

Павлов В.Н., Билялов А.Р., Гильманова Р.Ф.

Возможности применения раман спектроскопии в диагностике рака предстательной железы *in vitro*

ФГБОУ ВО «Башкирский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России, г.Уфа

Pavlov V.N., Bilyalov A.R., Gilmanova R.F.

Possibilities of using raman spectroscopy in diagnosis of prostate cancer *in vitro*

Резюме

Цель исследования. Оценить диагностические возможности метода рамановской спектроскопии в выявлении рака предстательной железы. Материалы и методы. Забор материала: 13 образцов предстательной железы (гистологически подтвержден диагноз «Доброкачественная гиперплазия предстательной железы» (ДГПЖ). 47 образцов тканей предстательной железы (гистологически подтвержден диагноз «Рак предстательной железы»). Исследование образцов проводилось на аппарате (HoribaScientific). Конфигурация: длина волны 785 нм, решетка 1200 gr/mm, фильтр 100%, конфокальное отверстие 300 μ m. Время интегрирования 50 с. Анализ спектральных данных производился с использованием программного обеспечения Matlab, Statistica, FreeSpectraBase, SpectralDatabase IndexBio-Rad. Результаты. Спектры комбинационного рассеяния фрагментов тканей ДГПЖ и РПЖ соответствуют промежутку 700-1800 см⁻¹. Образцы с РПЖ имеют более высокие пики по сравнению с образцами ДГПЖ при 1280 см⁻¹ (C-NH₂, входящая в состав аденина, гуанина, цитозина), 1323 см⁻¹ (CH₃/CH₂ коллагена), 1378 см⁻¹ (гуанин, аденин, ДНК), 1560 см⁻¹ (аденин и гуанин). Спектры образцов с ДГПЖ имеют более высокие пики при 752 см⁻¹ (тирозин), 1662 см⁻¹ (связь амидов I: C=O белков, C=C-связь липидов). Выводы. При исследовании образцов тканей с подтвержденными диагнозами ДГПЖ и РПЖ отмечается увеличение интенсивности рамановского рассеяния света ДНК в тканях с подтвержденным РПЖ, и обратное снижение интенсивности рамановского рассеяния света ДНК в тканях с ДГПЖ. Рамановская спектроскопия показала спектральные различия в биохимическом составе тканей с ДГПЖ и тканей с РПЖ. В перспективе данный метод исследования может быть использован для разработки диагностического алгоритма выявления рака предстательной железы.

Ключевые слова: рамановская спектроскопия, рак предстательной железы, ДГПЖ, диагностика

Summary

Purpose of the study. To assess the diagnostic capabilities of the Raman spectroscopy method in detecting prostate cancer. Materials and methods. Material selection: 13 samples of the prostate gland (histologically confirmed the diagnosis of "Benign prostatic hyperplasia" (BPH). 47 prostate tissue samples (histologically confirmed diagnosis "Prostate cancer." The samples were examined on the apparatus (HoribaScientific). Configuration: wavelength 785 nm, grating 1200 gr / mm, 100% filter, confocal hole 300 μ m. Integration time 50 s. Analysis of spectral data was carried out using Matlab software, Statistica, FreeSpectraBase, SpectralDatabase IndexBio-Rad. Results. Raman spectra of tissue fragments of BPH and PCa correspond to a range of 700-1800 cm⁻¹. Samples with PCa have higher peaks compared to BPH samples at 1280 cm⁻¹ (C-NH₂, included in adenine, guanine, cytosine), 1323 cm⁻¹ (CH₃ / CH₂ collagen), 1378 cm⁻¹ (guanine, adenine, DNA), 1560 cm⁻¹ (adenine and guanine). The spectra of the samples with BPH have higher peaks at 752 cm⁻¹ (tyrosine), 1662 cm⁻¹ (bond amides I: C = O proteins, C = C-bond of lipids). Conclusions. In the study of tissue samples with confirmed diagnoses of BPH and PCa, an increase in the intensity of Raman light scattering of DNA in tissues with confirmed PCa was noted, and a reverse decrease in the intensity of Raman scattering of DNA light in tissues with BPH. Raman spectroscopy showed spectral differences in the biochemical composition of tissues with BPH and tissues with PCa. In the future, this method of investigation can be used to develop a diagnostic algorithm for detecting prostate cancer.

Key words: Raman spectroscopy, prostate cancer, BPH, diagnosis.

Введение

Рамановская спектроскопия (РС) является физическим методом, который позволяет с высокой специфичностью и в режиме реального времени исследовать биологические объекты. В связи с растущим потенциалом этого метода исследования в клинической практике, в данной статье представлен наш опыт исследования применения рамановской спектроскопии в диагностике рака предстательной железы.

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространённых злокачественных заболеваний у мужчин. Ежегодно в мире регистрируют более 550 тыс. новых случаев заболеваемости раком предстательной железы. Именно с этим связан тот факт, что диагностике и лечению данной патологии в последнее время уделяется все больше внимания как за рубежом, так и в Российской Федерации.

Наиболее высокие показатели заболеваемости РПЖ отмечены в США, Канаде и в ряде стран Европы, где он выходит на 1-е место в структуре онкологических заболеваний. Так, по данным Национального института рака (National Cancer Institute) США, с 1986 по 1992 гг. показатель заболеваемости РПЖ среди белого населения вырос на 108% и на 102% — для чернокожих американцев. В России заболеваемость РПЖ также неуклонно возрастает. Так, в 2006 г. впервые выявлено 18 092 новых случая РПЖ и стандартизованный показатель составил 21,4 на 100 тыс. населения. Прирост заболеваемости с 1996 по 2006 гг. 94,84% при среднем темпе прироста за 2006 г. 6,9%. Неутешительными остаются и показатели смертности. В 2006 г. в России от РПЖ умерли 8516 человек, что на 3,08% больше, чем в 2005 г. За 10 лет (с 1996 по 2006 гг.) прирост показателя смертности составил 35,43%. Несмотря на улучшение методов диагностики РПЖ и внедрение в ряде клиник ПСА-мониторинга, заболеваемость запущенными формами РПЖ в России остаётся высокой.

По данным на 2006 г., РПЖ IV стадии, при которой уже невозможно проведение радикального лечения, верифицирован у 22% больных. III стадия РПЖ диагностирована у 39% больных, I–II стадии — у 36,5%. Стадия заболевания не была установлена у 2,5% больных [1, 2, 3, 4].

Несмотря на широкий спектр методов диагностики РПЖ, проблема выявления данной патологии на начальной стадии, используя при этом метод, способный обеспечить молекулярную информацию и позволяющий проанализировать биохимический состав тканей в режиме реального времени на клеточном и молекулярном уровнях, остается актуальной.

Оптическая спектроскопия (Рамановская спектроскопия) позволяет получить информацию путем оценки взаимодействия падающего монохроматического света с молекулами исследуемой ткани [5].

Клетки и ткани организма характеризуются специфическим биохимическим составом и «своей особенной» молекулярной структурой, то есть определенная патология или клеточная аномалия сопровождаются биохимическими и молекулярными изменениями.

Рамановская спектроскопия - это физический метод,

позволяющий с высокой специфичностью, точностью, в режиме реального времени исследовать биологические объекты на молекулярном уровне во время патологической трансформации [6].

Принцип метода заключается в том, что при падении монохроматического пучка света определенной длины волны на образец исследуемой ткани, в последней возникают различные моды (сдвиги) колебательных или вращательных возбуждений молекул с характерными частотами, что приводит к появлению новых линий в спектре рассеянного света [7]. Каждое вещество, входящее в состав тканей, характеризуется набором рамановских линий с индивидуальным спектральным положением и постоянными относительными интенсивностями [8]. Именно этот набор спектральных характеристик дает возможность говорить о, так называемом, рамановском «отпечатке пальцев» этих молекул и позволяет проводить регистрацию изменений клеточного метаболизма по интенсивности их рассеяния.

Рамановская спектроскопия 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 твердых образцах, так и жидких и газообразных средах [9].

Материалы и методы

2.1. Образцы ткани предстательной железы.

После получения информированного согласия на медицинское вмешательство и генетическое исследование у пациентов, участвующих в исследовании, был произведен забор исследуемого материала следующими способами:

1) 13 образцов тканей предстательной железы (гистологически подтвержден диагноз «Доброкачественная гиперплазия предстательной железы») (ДГПЖ), удалены хирургическим путем – проведена позадилоная аденоэктомия на базе урологического отделения Клиники «Башкирского Государственного Медицинского Университета» г. Уфы. Размеры образцов - 20 мм.

2) 47 образцов тканей предстательной железы (гистологически подтвержден диагноз «Рак предстательной железы»), удалены хирургическим путем – проведена лапароскопическая радикальная простатэктомия на базе онкологического отделения Клиники «Башкирского Государственного Медицинского Университета» г. Уфы. Размеры образцов - 20 мм.

Все полученные образцы помещались в физиологический раствор 100 мл NaCl 0,9% при температуре -10 гр, хранились не более 2-ух часов до анализа спектроскопии комбинационного рассеяния.

Рамановская спектроскопия

Исследование образцов проводилось на аппарате (HoribaScientific). Были использованы следующие конфигурации настройки: длина волны 785 нм, выходная мощность 80 мВт, решетка 1200 gr/mm, фильтр 100%, slit 100

µm, конфокальное отверстие 300 µm, laser pol – vertical, raman pol – vertical.

Лазер попадает в образец через линзу (фокусное расстояние 30 мм) при геометрии возбуждения 90°. Рассеянный свет собирают с помощью набора линз (фокусное расстояние 100 мм), который проходит через фильтр для отбраковки полосы при 785 нм, который помещается перед входной щелью, чтобы блокировать рэлеевское рассеяние от лазера.

Затем рассеянный свет соединяется со спектрографом изображений, который рассеивает и направляет свет на камеру и контроллер. Спектры были получены с временем интегрирования 50 с при разрешении спектрометра около 10 см⁻¹. Был собран один спектр для каждого фрагмента ткани.

Калибровку комбинационного сдвига выполняли в день сбора данных.

Диагностическая модель, основанная на методе главных компонент

После предварительной обработки данных все полученные спектры были разделены на две группы в соответствии с гистопатологией: 1 группа - ДГПЖ, 2 группа - рак предстательной железы.

Диагностическая модель была разработана с использованием метода главных компонент и дискриминантного анализа для классификации образцов на основе гистопатологии.

Анализ спектральных данных был произведен с использованием программного обеспечения Matlab 7.0, Statistica, Free SpectraBase, Spectral Database Index BioRad.

Результаты и обсуждение

При анализе полученных спектров было выявлено:

1) средние спектры комбинационного рассеяния фрагментов тканей ДГПЖ и рака предстательной железы соответствуют промежутку 700-1800 см⁻¹;

2) спектры комбинационного рассеяния тканей простаты с ДГПЖ и РПЖ имеют отличительные спектральные особенности.

Образцы с гистологически подтвержденным РПЖ имеют более высокие пики комбинационного рассеяния по сравнению с образцами тканей ДГПЖ при 1280 см⁻¹ (аминная группа C - NH₂, входящая в состав аденина, гуанина, цитозина), 1323 см⁻¹ (связь CH₃ / CH₂ колла-

гена, полинуклеотидная цепь), 1378 см⁻¹ (гуанин, аденин, ДНК), 1560 см⁻¹ (нуклеиновые кислоты аденин и гуанин) [11,12,13,14,15].

Спектры образцов предстательной железы с ДГПЖ имеют более высокие пики при 752 см⁻¹ (аминокислоты тирозина), 1662 см⁻¹ (связь амидов I: C = O белков, α-спиральная конформация, C = C-связь липидов) [11,16,17,18,19,20].

Заключение

Таким образом, при исследовании образцов тканей с гистологически подтвержденными диагнозами ДГПЖ и РПЖ отмечается увеличение интенсивности рамановского рассеяния света дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) (аминной группы C - NH₂, входящей в состав аденина, гуанина, цитозина) в тканях с гистологически подтвержденным раком предстательной железы, и обратное снижение интенсивности рамановского рассеяния света ДНК в тканях с ДГПЖ.

Рамановская спектроскопия показала спектральные различия в биохимическом составе тканей с доброкачественной гиперплазией и тканей с раком предстательной железы, в особенности в спектрах, связанных с нуклеиновыми кислотами.

В перспективе данный метод исследования может быть использован для разработки диагностического алгоритма выявления рака предстательной железы. [23,24,25]. Использование волоконно-оптических датчиков в конструкции лапароскопов, цистоскопов, пункционных игл позволило бы на дооперационном этапе с высокой точностью не только диагностировать новообразование, но и определить объем хирургического вмешательства.

Обладая значительными преимуществами в виде высокой специфичности, проведением измерений в режиме реального времени, отсутствием противопоказаний, по сравнению с традиционными технологиями диагностики опухолей мочевого пузыря, РС имеет серьезные перспективы использования метода в качестве «оптической биопсии».

Конфликт интересов отсутствует

Павлов В.Н., Билялов А.Р., Гильманова Р.Ф., ФГБОУ ВО «Башкирский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России, г. Уфа Автор, ответственный за переписку — Гильманова Рита Фларидовна, margaritagilmanova@mail.ru, 89649578448

Литература:

1. Greenlee R.T., Hill-Harmon M. B., Murray T. et al. *Cancer statistics, 2001* // *CA. Cancer. J. Clin.* — 2001. — Vol. 51. — P. 15–36.
2. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J. *Estimates of worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985* // *Int. J. Cancer.* — 1993. — Vol. 54. — P. 594–606.
3. Quinn M., Babb P. *Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons* // *BJU Int.* — 2002. — Jul. — Vol. 90. — № 2. — P. 162–173.
4. Ries L.A. G., Kosary C.L., Hankey B.F. et al. *SEER Cancer Statistics Review 1973–1995*. Bethesda, MD. — National Cancer Institute, 1998.
5. http://uroweb.org/fileadmin/guidelines/Guidelines_2014_5_June_2014.pdf
6. Аврамова, С. Т., Александров, Н. С., Бабичева,

- Т. О., Кукушкин, В. И., Кириллов, Ю. А. Возможности применения рамановской спектроскопии в онкоурологии / С.Т. Аврамова, Н.С. Александров, Т.О. Бабичева, В.И. Кукушкин, Ю.А. Кириллов // *Пространство и Время*. — 2017. — № 1(27). — С. 247–250. Стационарный сетевой адрес: 2226-7271prov_rst1-27.2017.102.
7. Александров М.Т., Зубов С.В., Березинская А.С., Кукушкин В.И., Паиков Е.П., Иванченко О.Н. Экспериментально-теоретическое обоснование принципов и особенностей применения метода лазерно-конверсионной диагностики для оценки состояния твердых тканей зуба в норме и при патологии (кариес) // *Российский стоматологический журнал*. 2013. № 4. С. 6–10.
 8. Crow P., Stone N., Kendall C.A., Persad R.A., Wright M.P. "Optical Diagnostics in Urology: Current Applications and Future Prospects." *BJU Int.* 92 (2003):400-407. DOI: 10.1046/j.1464-410X.2003.04368.x.
 9. Pence I., Mahadevan-Jansen A. "Clinical Instrumentation and Applications of Raman Spectroscopy." *Chemical Society Reviews* 45.7 (2016): 1958–1979. DOI: 10.1039/c5cs00581g.
 10. W.C. Allsbrook Jr., K.A. Mangold, W.C. Allsbrook, M.H. Johnson, R.B. Lane, C.G. Lane, M.B. Amin, D.G. Bostwick,
 - P.A. Humphrey, E.C. Jones, V.E. Reuter, W. Sakr, I.A. Sesterhenn, P. Troncoso, T.M. Wheeler and J.I. Epstein, *Inter-observer reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: urologic pathologists*, *Human Pathology* 32 (2001), 74–80.
 11. Рамановская спектроскопия азотистых оснований нуклеиновых кислот Батищев А. И., Каримов А. Р., Калташев В. В., Плотниченко В. Г., Шмелев А. К., Щеглов В. А., 68-72. 2016.
 12. Беккер Ю. Спектроскопия. Москва: Техносфера, 35-44. 2009.
 13. Горелик В.С. Комбинационное рассеяние света // *Соросовский образовательный журнал*. — 1997. - №6. — С.91-96.
 14. 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
 15. Компания INTERTECH Corporation. Введение в рамановскую спектроскопию // *Пластические массы*. — 2009. — № 8. — С. 7-13.
 16. Ландау, Л. Д., Лифшиц, Е. М. *Квантовая механика (нерелятивистская теория)* // *Теоретическая физика — том III издание 4-е*. — М.: Наука, 1989. — 768 с.
 17. J.D. Venable, W. Scuba, and A. Brick, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* 24,642–645 (2013).
 18. (2) I. Chu, in *Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies*, W.A. Korfmacher, Ed. (CRC Press, Boca Raton, Florida, 2010), pp. 99–126.
 19. *International Technology Roadmap for Semiconductors (ITRS 2.0)*, Semiconductor Industry Association (2015), http://www.semiconductors.org/main/2015_international_technology_roadmap_for_semiconductors_itrs/.
 20. *Semiconductor Equipment and Materials International (SEMI) (Organization, Milpitas, California, <http://www.semi.org/en/>)*.
 21. *SEMI Book of Standards (BOSS): Process Chemicals (Updated periodically, <http://ams.semi.org/ebusiness/standards/semistandard.aspx?volumeid=13>)*.
 22. *SEMI C27-0708 - Specifications and Guidelines for Hydrochloric Acid, <http://ams.semi.org/ebusiness/standards/SEMISTandardDetail.aspx?ProductID=211&DownloadID=30>*.
 23. S.D. Tanner and V.I. Baranov, *At. Spectrosc.* 20(2), 45–52 (1999).
 24. K. Kawabata Y. Kishi, and R. Thomas, *Anal. Chem.* 75(9), 423A (2003).
 25. Y. Kishi and K. Kawabata, *At. Spectrosc.* 23(5), 165–169 (2002).