты иммуногистохимического исследования образцов хромофобного ПКР.

Онкомаркер	Оценка экспресии	Образцы хромофобного ПКР (№=8)
Vim	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	8 (100%) 0 0 0
CD10	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	6 (75%) 2 (25%) 0 0
СК-7	0 1+ (<10%) 2+ (10-20%) 3+ (>21%)	0 0 3 (37,5%) 5 (62,5%)

Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий центральной части опухолевого узла характеризовался отсуствием 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. 19).

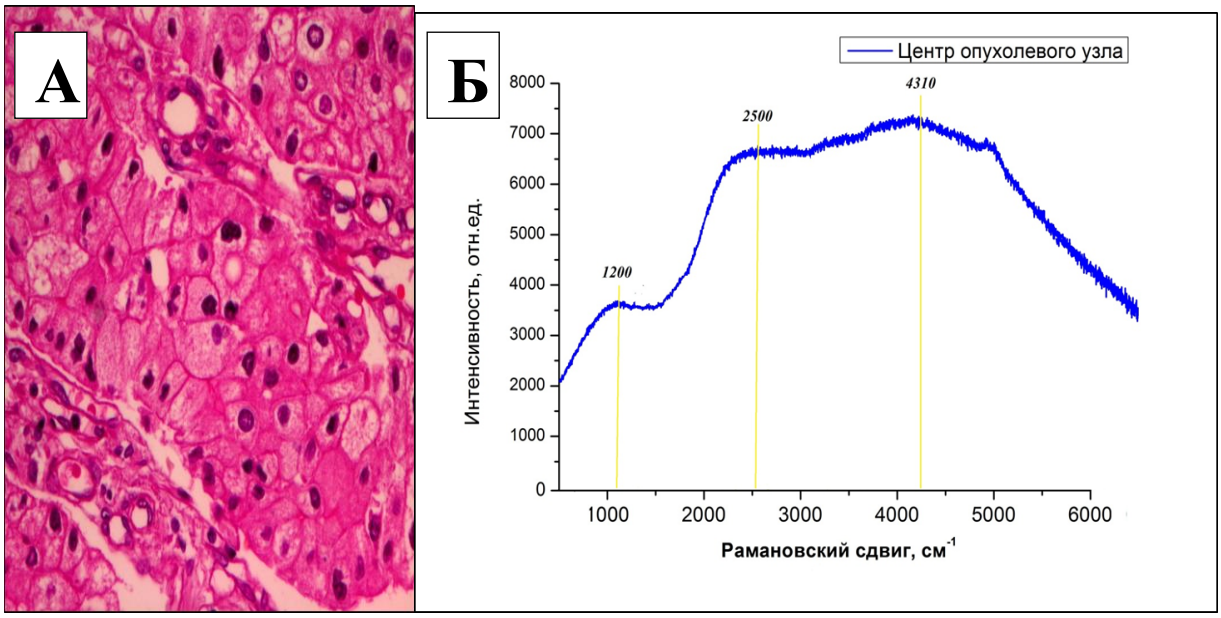


Рисунок 19. Результаты гистологического и спектроскопического исследований образца хромофобного варианта ПКР классического типа в центральном участке опухолевого узла

А. Опухоль состоит из крупных полиморфных клеток с бледной цитоплазмой. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х400. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий центральной области опухолевого узла. Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтой вертикальной линией, соответствующие точкам 1200 см-1 (суммарная флуоресценция липопигментов и флавинов), 2500 см-1 и 4310 см-1 (флуоресценция эндогенных порфиринов). Рамановские пики отсутствуют.

Периферические отделы опухолевого узла имели ряд особенностей по сравнению с центроузловыми, выявляемыми как на светооптическом, так и на спектроскопическом уровнях. В 4 случаях, отнесенных к классическому варианту, в этих отделах мелкие полиморфные клетки преобладали над крупными, причем последние располагались неупорядоченно. По нашему мнению всё это имело место быть вследствие выраженного отека опухолевой стромы на периферии узла.

Спектроскопически начало флуоресценции имело большие значения относительных единиц (2500±15,95 по сравнению с 2000±36,02), локальный максимум флуоресценции липопигментов и флавинов соотвествовал 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 $см^{-1}$ и 3125±49,74 $см^{-1}$) (Рис. 20).

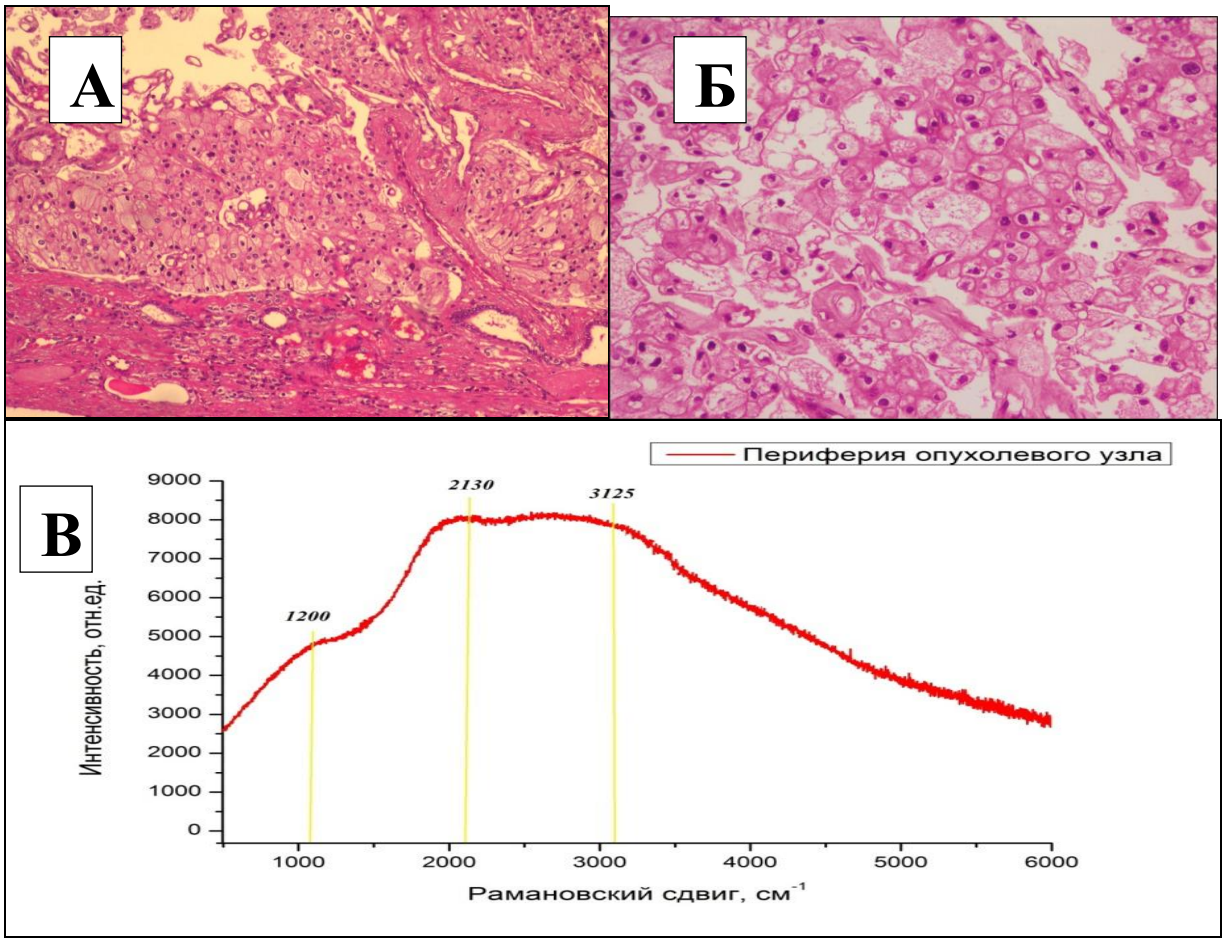


Рисунок 20. Результаты гистологического и спектроскопического исследований образца хромофобного варианта ПКР классического типа в периферическом участке опухолевого узла. А. Опухоль состоит из крупных полиморфных клеток с бледной цитоплазмой. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х200. **Б.** Раман-флуоресцентный спектр, соответствующий периферическоой области опухолевого узла. Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтой вертикальной линией, соответствующие точкам 1200 $см^{-1}$ (суммарная флуоресценция липопигментов и флавинов),, 2130 $см^{-1}$ и 3125 $см^{-1}$ (флуоресценция эндогенных порфиринов). Рамановские пики отсутствуют.

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 относительных единиц) и локальные максимумы флуоресценции в точках рамановского сдвига 1200±11,32 $см^{-1}$ и 2130+19,14 $см^{-1}$, обусловленные флуоресценцией липидов и флавинов и эндогенных порфиринов соответственно (Рис. 21).

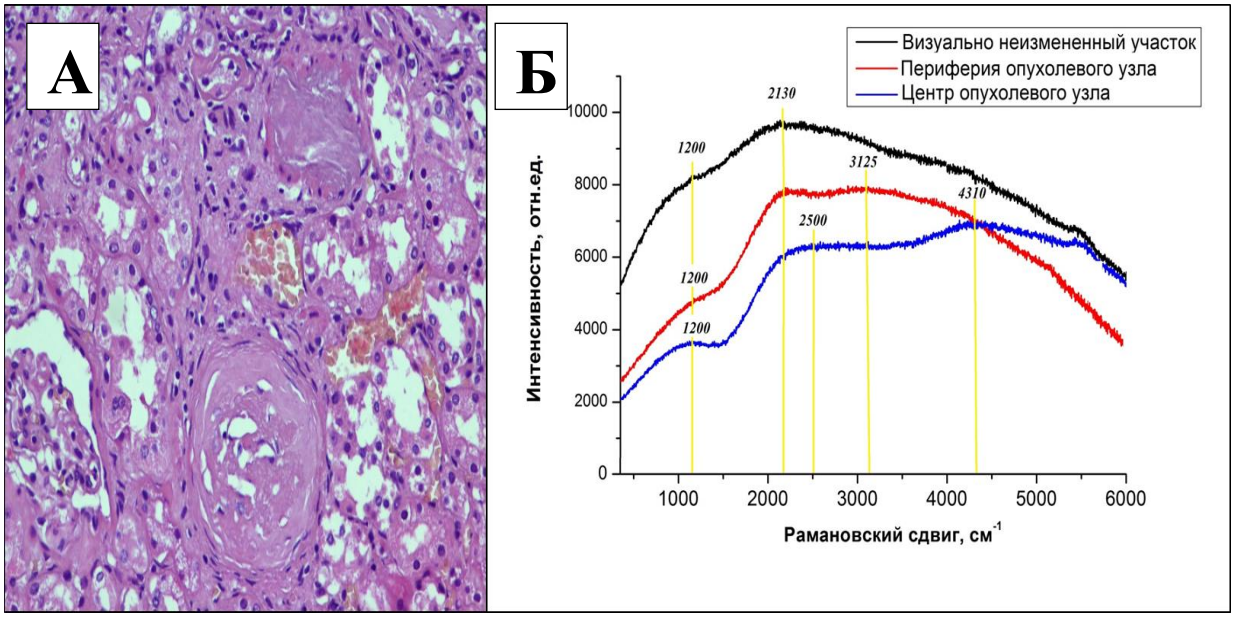


Рисунок 21. Результаты гистологического и спектроскопического исследований визуально неизмененной ткани почки в максимальной удалении от опухолевого узла хромофобного ПКР классического типа. **А.** В поле зрения дистрофическиее изменения извитых канальцев нефрона, атрофия и склероз клубочков. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х200. **Б.** Сводный результат спектроскопического исследования образца хромофобного варианта ПКР классического типа. Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтыми вертикальными линиями.

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. 22), причем данная характеристика оказалась свойственной как центроузловым, так и периферическим участкам. Эта особенность проявилась и при спектроскопическом исследовании. 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.23).

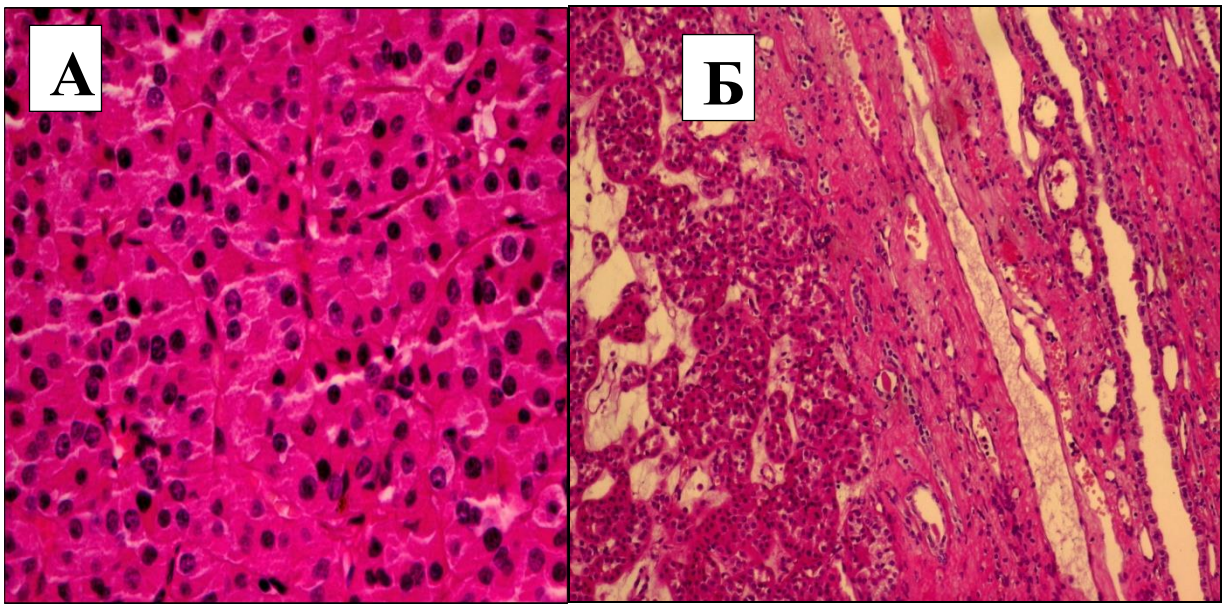


Рисунок 22. Результаты гистологического исследования образца хромофобного эозинофильного варианта ПКР.
А. Крупные мономорфные опухолевые клетки с яркой эозинофильной цитоплазмой. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х400. Центр опухолевого узла. **Б.** Периферия опухолевого узла. Окраска гемотоксилин и эозин. Ув.Х100.

Спектр участка интактной ткани почки, находящегося на максимальном удалении от опухолевого узла, тоже во многом походил на спектры опухоли, однако имел различия по значению начальной флуоресценции и наличию только одного локального максимума флуоресценции (Рис.23).

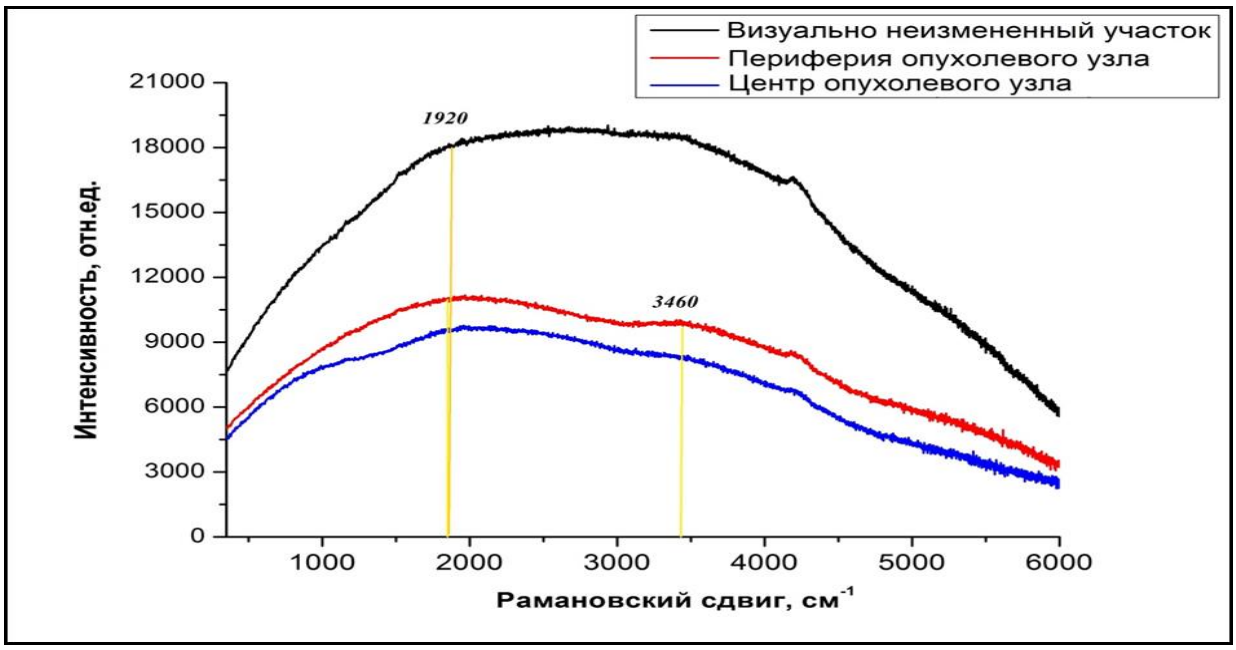


Рисунок 23. Сводный результат спектроскопического исследования образца хромофобного варианта ПКР эозинофильного типа. Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтыми вертикальными линиями.

3.3. Результаты морфологического и спектроскопического исследований образцов контрольной группы.

Как уже было отмечено в разделе, касающемся описания материала и методов исследования, образцы ткани почек 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 той или иной патологией. При макроскопическом исследовании почки характеризовались обычными размерами и формой. Капсула во всех случаях снималась легко, обнажая гладкую поверхность почки. На разрезе граница коркового и мозгового вещества была четкой, интермедиарная зона без особенностей. Гистологически во всех исследованных случаях признаки патологии на светооптическом уровне отмечены не были (Рис. 24). 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 по оси относительных единиц. Локальные максимумы флуоресценции, обусловленные суммарной флуоресценцией липопигментов и флавинов и эндогенных порфиринов характеризовались относительно невысокими значениями (970+9,42 см-1, 1130+10,25 см-1 и 2000+13,54 см-1 соответственно) (Рис. 25).

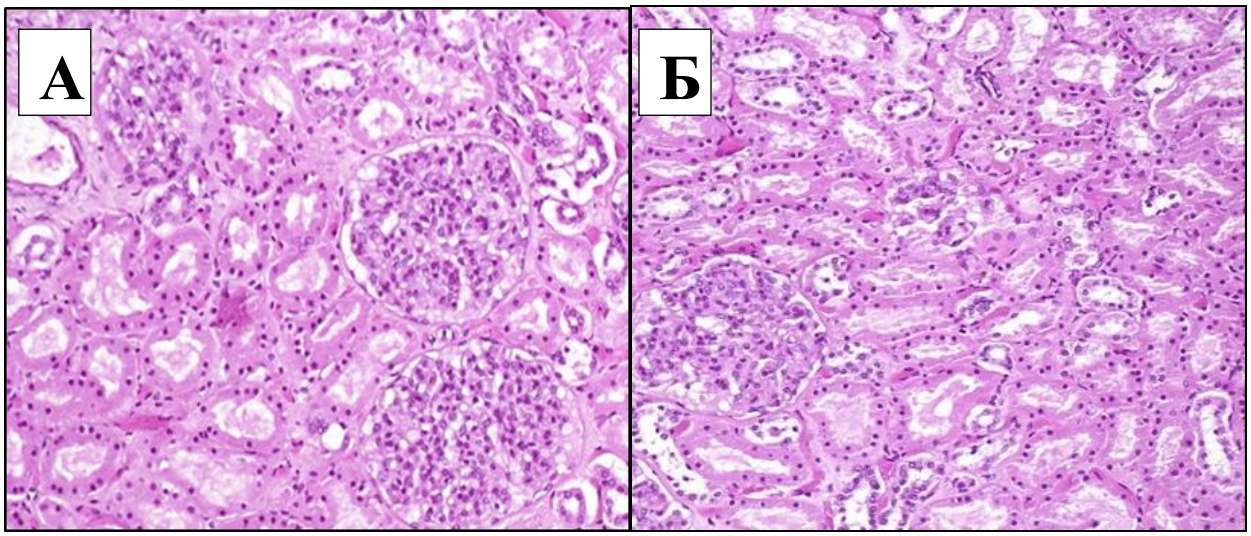


Рисунок 24. Результаты гистологического исследования сохранной почечной ткани из разных участков образца из группы контроля. **А.** Сохранные участки в пределах нормы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.Х100. **Б.** Другая область исследования. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.Х100

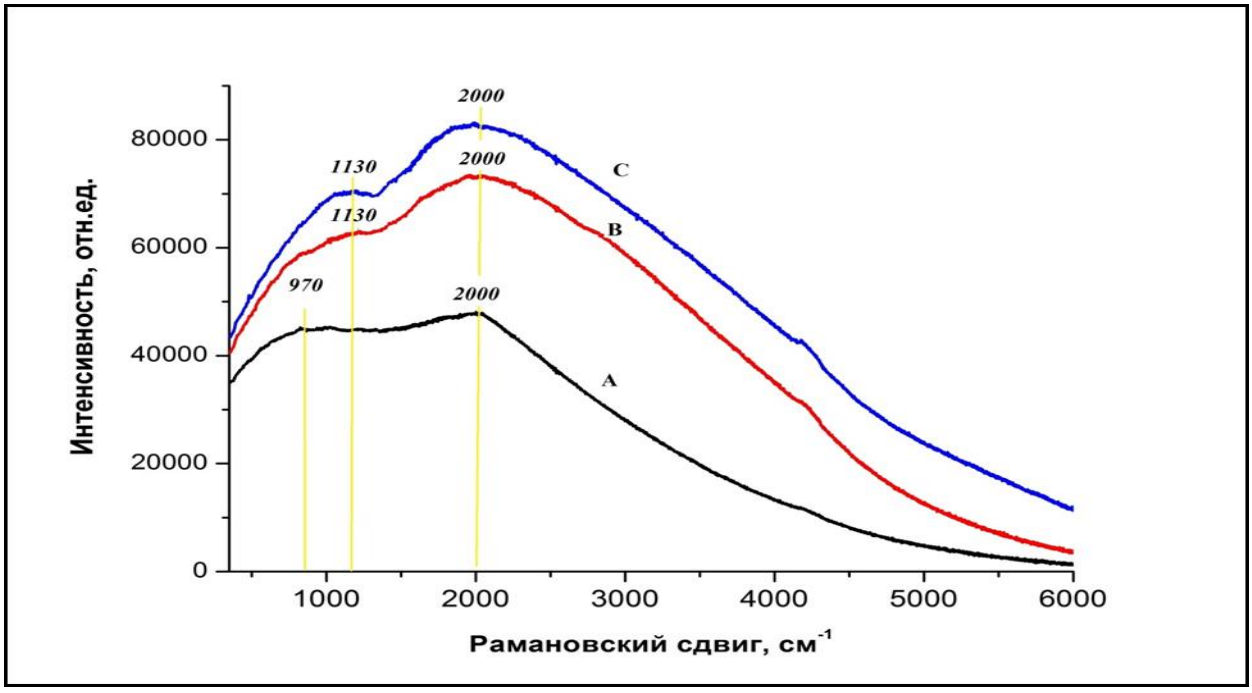


Рисунок 25. Сводный результат спектроскопического исследования образца из группы контроля из 3х участков (A, B, C). Локальные максимумы флуоресценции обозначены желтыми вертикальными линиями и соответствуют точкам: 970 см-1, 1130 см-1 (суммарная флуоресценция липопигментов и флавинов) и 2000 см-1 (флуоресценция эндогенных порфиринов).

3.4. 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 метода 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. 26). 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.

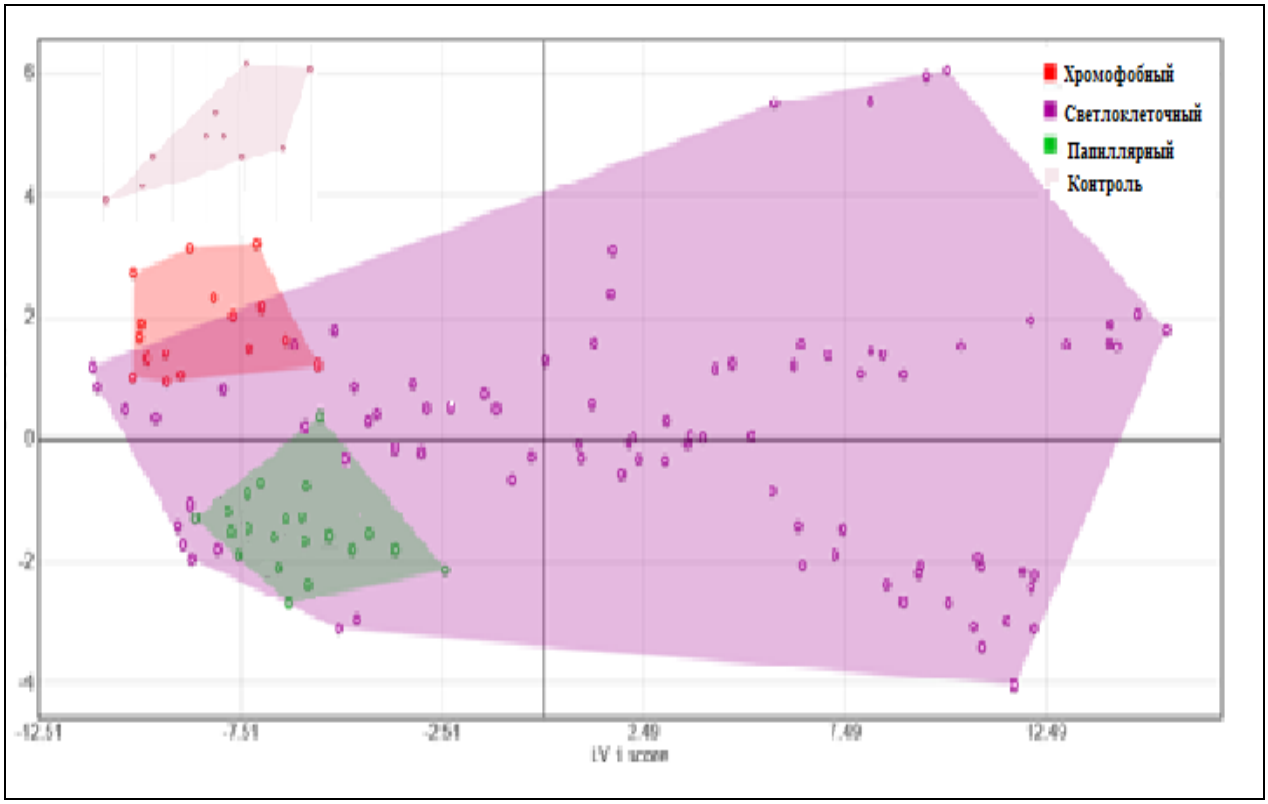


Рисунок 26. Разделение спектров образцов различных вариантов ПКР и образцов группы контроля при помощи метода PLS-DA.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Планируя настоящее исследование, нами всесторонне и тщательно был рассмотрен существующий в настоящее время алгоритм дооперационной диагностики различных опухолей почек. В результате было установлено, что несмотря на кажущееся обилие различных инструментальных, лабораторных, морфологических методов исследования, ни один из них не дает исчерпывающего и окончательного заключения о природе и гистогенезе опухоли, степени её зрелости, распространенности. Значительная часть применявшихся ранее методов и технологий в настоящее время исчерпала свой диагностический ресурс.

Вышедшее в 2011 году руководство «Опухоли почки. Медицинская диагностика и генетика» под редакцией Ю.Ю. Андреевой, Г.А. Франка значительно восполнило существовавший пробел в диагностике, предложив более или менее полное описание и характеристику различных опухолей почки в контексте современных классификаций [8]. Вместе с тем необходимость получения быстрого результата в режиме реального времени побуждают исследователей к поиску новых эффективных диагностических технологий. Исходя из этого, нами была предпринята попытка определить роль и значение метода рамановской спектроскопии в дооперационной, а впоследствии и интраоперационной диагностике некоторых опухолей почек. Механизм рамановской спектроскопии сводится к тому, что при взаимодействии лазерного света с изучаемой тканью происходят процессы рассеяния света, связанные с наличием в органических веществах большого количества колебательных и вращательных энергетических подуровней. В дальнейшем все рассеянные фотоны регистрируются CCD-детектором рамановского спектрометра и спектр рассеянного излучения в виде зависимости интенсивности от длины волны рассеянного света отображается компьютером. Поскольку в органических молекулах имеется большое

количество вращательных и колебательных степеней свободы, то они проявляются в спектре рамановского рассеяния света в виде набора линий, каждая из которых характеризуется индивидуальным спектральным положением и относительной интенсивностью [99]. Именно этот набор спектральных характеристик дает возможность говорить о рамановском «отпечатке пальцев» органической молекулы и позволяет проводить анализ веществ и расшифровывать состав их комбинаций. Рамановская спектроскопия имеет значительные преимущества по сравнению с другими диагностическими технологиями. Важнейшими из них являются простота пробоподготовки и больший объем получаемой информации. Рамановская спектроскопия относится к технологиям, основанным нарассеянии света, поэтому все, что требуется для сбора спектра – это направить падающий луч точно на образец, а затем собрать рассеянный свет. Данный вид исследования тканей не требует специальной подготовки образца и нечувствителен к полосам поглощения органических веществ, так как рамановский эффект наблюдается в рассеянном свете от образца, а не в спектре поглощения образцом света. Это свойство рамановской спектроскопии облегчает процесс непосредственного измерения как в твердых образцах, так и жидких и газообразных средах [95]. Кроме того, рамановская спектроскопия сочетает в себе по существу два хотя и родственных, но отличающихся по физической сути, метода флуоресценции и спектроскопии комбинационного рассеяния, и это обстоятельство расширяет её диагностические возможности. Исходя их этого, при оценке регистрируемых с образца почечной ткани значений, нами были приняты во внимание и использованы следующие показатели: общий вид и особенности раман-флуоресцентного спектра; значения начальной (инициальной) интенсивности и локального максимума флуоресценции, а также суммарной и остаточной флуоресценции выражающиеся в относительных единицах флуоресценции; оценка рамановских пиков на спектре, соответствующих колебаниям молекул различных веществ, патогномоничных для изучаемых опухолей и значение рамановского сдвига,

регистрируемого на оси абсцисс. Таким образом, даже в отсутствии рамановских пиков представляется возможным решить поставленную задачу по определению существа той или иной опухоли.

В основу работы положено обследование 85 пациентов с почечноклеточным раком, находившихся на обследовании и лечении в НИИ Уронефрологии и репродуктивного здоровья Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России в период с мая 2014 г. до ноября 2017 г. Раман-флуоресцентная спектроскопия осуществлялась на операционном материале, полученном в ходе частичной резекции почки или радикальной нефрэктомии, предварительно фиксированым в 10% растворе формалина до проведения морфологического исследования. Далее, на том же материале, проводилось гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследования, в ходе которых было отобрано несколько вариантов ПКР - светлоклеточный, папиллярный и хромофобный, каждый из которых был отнесен к отдельной исследуемой группе. Помимо образцов опухолевой ткани, соответствующей ПКР, аналогичному алгоритму исследования подвергали участки визуально неизмененной ткани почки в максимальном отдалении от опухолевого узла. Контрольную группу составили образцы почечной ткани, полученные от 10 лиц, умерших в возрасте до 40 лет от несчастного случая, клинически и морфологически не имевших признаков почечной патологии.

Раман-флуоресцентные спектры образцов светлоклеточного рака характеризовались умеренными значениями начальной (инициальной) флуоресценции, нарастающей по направлению от центра к периферии опухоли (3950 и 4250 отн.ед. соответственно), в то же время интенсивность локального максимума имела, наоборот, тенденцию к снижению, как по значению интенсивности (8300 и 7000 отн.ед. соответственно), так и по частоте рамановского сдвига (2497 $см^{-1}$ и 2250 $см^{-1}$ соответственно). Однако локальный максимум в обоих случаях был обусловлен суммарной флуоресценцией эндогенных порфиринов. Причины повышенного накопления эндогенных порфиринов в патологически измененных

биологических тканях вызывает в настоящее время много споров. Увеличение концентрации порфиринов может объясняться жизнедеятельностью анаэробной микрофлоры в тканях, либо общим нарушением цикла синтеза гема в организме и переносом порфиринов с током крови. Большая часть авторов, основываясь на фактах значительного накопления порфиринов в эмбриональных и злокачественных опухолевых тканях, полагает, что синтез порфиринов происходит непосредственно в клетках, обладающих повышенной пролиферативной активностью. Это дало основания полагать наличие возможности применения спектроскопии для неинвазивной дифференцировки злокачественных и доброкачественных новообразований, и даже послужило импульсом к созданию для этого диагностической аппаратуры, а в зарубежной литературе стал часто употребляться в связи с этим новый специальный термин – оптическая биопсия тканей. Оценивая роль порфиринов, как возможных катализаторов ряда окислительно- восстановительных реакций, в на большом эмпирическом материале показано, что в условиях начинающегося анаэробиоза на ранних стадиях роста опухоли повышение уровня накопления порфиринов в клетках является одним из звеньев в компенсаторных реакциях организма. Запускаемый же интенсивный синтез порфиринов, можно рассматривать как некую «аварийную» ответную реакцию всего организма на развивающийся при опухолевом росте анаэробный гликолиз. С другой стороны, уменьшение содержания порфиринов в тканях на терминальных стадиях раковой интоксикации свидетельствует об угнетении их возможной мобилизации в условиях пониженной реактивности и истощения компенсаторного механизма.

Если флуоресценция эндогенных порфиринов является в какой то степени неспецифическим показателем, спектры светлоклеточного рака, кроме того, имели характерные особенности в виде набора специфических своеобразных рамановских «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 наличию фенилаланина, 1157$см^{-1}$–метионина, 1517$см^{-1}$ и 2965$см^{-1}$ различным модификациям бета-каротина (данное сочетание рамановскиз пиков отмечено в 100% случаев). Интенсивность флуоресценции в месте нахождения на спектре первого пика (фенилаланина) составляла примерно 6000 отн. ед. и далее неуклонно нарастала, достигая значения 8000 отн. ед. (метионин) и пика 9000 отн.ед. (в-каротин), а впоследствии незначительно снижалась до 8200 отн.ед.

Появление подобных пиков и идентификация фенилаланина, метионина и в-каротинов при раке почки выглядит вполне убедительным. Как фенилаланин, так и метионин являются незаменимыми аминокислотами. Фенилаланин, являющийся предшественником тирозина, по существу представляет собой аланин, в молекуле которого фенильный радикал замещает один водород метильной группы. Констатация метионина на рамановском сдвиге позволяет предположить наличие еще, как минимум, двух соединений холина и креатина, участвующих и связанных в реакциях переноса метильной группы. Очевидно, повышение концентрации этих соединений и аминокислот объясняется усилением синтеза как онкобелков, так и свойственных опухолевым клеткам эмбиональных белков, происходящего в опухолевом узле. Каротины не принимают участие в формирование опухолевых и эмбриональных белков, являясь пигментами и провитаминами. β-каротин считается клинически и биологически активным из всех каротинов и отличается от других форм большим содержанием колец β-ионона. Каротиноиды 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 концентрации, что и зарегистрируется спектроскопически.

При дальнейшем сопоставлении значений интенсивности рамановских пиков

с морфологическими особенностями образцов светлоклеточного рака, гистологическая архитектоника опухоли не корреспондировала с интенсивностью рамановских пиков, которая отражает концентрацию определенных веществ в ткани опухоли. И, наоборот, изучение спектральных характеристик светлоклеточного варианта ПКР позволило распределить образцы по рубрикам согласно шкале Фурмана в зависимости от степени дифференцировки (G1-G4). В этом случае в качестве значения интенсивности рамановского рассеяния, выражавшегося в относительных единицах, была использована суммарная высота самого рамановского пика. Во всех случаях значения интенсивности рамановского исследования высоко- и умереннодифференцированных гистологических форм (G1) было в разы выше по сравнению с низкодифференцированными формами (G4), что конкретно выражалось по фенилаланину следующим образом: 427,1+41,54 отн.ед. (G1) – 118,3 + 23,17 отн.ед. (G4), по метионину 1435,2 + 103, 28 отн.ед. (G1) – 413,7 _ 64,5 отн.ед. (G4), по β-каротину 1975,3 +197,58 отн.ед. (G1) – 303,7+58,32 отн.ед.(G4).

Учитывая неоднородность строения опухолевых узлов, полученные раман-флуоресцентные спектры светлоклеточного ПКР не всегда характеризовались единой графической конфигурацией, среди них особенно выделялись «одногорбые» спектры с высокими значениями интенсивности флуоресценции (>50 тыс. отн.ед.), с отсутствием рамановских пиков. Подобная спектроскопическая картина соответствовала участкам стромы и сосудистым стенкам, что определило дальнейшее морфологическое исследование. Кроме того, для светлоклеточного ПКР весьма типичным является наличие вторичных изменений в виде некрозов и кровоизлияний, что также характеризовалось специфическими спектральными «отпечатками». Участки кровоизлияний, морфологически определяемые скоплением эритроцитов, характеризовались интенсивностью максимальной флуоресценции выше 120 тыс. отн. ед., при отсутствии пиков рамановского рассеяния, причудливой формой с множественными локальными

максимумами. Участки некрозов, напротив, соответствовали низким значениям интенсивности флуоресценции (ниже 1000 отн. ед.) спектра, с множественными линиями по всей протяженности спектра (т.н. «шумы»).

Что касается значений остаточной флуоресценции, то как в центре, так и периферических отделах опухоли они были существенно выше всех используемых в исследовании показателей, включая начальную (инициальную) флуоресценцию, и не превышали 1700 отн.ед. В участках почечной ткани, максимально удаленных от опухолевого узла, не аминокислот, ни каротинов в виде рамановских пиков не определялось.

Все варианты как папиллярного, так и хромофобного рака, за исключением папиллярного рака второго типа, не имеют в спектре рамановских пиков, однако для их диагностики достаточным по нашему мнению является оценка и трактовка показателей значений инициальной, суммарной флуоресценции и частоты рамановского сдвига локального максимума. Локальных максимумов, как правило, регистрируется несколько, и они возникают как результат суммарной флуоресценции эндогенных порфиринов, а также липидогенных пигментов, липидов и флавинов. Это обстоятельство также объяснимо, поскольку в спектрах люминесценции тканей старых животных и людей, а также мышечной ткани больных, страдающих злокачественными новообразованиями различной локализации, кроме полос излучения восстановленных пиридиннуклеотидов и окисленных флавопротеинов появляется дополнительная полоса излучения с максимумом 560-565 нм. В том случае, когда липофусцин занимает значительную часть поля зрения, этот максимум увеличивается и становится преобладающим в спектре. Возможно, что люминесценция липофусциновых гранул обязана своим происхождением каротиноидам, являющимися важнейшей составной частью этих гранул. Спектры люминесценции отдельных гранул липофусцина состоят из полос люминесценции нескольких соединений. Вариации относительных интенсивностей этих полос определяют форму результирующего спектра

люминесценции. Основной максимум при этом совпадает с максимумом спектра люминесценции раствора β-каротина в масле. При этом не исключена возможность, что среди входящих в состав липофусциновых гранул люминесцирующих соединений имеются и переокисленные ненасыщенные жирные кислоты. Спектр папиллярного рака второго типа, напротив, имел специфические рамановские пики, обусловленных молекулами гидроксильного радикала (582 $см^{-1}$), комплекса жирных кислот (1100 $см^{-1}$) и идентифицировал углеводородную связь липидов и белков на частоте рамановского сдвига 2873 $см^{-1}$. Как известно, гидроксильный радикал является самым реакционноспособным радикалом среди активных форм кислорода и именно он является конечной причиной большинства повреждений, обусловленных этими формами. Являясь сильным окислителем, гидроксильные радикалы разрывают любую СН-связь, вызывают повреждения белков и нуклеиновых кислот. Так, например, цитотоксическое и канцерогенное действие ионизирующих излучений на живые организмы напрямую связывают с генерацией ОН• в процессе радиолиза воды. Для удобства сопоставления спектральных характеристик светлоклеточного, папиллярного и хромофобного вариантов, основные показатели были вынесены в таблицу 9. Согласно сводным результатам сопоставления спектроскопических характеристик трех наиболее часто встречающихся форм почечноклеточного рака, каждый из них характеризуется определенным набором показателей: количество и положение локальных максимумов флуоресценции, значение интенсивности флуоресценции, 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 (соединительная, межклеточный матрикс, сосуды и др.), 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 что также «искажает» специфические характеристики опухолевой ткани, что было убедительно продемонстрировано на примере светлоклеточного варианта ПКР. В связи с этим необходимым условием является обязательная регистрация спектров из нескольких участков опухолевого узла.

Таблица 9. Спектроскопическая характеристика различных вариантов ПКР.

	Светлоклеточный ПКР (N = 67)	**Папиллярный ПКР 1 типа (N = 7)**	**Папиллярный ПКР 2 типа (N = 3)**	**Хромофобный ПКР классический тип (N =4)**	**Хромофобный ПКР эозинофильный тип (N = 4)**
Количество локальных максимумов флуоресценции и их значение ($см^{-1}$)	N -1 2250 ±52,02 2437±33,05	N- 1 1510±7,34	N-1 2200±2,52	N-3 1200±11,32 2130±17,24; 3125±49,74	N-2 1920±21,5,0 3460±31,87
Среднее значение интенсивности флуоресценци, (отн.ед.)	16566± 636,56	20666,67 ±785,57	14500± 577,35	7600± 670,36	10200+ 418,33
Значения волн рамановского рассеяния, ($см^{-1}$)	1003 см-1 (фенилаланин) 1157 см-1 (метионин) 1517$см^{-1}$ (в-каротин) 2965 $см^{-1}$ (в-каротин) 2977 $см^{-1}$ (холестерин)		582 см-1 (гидроксильный радикал) 1100 см-1 (жир.к-ты) 2873 см-1 (СН-связь липидов и белков)		

Группа образцов визуально неизменной ткани почки, максимально удаленной от опухолевого узла, морфологически сочетала себе многочисленные изменения канальцев, клубочков, сосудов и интерстиция почки, которые появлялись в виде атеро/артериолосклеротического нефросклероза или гидронефроза. Учитывая тот факт, что при данной патологии основные изменения вне опухолевого узла морфологически сводятся к атрофии структурно-функциональных элементов нефрона и склерозу интерстиция, то спектроскопические характеристики этих участков не имели специфических особенностей и были схожи со стромальным компонентом опухолевого узла. Неизмененные, условно говоря «здоровые» участки почечной ткани, при спектроскопическом исследовании были идентичны спектрам образцов группы контроля, т.е. характеризовались наличием двух локальных максимумов флуоресценции при высоких значениях их интенсивности (выше 36 тыс. отн. ед.).

В ходе нашего исследования были выявлены дополнительные возможности диагностического метода раман-флоуресцентной спектроскопии. Метод, обладая высокой чувствительностью и специфичностью в обнаружении рака почки, позволяет диагностировать не только его гистологический тип, но его разновидности, и даже 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 диагностическую ценность применяемого метода. Кроме того, с его помощью 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 получить результаты в режиме реального времени в течении нескольких минут, что оценивает перспективы для последующего его 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 накоплены, морфологическое исследование по-прежнему остается ключевым для установления окончательного диагноза.

При сравнении полученных нами данных с результатами работ в уронефрологии известных зарубежных авторов, было выявлено совпадение по целому ряду позиций. Так, в работе Mert S. et al (2015) представлено достаточно подробное описание полученных рамановских пиков при светлоклеточном варианте почечно-клеточного рака в сравнении с неизмененной паренхимой почки [90]. Основные биохимические сдвиги были выявлены в изменении концентрации и соотношения аминокислот, липидов и некоторых белков, при этом, как и в нашем исследовании, было установлено, что концентрация молекул фенилаланина выше в опухолях высоких степеней дифференцировки. Однако упоминаемое исследование было выполнено с помощью только рамановского спектроскопа с использованием серебряных подложек, усиливающих рамановского рассеяние образца. Кроме того, в работе отсутствовало подробная морфологическая характеристика образований.

В работе JP Couapel et al. (2013), описаны результаты применения метода рамановской спектроскопии для диагностики светлоклеточного, хромофобного и папиллярного вариантов почечно-клеточного рака. Авторы отмечают высокую эффективность метода (96%), но, к сожалению, не приводят в работе описания спектральных характеристик каждой исследуемой опухоли [61].

Использование рамановской спектроскопии позволило выявить ее возможность идентифицировать с помощью регистрируемых спектров области реализации вторичных изменений и участки склероза в исследуемой

ткани, независимо от того является она измененной опухолью или нет. В результате построения аналитической модели с помощью метода проекций на латентные структуры с последующим дискриминантным анализом (PLS-DA) осуществлено разделение раман-флуоресцентных спектров образцов групп контроля и рака почки на категории «рак» и «норма». Точность разделения составила 92%, при этом чувствительность и специфичность метода составили 87,5% и 100%, соответственно. Наслоение некоторых спектров контрольной группы на категорию опухолевых, по-видимому, связано с общностью конфигурации спектров, полученных в результате воздействия лазерного луча на участки интерстиция или сосудистых стенок, которые в том и другом случае имеют единые структурные компоненты.

Высокое разрешение и чувствительность метода раман-флуоресцентной спектроскопии позволяют осуществить быструю идентификацию и анализ состава опухолевых и неизмененных тканей почек. Включая в себя преимущества и флуоресценции (распознавание естественных флуорофоров), и рамановского рассеяния (идентификация специфических молекул, веществ и их соединений), раман-флуоресцентная спектроскопия при отсутствии противопоказаний к применению, дает возможность исследовать даже небольшие объемы материала в твердом, жидком и даже газообразном состоянии в сжатые сроки. Все это предполагает перспективу использования данного метода не только в лабораторных условиях, но и на до-и интраоперационном этапах диагностики.

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 2965 см$^{-1}$ (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 см$^{-1}$ и отсутствие рамановских пиков. Папиллярный рак 2-го типа обладает пиками рамановского рассеяния в точках 582 см$^{-1}$ (гидроксильный радикал) , 1100 см$^{-1}$ (жирные кислоты) , 2873 см$^{-1}$ (СН-связь липидов и белков), а также

одиночным локальным максимумом в точке 2200+25,21 $см^{-1}$.

5.Хромофобный вариант почечно-клеточного рака (классический тип) характеризуется множеством локальных максимумов в точках 1200+11,32 $см^{-1}$, 2130+17,24 $см^{-1}$, 3125+49,74 $см^{-1}$, и невысокой интенсивностью флуоресценции (7-10 тыс. отн.ед.). Эозинофильный его тип отличется значениями локальных максимумов флуоресценции (1920+21,52 $см^{-1}$ и 3460+31,87 $см^{-1}$) 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 СОКРАЩЕНИЙ

ПКР – почечно-клеточный рак

УЗИ – ультразвуковое исследование

КТ – компьютерная томограмма

МРТ – магнитно-резонансная томография

Отн.ед. – относительные единицы

CCD-детектор – «charge-coupled device» - детектор

PLS-DA - Partial least squares - Discriminant Analysis

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айрапетова, Г.Д. Возможности магнитно-резонансной томографии в диагностике кистозных форм рака почки / Г. Д. Айрапетова, А. Б. Лукьянченко, В. Б. Матвеев // Медицинская визуализация. – 2006. – № 5. – С. 61–67.
2. Айрапетова, Г.Д. Возможности МРТ в диагностике венозного тромбоза при злокачественных опухолях почек / Г. Д. Айрапетова, А. Б. Лукьянченко, В. Б. Матвеев // Материалы IV съезда онкологов и радиологов СНГ 28.09 – 01. 10.2006. – Баку, 2006. – С. 71.
3. Александров, М.Т. Исследование спектральных характеристик органов малого таза у женщин и их клиническое значение / М.Т. Александров, В.М. Зуев, В.В. Кукушкин [и д.р.] // Онкогинекология. – 2013. – № 3. – С. 61–67.
4. Алексеев, Б.Я. Клинические рекомендации по диагностике и лечению рака почки / Алексеев Б.Я., Волкова М.И., Калпинский А.С., Каприн А.Д., Матвеев В.Б., Носов Д.А. – 2014. – С. 18
5. Алексеев, Б.Я. Особенности диагностики и лечения рака почки в России: предварительные результаты многоцентрового кооперированного исследования / Б.Я., Алексеев, Ю.В. Анжиганова, А.В. Лыков [и д.р.] // Онкоурология. – 2012. – №24(3). – С. 25.
6. Аляев, Ю.Г. Современные технологии в диагностике и лечении рака почки / Ю.Г. Аляев, А.З. Винаров, А.А. Крапивин [и д.р.] // Онкоурология. – 2005. – № 2. – С. 3–7.
7. Аляев, Ю.Г. Ультразвуковые методы функциональной диагностики в урологии / Ю.Г. Аляев, А.В. Амосов // Урология. – 2000. – № 4. – С. 26–32.
8. Андреева, Ю.Ю. Опухоли почки. Морфологичекская диагностика и генетика / Ю.Ю. Андреева, Л.В. Москвина, Л.Э. Завалишина, Т.В.

Кекеева, Д.С. Михайленко, Н.В. Данилова, П.Г. Мальков, Г.А. Франк. // Руководство под ред. Ю.Ю. Андреевой, Г.А. Франка.– М.: РМАПО, 2011. – С. 5–17, 21–31, 218.

9. Бабиченко, И.И. Новые методы иммуногистохимическойдиагностикаи опухолевого роста: учеб.пособие / И.И. Бабиченко, В.А. Ковязин. – М.: РУДН, 2008. – 55с.
10. Браун, Д. Спектроскопия органических веществ. / Д. Браун, А. Флойд , М. Сейзбери. – М.,1992. – С.18.
11. Буйлов, В.М. Спиральная компьютерная томография при опухолях почки / В.М. Буйлов, А.В. Борисанов, А.П. Иванов // под ред. Б. И. Долгушина. – М.: Практическая медицина, 2009. – С. 44–56.
12. Варламов, С.А Ядерный антиген Ki-67 как фактор прогноза при почечно-клеточном раке / С.А. Варламов, В.С. Дорошенко, А.Ф. Лазарев // Онкоурология. – 2008. – №2. – С. 22–25.
13. Глыбочко П.В. Диагностическое значение показателей ангиогенеза при раке почки / Глыбочко П.В., Закирова Н.Б., Понукалин А.Н. и др.//Онкоурология. – 2011. -№ 3. – С. 25-30
14. Горелик, В.С. Комбинационное рассеяние света / В.С. Горелик // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №6. – С. 91–96.
15. Горелов А.И. Прогностическое значение экспрессии маркера ki-67 у пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком / А.И. Горелов, З.Н. Нариманов, Д.С. Горелов // Материалы конгресса Российского общества онкоурологов. – М.- 2011. С. 211-222.
16. Давыдов, М.И. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2006 году / Под ред. М.И.Давыдова, Е.М.Аксель // Вестник Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2011 (2007 было). – №3. – С. 172
17. Завалишина, Л.Э. Молекулярно-биологические факторы инвазивного роста и метастазирования рака при морфологическом исследовании:

автореф. дис. …докт. биол. наук / Завалишина Лариса Эдуардовна. – М., 2006. – 45 с.

18. Иванцов, А.О. Возможности иммуногистохимического исследования в диагностике опухолей / А.О. Иванцов, Д.Е. Мацко // Практическая онкология. – 2011. – Т.12. №4. – С. 185–93.

19. Иливанов, С.Ю. Рациональное использование биомаркеров в диагностике рака почки в клинической практике [Электронный ресурс] / С.Ю. Иливанов, Ю.Д. Иливанов, Ю.А. Игонин, Р.Ш. Хасанов // Поволожский онкологический вестник. – 2017. –№28. – Режим доступа: http://oncovestnik.ru/index.php/onkourologiya/item/1524-nalnoe-ispolzovanie-biomarkerov-v-diagnostike-raka-pochki-v-klinicheskoj-praktike.

20. Ишкинин, Р.Э. Применение рамановской спектроскопии в медицине / Р.Э.Ишкинин, Л.А. Фазлыахметова, И.Г Насртдинов И.Г. // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – № 2. – Самара, 2016. – С. 129–132.

21. Ковалева О.В., Назарова О.Р., Матвеев В.Б., Грачев А.Н. Молекулярные особенности почечно-клеточного рака: ранняя диагностика и перспективы терапии // Успехи молекулярной онкологии. – 2014.- №2. С. 36-39

22. Коваленко, А.А., Елисеев А.А. Спектроскопия комбинационного рассеяния // Методическая разработка Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова факультета наук о материалах. – 2011. – С. 37.

23. Коган, М.И. Молекулярно-биологические факторы прогнозирования течения почечно-клеточного рака (обзор литературы) / М.И. Коган, З.М. Ахохов, А.А. Гусев, Д.Г. Пасечник // Онкоурология. – 2016. – №3. Т.12. – С.45–48.

24. Комаров, Ф.И., Вязицкий И.О. [и д.р.] Комплексная лучевая диагностика заболеваний органов брюшной полости и забрюшинного пространства : атлас / Ф. И. Комаров, П. О. Вязицкий, Ю. К. Селезнев [и д.р.] // ;

Российская академия медицинских наук. – Москва : Медицина, 1993. – 494 с.

25. Компания INTERTECH Corporation. Введение в рамановскую спектроскопию // Пластические массы. – 2009. – № 8. – С. 7–13.
26. Кравцов, И.Б. Современные методы диагностики и оценки функционального состояния почек у больных почечно-клеточным раком / И.Б. Кравцов // Вестник Российского Научного центра рентгенрадиологии. – №13. – 2013. – С. 9.
27. Кручинина, М.В. Возможности эллипсометрии, РАМАН-спектроскопии, КНИ-нанопроволочного биосенсора в диагностике колоректального рака / М.В. Кручинина, Я.И. Прудникова, С.А. Курилович и др./ Сибирский онкологический журнал. – 2017. – 16(4). –С. 32–41.
28. Логинов, В.А. Рак почки: светооптическое, электронномикроскопическое и гистоспектрофотометрическое исследование: автореф. дис. ...к.м.н / Логинов А.В. – М., 1986. – 10 с.
29. Лоран, О.Б. Факторы апоптоза и пролиферации при раке почки / О.Б. Лоран, Г.А. Франк, А.В. Серегин [и др] // Онкоурология. – 2008. – №2. –С. 16–21.
30. Маслякова, Г.Н. Изучение факторов агрессивности для диагностики и прогнозирования течения опухолей почек (анализ литературных данных) / Г.Н. Маслякова, А.В. Медведева // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2013. – № 4. – С. 845–48.
31. Матвеев, В.Б. Рак почки. / В.Б. Матвеев, М.И. Волкова // Профилактика, ранняя диагностика и лечение злокачественных новообразований: сборник лекций. – Москва, 2005. – С. 255–264.
32. Медведева, А.В. Клинико-лабораторная, морфологическая и иммуногистохимическая характеристика муцинозной тубулярной и веретеноклеточной карциномы почки / А.В. Медведева, Г.Н. Маслякова, И.С. Аристова, Е.С. Воронина // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». – 2017. – №4. – С. 23–31.

33. Михайлов, М.К. Лучевая диагностика распространенности рака почки / М.К. Михайлов, И.И. Иванова, И.А. Гилязутдинов // Казанский медицинский журнал. – №5. – 2003. – С. 375–80.
34. Москвина, Л.В. Морфологические и молекулярно-биологические факторы прогноза несветлоклеточного почечно-клеточного рака: автореф. дис. ...д.м.н / Москвина Л.В. – М., – 2013. – 8–24 с.
35. Нуриев, И.Р. Диагностика новообразований мочевого пузыря / И.Р. Нуриев, М.Э. Ситдыкова, А.Ю. Зубков // Практическая медицина. – 2013. – №73. – С. 121–126.
36. Петров, С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров; под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. – 4-е изд., перераб. и доп.– Казань, 2012. – 624 с., с ил.
37. Попков, В. М. Лучевые методы диагностики рака почки (обзор) / В.М. Попков, Ю.Е. Никольский, М.Л. Чехонацкая [и др] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2012. – №3. – С.835–39.
38. Приезжев, А. В. Лазерная диагностика в биологии и медицине / А.В. Приезжев, В.В. Тучин, Л.П. Шубочкин / Москва. – 1989. – С. 28–30.
39. Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор). Вестник новых медицинских технологий. 2011; XVIII, 2: С. 86-9.
40. Свистушкин, В.М. Возможности применения раман-флуоресцентной спектроскопии в оториноларингологии / В.М. Свистушкин, М.Т. Александров, Д.М. Пшонкина [и др] // РМЖ. – 2015. – №6. – С. 317.
41. Соколова, И.Н. Хромофобный рак почки с интрацитоплазматическими канальцами / И.Н. Соколова, Я.В. Вишневская, Я.В. Гриднева // Архив патологии. – 2011. – №2. – С. 35–37.
42. Суковатая, И.Е. Фотобиофизика / И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк, В.В. Межевикин, И.В. Свидерская, Е.Н. Есимбекова, Е.В. Немцева. — Учебно-методический комплекс. — Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 438 с.

43. Суконко, О.Г. Дифференциальная диагностика объемных образований почки / О.Г. Суконко, А.И. Ролевич, С.А.Красный [и др] // Здравоохранение: научно-практический ежемесячный журнал. – Минск. – 2010. – № 4. – С. 38–48.
44. Тучин, В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях / В.В. Тучин. — 2-ое изд. — Москва: Физматлит, 2010. — 478 с. С.66
45. Упоров, А.В. ИГХ изучение рака молочной железы с использованием разных маркеров пролиферации / А.В. Упоров, В.Ф. Семиглазов, К.М. Пожарисский // Архив патологии. – 2000. – №2. – С. 26–32.
46. Уткин, Д.В. Применение методов спектроскопии для индикации и идентификации патогенных биологических агентов / Д.В. Уткин, В.Е. Куклев, П.С. Ерохин [и др] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 108. – С. 68–71.
47. Харченко, В.П. Значение ангиографии в диагностике рака почки / В.П. Харченко, А.Д. Каприн, А.П. Ананьев // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2001. – №1. – С. 50–54.
48. Харченко, В.П. Результаты пункционных диагностических и лечебных вмешательств на органах забрюшинного пространства и малого таза под контролем ультразвукового сканирования / В.П. Харченко, А.Д. Каприн, Р.А. Гафанов [и др] // Урология. – 2000. – № 5. – С. 51–52.
49. Черданцева, Т.М. Патоморфологический и молекулярно-биологический анализ почечно-клеточного рака. Диагностика и прогноз: автореф. дис. ...д.м.н.: 14.03.02 / Черданцева Т.М. – Барнаул, 2014. – 39–59 с.
50. Шлопов В.Г., Лодавский Е.А. Светлоклеточные опухоли почек: морфология, гистохимия, ультраструктура, дифференциальная диагностика // Архив патологии. – 1989. - №3.-С. 44-48
51. Юрин, А.Г. Неметастатический светлоклеточный рак почек: прогностическая значимость морфометрических и биомолекулярных

факторов (БМФ) / А.Г. Юрин // Вопросы онкологии. – 2009. – №2. – С.177–182.

52. Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, Corless CL. Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. Am J Surg Pathol.-2000;24: P. 203–210.
53. 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.
54. Bellayr I.H., Mu X., Li Y. Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments // NIH Public Access Author Manuscript. 2010. P.1762.
55. Bromwich E. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer // Br. J. Cancer/ - 2003 (17) – 89(10). P.1906-1908.
56. Bonsib S.M. Renal neoplasms: an update on immunohistochemical and histochemical features / S.M. Bonsib, A. Bhalodia // Connection. – 2010. –26: P. 178–86.
57. Catherin R. Imaging in renal cell cancer / R. Catherin, B. Xavier, Sofiane el Ghali // EUA Update Series Vol.1. – 2003. – P. 209–214.
58. Chen Q. Growth-induced stress enhances epithelial-mesenchymal transition induced by IL-6 in clear cell renal cell carcinoma via the Akt/GSK-3β/β-catenin signaling pathway / Chen. Q, Yang D Zong, H, Zhu L, Wang L, Wang X, Zhu X, Song X., Wang J //Oncogenesis. – 2017. – 6: e375.
59. Cheville J.C. Comparison of outcome and prognostic features among histologic subtytes renal cell carcinoma / J.C. Cheville, C.M. Lohse, et al. // Am J Surgpathol. – 2003. – 27(5): P.612–624.
60. Chow WH. Epidemiology and risk factors for kidney cancer / WH. Chow, LD Dong, SS Devesa // Nat Rev Urol. – 2010. –7(5): P.245–57.
61. Couapel JP, Senhadji L, Rioux-Leclercq N, Verhoest G, Lavastre O, de Crevoisier R, Bensalah K. Optical spectroscopy techniques can accurately

distinguish benign and malignant renal tumours. BJU Int. 2013;111:P. 865–871.

62. Crow P. Assessment of fiberoptic near-infrared raman spectroscopy for diagnosis of bladder and prostate cancer / P. Crow, A. Molckovsky, N. Stone, Uff J, B. Wilson, WongKeeSong LM // Urology. – 2005. – 65(6): P. 1126–30.
63. Crow P. The Use of Raman Spectroscopy to Identify and Grade Prostatic Adenocarcinoma In Vitro / P. Crow, N. Stone, C.A. Kendall C.A. et al. / British Journal of Cancer. – 2003. – 89: P. 106–108.
64. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry.– 3rd ed. – Edinburgh: Churchill Livingstone, 2010. P. 673.
65. Delahunt B. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors / B. Delahunt, J. N. Eble // Mod Pathol. – 1997. – 10: P. 537–44.
66. Draga R.O. In Vivo Bladder Cancer Diagnosis by High-volume Raman Spectroscopy / R.O. Draga, M.C. Grimbergen, L.P. Vijverberg P.L. et al. // Anal. Chem. – 2010. – 82: P. 5993–5999.
67. Duraipandian S. Near-infrared-excited confocal Raman spectroscopy advances in vivo diagnosis of cervical precancer / S. Duraipandian, W. Zheng, Ng J. et al // J Biomed Opt. – 2013. – Jun;18(6): 067007.
68. Emaetig F. Survivin expression renal cell carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters / F. Emaetig, K. E. Gehani, I. E. Hasadi et al. // J. Interdiscipl. Histopathol. – 2013. – Vol. 1. – №4. – P. 184–194.
69. Evers DJ. Optical spectroscopy: current advances and future applications in cancer diagnostics and therapy / DJ Evers, BHW Hendriks, GW Lucassen, TJN Ruers // Future Oncol. – 2012. – 8(3): P. 307–309.
70. Ferrara N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H. P. Gerber, J. LeCouter // Nat. Med. – 2003. – Vol. 9. – №6. – P. 669–676.
71. Fuhrman S.A. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma / S.A. Fuhrman, L.C. Lasky, C. Limas // Am J SurgPathol. – 1982. – 6: P. 655–63.

72. Gayed B.A. Ki67 is an independent predictor of oncological outcomes in patients with localized clear-cell renal cell carcinoma / B.A. Gayed, R. F. Youssef, A. Bagrodia et al. // BJU Int. – 2014. – Vol. 113. – № 4. – P. 668–673.
73. Huang E. Y. Discremination of renal cell carcinoma from normal renal parenchyma using Raman spectroscopy // Huang E.Y., Liao, Ying-Hsiang, Lin, Alex T.L. // Journal of Urology. – 2012. – 187.4: 398.
74. Huang E. Y. Raman spectral analysis of renal tissue: a novel application / E. Y. Huang, Shou-Chia Chu, He Guei Chen // J. Raman Spectrosc. – 2014. – 45(9): 788–793.
75. Huang Z. In vivo early diagnosis of gastric dysplasia using narrow-band image-guided Raman endoscopy / Huang Z, Bergholt MS, Zheng W et al. // J Biomed Opt. – 2010. – May–Jun;15(3): P. 037017.
76. Kendall C. Evaluation of Raman probe for oesophageal cancer diagnostics / C. Kendall, J. Day, J. Hutchings et al. // Analyst. – 2010. – Dec;135(12): P. 3038-41.
77. Kendall C. Raman spectroscopy, a potential tool for the objective identification and classification of neoplasia in Barrett's oesophagus / C. Kendall, N. Stone, N. Shepherd N et al. // J Pathol. – 2003. – Aug;200(5): P. 602-9.
78. Kharaishvili G. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance / G. Kharaishvili, D. Simkova, K. Bouchalova et al. // Cancer Cell International. – 2014. – 14(41): 1–8.
79. Klatte T. Hypoxia-inducible factor 1-alpha in clear cell renal cell carcinoma / T. Klatte, D. B. Seligson, S. B. Riggs et al. // Clin. Cancer Res Vol.13. – 2007. – P. 7388–7393.
80. Kowalczyk D1, Skorupski W, Kwias Z, Nowak J. Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. Br J Urol. 1997 Oct;80(4): P. 543-7.

81. Kuroda N. Review of renal oncocytoma with focus on clinical and pathobiological aspects / N. Kuroda, M. Toi, M. Hiroi et al. // Histol. Histopathol. – 2003. – 18: P. 935–42.
82. Lam J.S. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy / J.S. Lam, O. Shvarts, J. T. Leppert et al. // J Urol. – 2005. – 173: P. 1853–62.
83. Leroy X, Moukassa D, Copin MC, Saint F, Mazeman E, Gosselin B. Utility of cytokeratin 7 for distinguishing chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma. Eur Urol. 2000;37: P. 484–487.
84. Liu L. Immunohistochemical Analysis of Chromophobe Renal Cell Carcinoma, Renal Oncocytoma, and Clear Cell Carcinoma. An Optimal and Practical Panel for Differential Diagnosis / L. Liu, J. Qian, H. Singh et al. // Arch Pathol Lab Med Vol 131. – August 2007. – P. 1290–96.
85. Ljungberg B. Tumor vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in relation to serum VEGF protein levels and tumor progression in human renal cell carcinoma / B. Ljungberg, J. Jacobsen, S. Haggstrom-Rudolfsson et al. // Urol.Res Vol.31. – 2003. – P. 335–340.
86. Ljungberg B. Почечно-клеточныйрак / B. Ljungberg, N. Cowan, D.C. Hanbury, M. Hora, M.A. Kuczyk, A.S. Merseburger, P.F.A. Mulders, J-J. Patard, I.C. Sinescu; Перевод: Ю.С. Серомолот/ Научное редактирование: В.Б. Матвеев // Европейская ассоциация урологов, – 2010. С. 25-50.
87. Luan D. Truong. Immunohistochemical Diagnosis of Renal Neoplasms / Luan D. Truong, Steven S. Shen // Arch Pathol Lab Med Vol 135. – Jan 2011. – P. 92–107.
88. Martignoni G., Brunelli M., Gobbo S. et al. Role of molecular markers in diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma // Anal Quant Cytol Histol 2007; 29: P.41-9.
89. Mc Cleannan B.L. The imaging evalution of renal cell carcinoma, diagnosis and staging / B.L. Ma Cleannan, L.A. Deyoe // Radiol. Clin. North Am Vol.32. – 1994. – P.55–69.

90. Mert S. Kidney tumor staging using surface-enhanced Raman scattering / S. Mert, E. Ozbek, A. Otunctemur, M. Culha // Journal of Biomedical Optics. – 2015. – 20.4: P. 47002–9.
91. Mo J. High wavenumber Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical dysplasia / J Mo, W Zheng, JJ Low et al. // Anal Chem. – 2009. – Nov1; 81(21): P. 8908–15.
92. Molckovsky A. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps / A Molckovsky, LM Song, MG Shim et al. // GastrointestEndosc. – 2003. – Mar; 57(3):P. 396–402.
93. Morrison C.J. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy / C. J. Morrison, G. S. Butler, D. Rodrıguez et al. // Curr. Opin. Cell Biol Vol. 21. – 2009. – P. 1–9.
94. Movasaghi Z. Raman Spectroscopy of Biological Tissues / Z Movasaghi, S Rehman, U Ihtesham et al. // Applied Spectroscopy Reviews. – 2007. – 42: P. 493–541.
95. Naglic P. Raman spectroscopy for medical diagnostics / P. Naglic // University of Ljubjana Faculty of Mathematics and Physics. – 2012. – P. 6–9.
96. Ning H1, Shao QQ, Ding KJ, Gao DX, Lu QL, Cao QW, Niu ZH, Fu Q, Zhang CH, Qu X, Lü JJ. Tumor-infiltrating regulatory T cells are positively correlated with angiogenic status in renal cell carcinoma //(Chin Med J (Engl). 2012 Jun;125(12): P. 2120-5.
97. Papadopoulos I. Correlation between DNA ploidy, proliferation marker ki-67 and early tumor progression in renal cell carcinoma. A prospective study / I. Paradopoulos, K. Weichert-Jacobsen, H.H. Waker et al. // Eur. Urol Vol.31. – 1997. – P. 49–53.
98. Patard JJ. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma / JJ Patard, E Leray, A. Rodriguez et al. // Eur Urol. – 2003. – Aug; 44(2): P. 226–32.

99. Pencel I. Clinical instrumentation and applications of Rman spectroscopy / I. Pencel, A Mhadevan-Jansen // Chem. Soc. Rev. – 2016. – 45: P. 1–7.

100. Phuoc N.B. Immunohistochemical analysis with multiple antibodies in search of prognostic markers for clear cell renal carcinoma / N.B. Phuoc, H. Ehara, T. Goton et al. // Urology Vol. 69. – 2007. – P. 843–48.

101. Qiao Z.-K. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in renal cell carcinoma / Z.-K. Qiao, Y.-I. Li, H.-T. Lu et al. // W. J. Surg. Oncol. – 2013. – Vol. 11. – №1. – P. 1–6.

102. Rankin S.C. Spiral CT in the diagnosis of renalmasses / S.C. Rankin, J.A.B. Webb, R.H. Raznek // BJ.U.Int. – 2000. – Vol. 26. – Supl.l. – P. 48–57.

103. Raman C.V., Krishnan K.S. A new type of secondary radiation // Nature/ - 121. – 1928. P. 501-502.

104. Robichaux-Viehoever A. Characterization of Raman spectra measured in vivo for the detection of cervical dysplasia / A. Robichaux-Viehoever, E. Kanter, H. Shappell // ApplSpectrosc. – 2007. – Sep;61(9): P. 986–93.

105. Ryu K. H., Im C. M., Kim M.K. et al. Inflammatory myofibroblastic tumor of the kidney misdiagnosed as renal cell carcinoma // J. Korean. Med. Sci. – 2010. – Vol. 25. №2. P. 330-332.

106. Sangoi AR. The use of immunohistochemistry in the diagnosis of metastatic clear cell renal cell carcinoma: a review of PAX-8, PAX-2, hKIM-1, RCCma, and CD10 / AR Sangoi, J Karamchandani, J Kim //AdvAnatPathol. – 2010. – Nov;17(6): P.377–93.

107. Sato A. Inhibition of MMP-9 using a pyrrole-imidazole polyamide reduces cell invasion in renal cell carcinoma / A. Sato, H. Nagase, D. Obinata et al. // Int. J. Oncol Vol. 43, 35.– 2013. – P. 1441–1446.

108. 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.

109. Seaman E. Association of radionuclide bone scan and serum alkaline phosphatase in patients with metastatic renal cell carcinoma / E. Seaman // Urology Vol. 48. – 1996. – P. 692–695.

110. Schlomer B, Figenshau RS, Yan Y, et al. Pathological features of renalneoplasms classified by size and symptomatology. J Urol 2006; 176(4): P. 1317–20.

111. Stewart S. Distinguishing between renal oncocytoma and hromophobe renal cell carcinoma using Raman molecular imaging / S. Stewart, H. Kirschner, P.J. Treado, R. Priore // J. Raman Spectrosc. – 2014. – 45: P. 274–280.

112. Teh SK. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue / SK Teh, W Zheng, KY Ho // Br J Cancer. – 2008. – Jan 29; 98(2):457–65.

113. Tickoo SK. Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles in renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, and eosinophilic variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma / SK Tickoo, MW Lee, JN Eble // Am J SurgPathol. – 2000. – Sep;24(9): 1247–56.

114. Tynski Z. Renal pseudotumors / Z. Tynski, GT. MacLennan // J Urol. – 2005. – 173: P.600.

115. V. M. Villaamil, G. A. Gallego, I. S. Caínzos et al. Relevant networks involving the p53 signalling pathway in renal cell carcinoma// Int. J. Biomed. Sci. – 2011. – Vol.7, №4. – P. 273–282.

116. Wenjuan Y. Clinicopathological, genetic, ultrastructural characterizations and prognostic factors of papillary renal cell carcinoma: New diagnostic and prognostic information / Y Wenjuan, B Wei Zhang, YanxiaJianga et al. // ActaHistochemica. – 2013. – 115: P. 452–459.

117. Yamaguchi T. Chromophobe renal cell carcinoma, oncocytic variant: Cytological and ultrastructural observations / T. Yamaguchi, E.Hirota, N. Kuroda // J Cytol. – 2015. – Jul–Sep; 32(3): 184–187.

118. Zheng F. Sensitivity map of laser tweezers Raman spectroscopy for single-cell analysis of colorectal cancer / F Zheng, Y Qin, K Chen // J Biomed Opt. – 2007. – May–Jun; 12(3) :034002.

119. Zigeuner R. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinomas: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue / R. Zigeuner, M. Ratschek, P. Rehak et al. // Urology. – 2004. – 63: P. 651.

120. Zolota V., Tsamandas A.C., Melachrinou M. et al. Expression of CD44 protein in renal cell carcinomas: association with p53 expression. Urol. Oncol. 2002; №7(1): P. 13-17.