

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский
университет» Минздрава России**

На правах рукописи

Плеханов Антон Андреевич

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УПРУГИХ СВОЙСТВ ТКАНИ
МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ЭЛАСТОГРАФИИ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ОТВЕТА ОПУХОЛИ НА ТЕРАПИЮ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

1.5.2. – биофизика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д.м.н., профессор Н.Д. Гладкова

Научный консультант:

д.ф.-м.н. В.Ю. Зайцев

Нижний Новгород – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	15
1.1 Методы противоопухолевой терапии.....	15
1.2 Традиционные методы исследования эффективности терапии опухоли в эксперименте и клинической практике.....	19
1.3 Упругость тканей как маркер онкологического поражения.....	24
1.4 Изучение структуры тканей по анализу модуля упругости методом оптической когерентной эластографии.....	48
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	56
2.1 Объекты исследования.....	56
2.2 Оборудование.....	63
2.3 Методы и методики исследования.....	66
Глава 3. Результаты.....	84
3.1 <i>In vivo</i> исследование упругости микроструктур экспериментальных опухолей методом оптической когерентной эластографии.....	84
3.1.1 Выбор оптимальной модели и терапевтических доз лекарственных препаратов.....	84
3.1.2 Исследование эффективности противоопухолевой терапии на модели рака молочной железы 4T1.....	91
3.1.3 Исследование эффективности противоопухолевой терапии на модели колоректального рака СТ-26.....	107
3.2 <i>Ex vivo</i> исследование упругости микроструктур образцов опухолей человека методом оптической когерентной эластографии....	120
3.2.1 Визуализация микроструктуры рака молочной железы.....	120

3.2.2 Визуализация патоморфологических изменений рака молочной железы после неoadьювантной химиотерапии. Оценка ответа опухоли на терапию.....	123
3.2.3 Визуализация микроструктуры колоректального рака.....	129
Глава 4. Обсуждение результатов	138
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	147
ВЫВОДЫ	153
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	154

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А-скан – график изменения интенсивности ОКТ-сигнала от глубины

ИПФ РАН – Институт прикладной физики Российской академии наук

КР – колоректальный рак

КТ – компьютерная томография

ММ – мультимодальное (многофункциональное)

МРТ – магнитно-резонансная томография

НАХТ – неoadъювантная химиотерапия

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОКЭ – оптическая когерентная эластография

РМЖ – рак молочной железы

ТРО – торможение роста опухоли

УЗИ – ультразвуковое исследование

BI-RADS – *Breast Imaging-Reporting and Data System*, стандартизированная шкала оценки результатов маммографии

RCB – *Residual Cancer Burden*, система оценки степени выраженности патоморфологического ответа опухоли

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*, факторы роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Поиск новых терапевтических подходов к лечению злокачественных опухолей не теряет актуальности. В клинической практике для лечения онкологических заболеваний, помимо традиционной хирургии и резекции опухоли, апробируются и применяются новые терапевтические подходы: лекарственная терапия (химиотерапия, гормональная терапия, таргетная терапия и иммунотерапия), радиотерапия, криотерапия, фотодинамическая терапия и другие [1, 2]. Многие виды лечения используются в комбинациях. Однако применяемые подходы к терапии онкологических заболеваний не всегда обладают достаточной эффективностью, и при этом у большинства пациентов вызывают серьезные побочные эффекты [3]. Эффективность терапии в клинической практике часто оценивается на основании изменения размеров опухоли, измеренных классическими диагностическими методами – рентгеноскопией, ультразвуковой диагностикой, магнитно-резонансной и компьютерной томографией [4]. Классический подход предполагает подтверждение результатов терапевтического воздействия на послеоперационном этапе золотым стандартом гистологического исследования. Однако применение новых методов противоопухолевой терапии требует новых подходов к оценке терапевтического ответа, позволяющих получать информацию о многообразии биологических свойств и функциональном состоянии опухоли.

На доклиническом этапе апробации оценка эффективности различных по механизму и направленности действия лекарственных противоопухолевых препаратов проводится на опухолевых моделях животных [5]. Классически, эффективность терапии в эксперименте оценивается по степени торможения роста солидной опухоли, по изменению массы тела и по продолжительности жизни животного. Результаты подтверждаются гистологическим исследованием путём обнаружения патоморфологических изменений в препаратах опухолей [6,

7]. Данные критерии оценки могут дать ответ на вопрос об эффективности лекарства только в случае умерщвления животного (для проведения патоморфологического анализа) и по истечению некоторого времени [7]. Разработка малоинвазивного (не повреждающих целостность биоткани) прижизненного метода высокоточного определения гистологических структуры опухоли, характеризующих действие испытуемых препаратов, обеспечит прицельность проведения гистологического исследования, что в свою очередь приведёт к сокращению длительности эксперимента и количества необходимого числа животных для доказательной базы исследования.

Действие лекарственных агентов напрямую или косвенно направлено на гибель опухолевых клеток. Комплекс индуцированных терапией деструктивных изменений структуры опухоли именуется ответом опухоли на лечение или лечебным патоморфозом [8]. Известно, что морфология мягких биотканей (к которым, в том числе относятся солидные опухоли) определяет её упругие свойства [9]. Исходя из этого, стоит полагать, что патоморфологические изменения опухолевой структуры повлекут за собой изменения её упругих свойств.

Упругие свойства характеризуют способность ткани при сжатии сопротивляться упругим деформациям, количественно выражаются модулем Юнга, также часто называемым модулем упругости (единица изменения – Паскаль – Па) [10]. В медицинской диагностике уже много веков применяется ручная пальпация, но только в недавнее время появились инструментальные средства и алгоритмы, позволяющие получать количественную оценку упругих свойств с высокой точностью на различной глубине [11]. Методы УЗИ и МРТ были дополнены функцией эластографии для дифференциации доброкачественных и злокачественных образований, что позволило увеличить точность и специфичность диагностики [12]. Методы УЗИ- и МРТ-эластографии способны определять локализацию и осуществлять мониторинг изменения размеров опухоли, но в силу

недостаточной разрешающей способности не ставят перед собой задачи изучения опухолевой морфологии [13].

Возможным перспективным методом для визуализации морфологической структуры опухолей и ее динамики в ходе лечения может стать компрессионная оптическая когерентная эластография (ОКЭ) [14, 15]. Метод ОКЭ позволяет судить о гистологической структуре с разрешением 40-50 мкм посредством оценки модуля упругости ткани [13]. Метод эластографии реализуется с помощью оптического излучения ближнего инфракрасного диапазона, используемого в оптической когерентной томографии (ОКТ) [16]. ОКЭ характеризуется высокой разрешающей способностью, возможностью проведения прижизненных малоинвазивных (не повреждающих целостность биоткани) исследований без использования каких-либо контрастирующих агентов [17]. Предполагается, что метод ОКЭ способен как судить о микроструктурных гистологических особенностях изучаемой опухолевой ткани, так и обнаруживать патоморфологические структуры, возникшие в результате воздействия на опухолевую ткань лекарственных препаратов. Поэтому развитие метода ОКЭ для задач определения микроструктуры и патоморфологических изменений опухолевых тканей в эксперименте и клинической практике требует углубленного изучения и поиска ответов на ряд нерешенных вопросов.

1. Ранее рядом исследований продемонстрированы возможности метода ОКЭ отличать опухолевую ткань от неизменённой [13, 18], однако детальные оценки не были проведены:

- нет данных о возможности ОКЭ выделять области гистологических структур, имеющих собственную топографию и границы и коррелирующих с гистологическими изображениями; не были продемонстрированы диапазоны абсолютных значений модуля упругости таких структур как группы опухолевых клеток, опухолевая

строма, неизменённая окружающая опухоль ткани, которые позволяли бы объективно охарактеризовать получаемые ОКЭ изображения;

- нами не найдено работ, где ОКЭ изображения демонстрируют гистологические структуры тканей опухолевых моделей и патоморфологические изменения, возникших после проведенной лекарственной терапии. Это составляет актуальную задачу малоинвазивного контроля эффективности новых препаратов и терапевтических подходов в онкологии, которую мы и решаем в нашем исследовании.

2. Метод ОКЭ может быть применен для обнаружения патоморфологических изменений опухолевой ткани у пациентов, получавших неoadъювантную (предоперационную) терапию. Решение этой задачи требует доказательных исследований. Развитие подхода интраоперационного определения эффективности неoadъювантной терапии на уровне клеточных изменений может иметь важное значение в корректировке прогноза заболевания [19] и оптимизации объёма хирургического вмешательства [20, 21].

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы состоит в обосновании использования упругих свойств ткани, измеренных методом оптической когерентной эластографии (ОКЭ), для выявления гистологических структур биологической ткани и оценки эффективности противоопухолевой терапии. Для достижения поставленной цели нами решались следующие задачи:

1. Определить диапазоны значений модуля упругости гистологических структур, возникающих при воздействии таргетного антиангиогенного и алкилирующего препаратов на экспериментальные опухоли, методом ОКЭ.
2. Произвести сегментацию ОКЭ изображений на основе найденных характерных диапазонов значений модуля упругости гистологических

структур и определить уровень корреляции результатов ОКЭ-сегментации с результатами традиционного гистологического сегментирования.

3. Определить степень ответа экспериментальной опухоли на химиотерапию по процентному содержанию жизнеспособных опухолевых клеток, выявленных на основе характерных значений модуля упругости методом ОКЭ. Определить диагностическую значимость такого способа.
4. Определить характерные значения модуля упругости гистологических структур послеоперационных образцов рака молочной железы (РМЖ) пациентов, в том числе, после неоадьювантной химиотерапии, и послеоперационных образцов колоректального рака (КР) пациентов. Произвести оценку ответа РМЖ на неоадьювантную химиотерапию по процентному содержанию жизнеспособных опухолевых клеток, выявленных на основе характерных значений модуля упругости методом ОКЭ.

Научная новизна

Впервые для экспериментальных опухолей солидного строения / гистиоидного типа установлены диапазоны значений модуля упругости следующих гистологических структур: жизнеспособные опухолевые клетки; опухолевые клетки, подвергшиеся дистрофическим изменениям; отёк и некроз опухолевой ткани.

Впервые для опухолевых моделей и послеоперационных образцов опухолей установлена высокая корреляция между площадями гистологических структур, определённых на гистологических изображениях и эластографических картах.

Впервые установлена диагностическая значимость способа определения ответа опухоли на лечение по упругим свойствам

жизнеспособных опухолевых клеток, измеренным методом ОКЭ на экспериментальных опухолевых моделях.

Впервые определены значения модуля упругости гистологических структур послеоперационных образцов РМЖ и КР пациентов методом ОКЭ.

Впервые осуществлена оценка степени ответа опухоли молочной железы пациента на неoadъювантную химиотерапию по процентному содержанию жизнеспособных опухолевых клеток, выявленных на основе характерных значений модуля упругости методом ОКЭ.

Научно-практическая значимость

Данная работа раскрывает высокую диагностическую ценность упругих свойств ткани, определённых методом компрессионной ОКЭ, для задач оценки ответа опухоли на терапию в экспериментальных исследованиях и клинической практике. Дальнейшее развитие метода и всестороннее изучение упругих свойств различных гистологических структур, характеризующих определённые клинические нозологии, помогут разработать стандарты для внедрения компрессионной ОКЭ как высокоразрешающего метода экспресс-диагностики микроструктуры ткани для применения в экспериментальных исследованиях и практической медицине.

Выявленные в ходе исследования значения модуля упругости гистологических структур ткани опухолей могут быть использованы как для определения их топографии и границ, так и в качестве экспресс метода оценки ответа опухоли на производимую терапию. Основные результаты работы могут быть включены в соответствующие разделы спецкурсов и лекций курса по биомедицине и биофизике.

Научная новизна и практическая значимость исследования подтверждены патентом: А.А. Плеханов, М.А. Сироткина, Е.В. Губарькова, В.Ю. Зайцев, А.А. Советский, С.С. Кузнецов, Л.А. Матвеев,

А.Л. Матвеев, Е.В. Загайнова, Н.Д. Гладкова / Способ прижизненной оценки микроструктуры опухолевой ткани в эксперименте // Патент на изобретение № 2732823, заявка № 2020114397, приоритет от 22.04.2020, регистрация от 22.09.2020.

Положения, выносимые на защиту:

1. Различия в упругих свойствах таких гистологических структур опухоли как жизнеспособные и дистрофически изменённые опухолевые клетки, строма опухоли, отёк и некроз ткани, и их отличие от свойств нормальной слизистой оболочки кишки и жировой ткани молочной железы могут быть обнаружены методом компрессионной ОКЭ по характерным диапазонам модуля упругости.
2. Сегментация микроструктур опухоли на основе диапазонов модуля упругости сопоставима с традиционным гистологическим сегментированием и имеет с ним высокую прямую корреляционную зависимость ($r=0,93-0,99$; $p<0,001$).
3. Метод компрессионной ОКЭ с диагностической точностью 83-94% определяет степень ответа экспериментальной опухолевой модели на проводимую терапию по процентному содержанию жизнеспособных опухолевых клеток.

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в постановке и проведении экспериментальных исследований, в получении всех видов изображений, систематизации, обработке и интерпретации всех полученных данных. Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов осуществлялось совместно с д.м.н. профессором Н.Д. Гладковой, к.б.н. М.А. Сироткиной и к.б.н. Е.В. Губарьковой. Физико-математическая разработка методики компрессионной оптической когерентной эластографии осуществлялась научной группой ИПФ РАН под

руководством д.ф.-м.н. В.Ю. Зайцева. Морфологическая оценка полученных гистологических изображений осуществлялась совместно с д.м.н. доцентом С.С. Кузнецовым.

Степень достоверности

Приведенные в работе научные положения и выводы по полученным результатам основаны на данных, объем которых обеспечивает статистическую достоверность. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0, GraphPad Prism 8.0 и Microsoft Excel 2010.

Апробация, внедрение

Основные материалы работы доложены и обсуждены на 10 международных, 9 всероссийских и 3 региональных конференциях, 2 научных конкурсах; 7 докладов были отмечены наградой за лучшее выступление.

Результаты доложены на научной сессии молодых учёных и студентов "Медицинские этюды" (Нижний Новгород, 2018); на 23 и 24 Нижегородских сессиях молодых учёных (пансионат «Морозовский», 2018, 2019), где отмечены дипломом за высокий научный уровень доклада; на VI, VII и VIII симпозиумах по оптике и биофотонике (Саратов, 2018-2020), где отмечены дипломами II и III степеней; на V, VI и VII Всероссийских конференция молодых ученых и студентов с международным участием "VolgaMedScience" (Нижний Новгород, 2019-2021), где дважды отмечены дипломами III степени; на XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов" (Москва, 2019); на X Российском онкологическом конгрессе (Нижний Новгород, 2019); на 72, 73 и 74 Всероссийских с международным участием школах-конференциях молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2019-2021), где отмечены дипломом I степени; на

Международном симпозиуме «Topical Problems of Biophotonics-2019» (Нижний Новгород-Углич-Нижний Новгород, 2019); на VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019); на конкурсе инновационных проектов "УМНИК-2019" (Нижний Новгород, 2019); на XIII областном конкурсе молодёжных инновационных команд "РОСТ 2019" (Нижний Новгород, 2019), где отмечены дипломами I степени и за высокий научный уровень проекта; на Петербургском международным онкологическом форуме «Белые ночи» (онлайн форум, Санкт-Петербург, 2020); на Первом Крымском форуме «Онкология, патоморфология и патофизиология: от теории к практике» (онлайн форум, Симферополь, 2020); на международном форуме «Photonics West» (онлайн форум, Сан-Франциско, США, 2021); на XXIV Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (онлайн форум, Санкт-Петербург, 2021), на международном конгрессе фотоники «European Conferences on Biomedical Optics 2021» (онлайн форум, Мюнхен, Германия, 2021), на международном конгрессе Европейского медицинского общества онкологии «ESMO» (онлайн форум, Париж, Франция, 2021).

Результаты диссертационной работы были внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории оптической когерентной томографии НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет" Минздрава России.

Апробация диссертации была проведена 06.11.2020 на ученом совете НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет" Минздрава России.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 45 печатные работы, из них: 17 публикаций в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 28 публикаций в сборниках материалов научных конференций. Получен патент на изобретение.

Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования поддержаны грантом Президента РФ (МК-905.2017.7), проектами РНФ (18-75-10068) и РФФИ (18-32-20056). Получен грант РФФИ «№ 19-315-90087 Аспиранты» для молодых учёных, обучающихся в аспирантуре, на выполнение фундаментальных научных исследований.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 189 страницах, включает 14 таблиц и 48 рисунков. Список литературы содержит 250 источников, из них 225 зарубежных.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Методы противоопухолевой терапии

Согласно статистике, опубликованной Международным агентством по исследованию рака (*International Agency for Research on Cancer*), в 2012 году было зарегистрировано около 14,1 миллиона новых случаев онкологических заболеваний (7,4 миллиона у мужчин и 6,7 у женщин, соответственно), что привело к 8,2 миллионам летальных исходов. Согласно данным Глобальной онкологической обсерватории (*Globocan*), к концу 2020 году число новых злокачественных новообразований приблизится к отметке 15 миллионов случаев и 12 миллионов смертей [22]. Среди нозологий опухолевого поражения наиболее распространёнными являются рак легкого, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени и простаты. Хотя в последние годы было предложено и внедрено большое количество диагностических и терапевтических подходов в отношении злокачественных новообразований человека, качество жизни и исходы болезней пациентов остаются неудовлетворительными, ввиду агрессивного биологического поведения некоторых гистологических подтипов опухолей; наблюдаемых острых, промежуточных или поздних побочных эффектов проводимой терапии, возникновения иммуносупрессии с нейтропенией, повышенного риска инфекций; а также, возникновения вторичных опухолевых образований через различные интервалы времени, в течение нескольких недель/месяцев/лет после окончания противоопухолевой терапии [1, 23, 24].

На сегодняшний день в клинике широко используются различные подходы к противоопухолевой терапии. Стандартным методом терапии опухолей различных локализаций остается химиотерапия – лекарственная терапия, основанная на введение в организм больного химиотерапевтических агентов. Существует несколько различных классов противоопухолевых лекарственных химиопрепаратов, характеризующихся различными механизмами действия. Сейчас одними из основных

клинически-востребованных являются цитотоксические алкилирующие химиопрепараты, направленные на нарушение деления и последующую гибель опухолевых клеток посредством присоединения алкильной группы к ДНК и необратимым нарушением структуры молекулы [25]. Наиболее широко используемыми в клинике алкилирующими терапевтическими агентами признаны Циклофосфамид, Цисплатин и Оксалиплатин [26]. Однако побочные эффекты от проведения алкилирующей лекарственной терапии высоки, они связаны с отсутствием избирательности их действия и вмешательством в процессы митоза всех быстро делящихся клеток организма (клеток костного мозга, слизистой оболочки полости рта и желудочно-кишечного тракта, репродуктивной системы, волосяных фолликулов). К наиболее распространенным побочным эффектам относят подавление функций костного мозга, миелосупрессию (снижение производства клеток крови, и, следовательно, иммуносупрессия), тошноту и рвоту (эметогенный эффект), усталость, алопецию (выпадение волос), мукозиты (воспаление слизистой пищеварительного тракта), снижение фертильности и риск развития вторичных злокачественных новообразований [26, 27].

В последнее десятилетие широкое развитие получил таргетный подход к лекарственной терапии опухоли. Чаще используются моноклональные антитела. Такие препараты избирательно блокируют рост опухолевых клеток посредством вмешательства в механизмы действия целевых (таргетных) молекул, являющихся важным звеном канцерогенеза и роста опухоли [28]. Отдельные препараты уже прошли лицензирование и хорошо зарекомендовать себя в клинической практике; наиболее признанные из них:

- Ритуксимаб (нацелен на CD20 в В-клетках; терапия неходжкинских лимфом) [29];
- Трастузумаб (нацелен на рецептор HER2/Neu; терапия некоторых молекулярных типов рака молочной железы) [30];

- Бевацизумаб (нацелен на циркулирующие в крови VEGF-лиганды, предотвращает взаимодействие VEGF с его рецепторами Flt-1 и KDR на поверхности эндотелиальных клеток; терапия рака толстой кишки, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого) [31].

Согласно клиническим рекомендациям по лечению опухолей различных локализаций, противоопухолевые лекарственные агенты используются как в комбинациях друг с другом, так и отдельно в качестве монопрепарата, до и/или после операции [32]. Выбор режима лечения включает анализ следующих факторов: природу опухоли, локализацию новообразования, стадию заболевания, анамнез и другие особенностей клинической картины пациента. В связи с вышеизложенным, противоопухолевая лекарственная терапия опухолей подразделяется на следующие типы [27, 33]:

1. Монотерапия – вид противоопухолевой лекарственной терапии, при котором протокол лечения состоит из использования только одного терапевтического агента.
2. Комбинированная терапия – вид противоопухолевой терапии, при котором протокол лечения может включать в себя, как несколько видов противоопухолевых агентов с различными механизмами действия (минимизирует развитие лекарственной устойчивости опухолевых клеток), так и комбинация с другими видами противоопухолевой терапии (с лучевой, хирургической и т.д.).
3. Консолидационная (консолидирующая) терапия – вид противоопухолевой лекарственной терапии, который обычно проводится после ремиссии для предотвращения рецидивов.
4. Поддерживающая терапия – вид противоопухолевой лекарственной терапии, при котором после основного курса лечения проводится дополнительный со сниженными дозами препаратов. Данный вид лекарственной терапии дает возможность продлить терапевтический эффект и снизить вероятность рецидивов.

5. Неоадьювантная терапия – лекарственная терапия, которая проводится до хирургического вмешательства в целях уменьшения объема опухоли до резектабельных или полного опухолевого регресса.
6. Адьювантная терапия – лекарственная терапия, которая проводится после иссечения опухоли хирургическим путем для профилактики рецидивов.
7. Метрономная терапия – лекарственная терапия, заключающаяся в назначении низких доз цитотоксического препарата без интервальных перерывов в лечении, что позволяет уменьшить токсичность лечения.

Кроме того, процесс лекарственного химиотерапевтического воздействия может включать получение до 2-х (иногда и более) курсов, которые состоят из 4-6 циклов, каждый из которых занимает от 1 до 4 недель получения пациентом лечения и последующих перерывов [2].

Стоит отметить, что в лечении некоторых онкологических заболеваний достигнут значительный прогресс. Комбинация лекарственной терапии и других видов лечения позволила добиться значительного прогресса в лечении глиомы мозга [34], аденокарциномы яичника [35], различных гастроинтестинальных опухолей [36]. Однако в целом, доступные в настоящее время методы диагностики и лечения остаются не вполне удовлетворительными для большинства злокачественных опухолей [3]. Широкий спектр побочных эффектов, тяжёлая переносимость инъекций препаратов, отягощённый анамнез, и другие факторы, с которыми сталкивается онкологический больной в процессе и после проведения лекарственной терапии, требуют разработки высокоэффективных методик диагностики и объективных критериев определения эффективности проводимого лечения.

1.2 Традиционные методы исследования эффективности терапии опухоли в эксперименте и клинической практике

В 1981 году по результатам решений Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в научном издании *Cancer* впервые были опубликованы международные *клинические критерии* оценки опухолевого ответа на лекарственную терапию у *пациентов* [37]. Рекомендации ВОЗ включали необходимость с помощью штангенциркуля или линейки измерение опухоли до и после терапии с регистрацией двух размеров (самого длинного диаметра и самого длинного, перпендикулярного первому, диаметра для каждой опухоли; размеры определялись как при физикальном обследовании опухолевого узла, так и с помощью методов визуализации, на изображениях, полученных при рентгеноскопии, компьютерной томографии и магнитно-резонансной томографии) [38]. В 2002 году была опубликована версия критериев оценки ответа солидных опухолей на лечение – RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) [39, 40]. Они включали: определение размера опухолевого очага (минимальный размер опухоли, который измеряется макроскопически или инструментально (рентгеноскопией / УЗИ ≥ 20 мм; спиральной компьютерной томографией ≥ 10 мм); количество поражений (до 10 новообразований; не больше 5 в одном органе). Эти критерии представлялись более строгими, чем рекомендации ВОЗ 2003 года [41]. В 2009 году опубликована обновленная версия критериев оценки ответа солидных опухолей на лечение – RECIST 1.1 [4]. Впервые документ фокусировал внимание клинициста на расширенных морфологических характеристиках опухоли и включал: определение количества поражений (до 5 новообразований; не больше 2 в одном органе), характеристики опухолевого очага, измерение опухолевого очага по наибольшему диаметру (аксиальная реконструкция), включение в измерение перитуморальных областей, оценку патоморфологии лимфатических узлов, измерения наименьших диаметров лимфатических узлов, возможность применения

позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с введением радиофармпрепарата ^{18}F -фтордезоксиглюкоза [42, 43]. В случае выявления опухолевого очага, разделённого на определенное количество более мелких, его размер определяется, как сумма наибольших диаметров каждого образования. Если размер небольшого очага не представляется возможным измерить, его размер принимается за 5 мм [26]. В системе RECIST степень *ответа опухоли на лекарственную терапию (включая химиотерапию) у больных* подразделяется на 4 типа:

- полный ответ (CR – Complete Response) – исчезновение всех, обнаруженных ранее, опухолевых очагов и снижение размеров всех патологических лимфатических узлов на более, чем 10 мм в абсолютных значениях;
- частичный ответ (PR – Partial Response) – снижение наибольшего размера опухолевого очага на более, чем 30%;
- прогрессирование заболевания (PD – Progressive Disease) – увеличение размера опухоли на более, чем 20% или абсолютный рост опухоли на 5 мм и более, а также появление нового опухолевого очага;
- стабильное заболевание (SD – Stable Disease) – промежуточное состояние между PR и PD [44-47].

Стоит отметить, что при определении эффективности проводимой неoad

ьювантной терапии по изменению размеров опухоли в клинической практике часто используют различные диагностические методы, такие как эндоскопия [48], ультразвуковая диагностика (УЗИ) [49], рентгенодиагностика [50], маммография [51], магнитно-резонансная томография (МРТ) [52], компьютерная томография (КТ) [53], мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) [54], позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) [55] и др. Использование таких технологий позволило помимо очагов опухоли фиксировать поражённые лимфоузлы (их количество и размер), что дало возможность *W. Symmans* в 2007 году

разработать критерий оценки безрецидивной выживаемости пациентов – RCB (*Residual Cancer Burden*), используемый на данный в оценке лечебного патоморфоза рака молочной железы и учитывающий помимо характеристик поражения лимфоузлов размер остаточной опухоли, опухолевую клеточность и наличие рака *in situ* [56].

В экспериментальных исследованиях новых противоопухолевых препаратов на солидных модельных опухолях животных показана эффективность применения критериев RECIST [5]. Такие критерии эффективности терапии мышинных опухолевых моделей построены на вычислении показателя относительного объёма опухоли (*relative tumor volume* – V_r) на финальный день по сравнению с днём начала лечения. Чаще всего для определения степени эффективности терапии у животных по изменению динамики роста опухоли используют методику измерения стандартных размеров опухолевого узла с помощью штангенциркуля [6]. Для мышинных опухолевых моделей установлены следующие RECIST степени эффективности производимой терапии:

- полный ответ (CR) – $V_r = 0$;
- частичный ответ (PR) – $0 < V_r \leq 0,657$;
- стабильное заболевание (SD) – $0,657 < V_r \leq 1,728$;
- прогрессирование заболевания (PD) – $V_r > 1,728$ [7].

Эффективность и востребованность RECIST критериев в исследованиях новых препаратов в эксперименте и в клинической практике бесспорна, однако данная шкала оценки не учитывает патоморфологические процессы, происходящие в опухолевой ткани после воздействия лекарств. Установлено, что именно степень регрессии опухоли имеет высокую прогностическую значимость, поскольку только гистологический ответ (альтеративно-деструктивные морфологические изменения опухоли после терапии) коррелирует с отсутствием рецидивов и высокой выживаемостью пациентов [57-59]. Для оценки ответа на проводимую терапию врач-патоморфолог изучает гистологический материал опухоли и

классифицирует опухолевый ответ согласно той или иной шкале-классификации регрессии [60, 61].

В настоящее время в практике разных клинических школ используются различные подходы и классификации оценки патоморфологического ответа опухоли на проводимую терапию [8]. Известно несколько гистологических классификаций, базирующихся на количественных или качественных критериях, а также их сочетании. Следует обратить внимание, что системы обычно основаны на оценке ответа опухолей конкретной локализации (рак пищевода, прямой кишки, молочной железы и т.д.). Наиболее распространёнными из них являются: классификация по Миллеру и Пэйну [62], классификация Мандарда [58], Кельнская система классификации [63], классификация Руббиа [64]. В основе многих систем гистологической оценки ответа опухоли лежит определение степени клеточности опухоли (площади опухолевых клеток по отношению к площади стромы) и распространённости в ней некротических изменений. Зачастую некроз опухоли с трудом поддается количественному определению, что затрудняет оценку этого показателя. Несмотря на методологические различия предложенных классификаций, все авторы подчеркивают, что полный ответ опухоли демонстрирует полное отсутствие опухолевых клеток в исследуемом материале [8].

Выбор классификации для оценки лечебного патоморфоза во многом зависит от локализации и природы происхождения конкретной опухоли. Стоит отметить, что основное внимание в существующих классификациях оценки опухолевого ответа, прежде всего, уделяется определению относительной части опухоли, сохранившей жизнеспособность, и/или степени ее повреждения [65].

Важно отметить, что определение степени лечебного патоморфоза гистологическими методами имеет своим главным недостатком продолжительность процесса – забор материала, фиксация формалином, гистологическая проводка, парафинирование, нарезка и окрашивание (более

7 дней) [66]. Существует экспресс методика приготовления гистологических криостатных срезов, позволяющая получить гистологические изображения через 25-30 минут после забора материала. Однако качество получаемых изображений (часто встречающиеся артефакты, связанные с повреждением тканей кристаллами льда, растрескиванием срезов, нечётким мутным окрашиванием) и потому достоверность данной методики проигрывает стандартному гистологическому исследованию [67, 68].

Многие исследования направлены на поиск методов, ускоряющих [69]/ упрощающих [70]/ упраздняющих [69, 70] какой-либо этап гистологического исследования. Некоторые предложенные *оптические методы* являются удобной альтернативой гистологическому исследованию [71, 72]. Такие методы могут снизить затраты на реагенты и сэкономить время на исследования. Например, в исследовании *I.A. Bratchenko* комбинация методов Рамановской спектроскопии и аутофлуоресценции при *ex vivo* диагностике образцов рака кожи человека позволила с высокой точностью дифференцировать меланому от базальноклеточного рака [71]. Использование многоспектральной поляриметрии Мюллера в характеристике *ex vivo* образцов рака толстой кишки человека дало возможность *A. Pierangelo* получить качественную информацию о структуре ткани, в высокой степени сопоставимую с результатами гистологического исследования [72].

1.3 Упругость тканей как маркер онкологического поражения

В онкологии используется множество физических методов, позволяющих не только обнаружить опухоль, но и получить информацию, определяющую терапевтическую и хирургическую тактику лечения пациента: топографию глубинного расположения узла, точные границы, опухолевую структуру, распространённость в периферические ткани (глубину инвазии), васкуляризацию опухолевого узла и наличие метастазов в сигнальных лимфатических узлах [73]. Среди таких методов: рентгеновское исследование, компьютерная томография (КТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), ультразвуковое исследование (УЗИ) и современные оптические методы. Если ПЭТ (использующая радиофармпрепараты) предоставляет структурно-функциональную информацию, основанную на молекулярных особенностях конкретной опухоли, то методы рентгеноскопии, КТ, МРТ и УЗИ определяют структурно-анатомические особенности опухоли [74].

Развитие новых модальностей, протоколов работы и алгоритмов обработки сигнала оптических методов позволяет изучать различные свойства и характеристики ткани – доплерографическое изучение сосудистой составляющей опухоли, визуализация отдельных морфологических компонентов путём определения однородности и обратного рассеивания сигнала от ткани, специальные алгоритмы изучения микрососудистой плотности опухоли и т.д. [73, 74].

Одними из информативных показателей опухолевой ткани, применяемых в клинике, становятся ее механические упругие свойства [75, 76]. С давних времен в медицине широко используется методика исследования органов путём поверхностного ощупывания поверхности – пальпация. Данная методика заключается в выявлении упругих свойств изучаемой ткани с помощью осязания. Методические рекомендации по тактике ведения больного включают определение локализации, формы, консистенции и условных размеров опухоли путем пальпаторного

исследования [77] и применяются для диагностики рака органов полости рта и глотки, пищевода, почки, молочной железы, щитовидной железы и органов кроветворения [78-81].

Изменение механического параметра упругости ткани, часто именуемого в русскоязычной литературе «жѐсткостью ткани» (имея в виду меру, обратную эластичности), в настоящее время считается очень важным показателем в развитии канцерогенеза [76]. Упругость – свойство объекта сопротивляться изменению его объѐма или формы (но в то же время деформироваться) под действием внешних механических напряжений и самопроизвольно восстанавливать исходное состояние при прекращении внешних воздействий [82]. Характеризуется главным образом модулями упругости – коэффициентами пропорциональности, связывающими приложенное напряжение и соответствующую упругую деформацию [83]. Из-за различных вариаций способов измерения напряжения и упругой деформации (в зависимости от направления действия силы) существуют множество типов модулей упругости. Основным и наиболее распространѐнным считается Модуль Юнга (чаще называемый просто *модулем упругости*) – характеризует свойство объекта деформироваться вдоль оси при воздействии силы вдоль этой оси и определяется как отношение напряжения к деформации сжатия.

В 1991 году *J. Ophir* предложил термин *эластография* для обозначения клинических методов изучения тканей по упругим свойствам путем механического (чаще компрессионного) воздействия на них и анализа деформаций диагностическими сканерами [84]. Современные методы определения модуля упругости ткани (используемые в клинике методы УЗИ- и МРТ-эластографии), подобно пальпации, позволяют изучить упругие характеристики участка ткани, однако, отличаются от нее возможностью визуального представления результатов, что обеспечивает объективность исследования [13].

В мультидисциплинарном исследовании специалистов *Johns Hopkins University*, опубликованном в *Nature Reviews Cancer* в 2011 году, показано, что способность злокачественных клеток расти и метастазировать зависит от таких факторов, как упругость опухолевой стромы, упругость ядра и ригидности цитоплазмы опухолевых клеток [85]. В экспериментальных исследованиях было показано, что многие опухолевые ткани характеризуются более высокой упругостью по сравнению с нормальными окружающими тканями [86]. Упругость внеклеточного матрикса и натяжение цитоскелета клеток влияют на степень упругости опухолевой ткани и способствуют образованию и поддержанию её напряженного гомеостаза [87, 88]. Известны данные, что механические изменения ткани являются инициатором, а не просто индикатором опухолевой прогрессии [89]. Такая теория онкогенеза свидетельствует о том, что при малигнизации и росте первичной опухоли механические изменения ткани (ремоделирование структуры внеклеточного матрикса, прогрессирующее увеличение его упругости и как итог – повышение упругости ткани) приводят к повышению давления межклеточной жидкости на опухолевые клетки и побуждают их к делению и метастазированию [90, 91].

Многие убедительные исследования показывают, что злокачественные новообразования молочной железы, печени, поджелудочной железы, предстательной железы и толстой кишки характеризуются более высокими значениями модуля упругости по сравнению с окружающей их здоровой паренхимой [92-97].

Есть свидетельства, что упругость тканей напрямую может быть связана с выживаемостью пациентов, страдающих онкологическими заболеваниями – раком молочной железы и раком печени [98, 99]. Однако до настоящего времени не сделано окончательных выводов относительно их прогностической ценности.

Стоит обратить внимание, что значения модуля упругости, обнаруживаемые в послеоперационных изолированных образцах ткани,

могут не соответствовать тем значениям, которыми характеризуется данная ткань *in vivo* до операции [100]. Значения модуля упругости, которыми различные клеточные линии характеризуются в различных модельных и культуральных системах, могут в значительной степени отличаться [101]. Эти отличия зависят от механических свойств клеток исследуемой культуры, их цитоскелета и характеристик микросреды, в которую они встроены. Все эти аспекты определяют получаемые значения модуля упругости [100, 101].

Методу атомно-силовой микроскопии, имеющему сверхвысокое разрешение (до 1 нм), доступно изучение модуля упругости опухолевых клеток и тканей на субклеточном уровне. Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом [102]. Обзор фундаментальных исследований, включающий более 50 работ по атомно-силовой микроскопии опухолей, позволил французским ученым *Университета Сорбонны* сделать заключение о низкой упругости каждой отдельной опухолевой клетки в сравнении с неопухолевой, ввиду выраженной дезорганизации цитоскелета [103]. Исследования, проведенные в *Университете Базеля* и опубликованные в *Nature Nanotechnology*, показали более высокую упругость отдельных фиброзных волокон стромы опухолевой ткани по сравнению с отдельными опухолевыми клетками [104]. Следует отметить, что метод атомно-силовой микроскопии не может обрести прикладную клиническую значимость ввиду высокой продолжительности сканирования (около 30 минут на получение изображения 0,5×0,5 мм) и микроскопической глубины исследования [102].

В повседневной клинической практике используются зарекомендовавшие себя технологии определения упругости ткани, реализуемые на сертифицированных коммерческих установках. Наиболее клинически востребованными коммерческими установками являются: УЗИ установки, оснащённые компрессионной эластографией – фирма

производитель *Hitachi Medical*; или эластографией сдвиговой волны – фирма производитель *SuperSonic Imagine*; магнитно-резонансные томографы, оснащённые эластографией – фирма производитель *Siemens*. В них оцениваются такие количественные меры упругости как модуль упругости (модуль Юнга, кПа) и скорость сдвиговой волны (м/с), значения которой возрастают пропорционально росту значений модуля упругости ткани [105].

Обсуждаемые в данном разделе обзора результаты исследований свидетельствуют о том, что только объективная оценка и точные значения модуля упругости различных микроструктур тканей в каждом органе могут способствовать эффективной и ранней диагностике опухоли или патологического состояния, связанного с повышенным риском развития опухоли.

Упругость ткани при раке молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее частое злокачественное новообразование у женщин. Так в 2018 году по статистике раковых заболеваний, предоставляемой Глобальной онкологической обсерваторией Globocan, включающей оценку заболеваемости и смертности по 36 видам рака в 185 странах мира, зафиксировано 2.088.849 новых случаев РМЖ, повлекших за собой около 627.000 смертей во всем мире [3].

Реальный путь улучшения результатов лечения РМЖ – ранняя диагностика заболевания, его форм и особенностей [106]. Стандартная клиническая диагностика РМЖ состоит из двух этапов: первичная и уточненная диагностика. К первичной диагностике относятся самообследование пациенток (осмотр белья на предмет выделений, общий вид желез и состояние кожи, пальпация в состоянии стоя / лёжа) и индивидуальный осмотр врачами различных специальностей, включающий пальпацию молочных желез и регионарных лимфатических узлов. Нередко первичная диагностика РМЖ при внимательной и тщательной трактовке

выявленных изменений позволяет поставить правильный диагноз и определить дальнейшую терапевтическую тактику. Однако чаще для определения точного диагноза, локализации новообразования и определения его особенностей проводятся инструментальные и лабораторные исследования, относящиеся к этапу уточнённой диагностики [106, 107].

Одним из ведущих методов диагностики РМЖ является рентгенологическое исследование – цифровая маммография [108]. Принцип получения маммографического изображения основан на способности различных тканей в разной степени поглощать рентгеновское излучение [108]. Первичными и основными *качественными* рентгенологическими признаками РМЖ является наличие опухолевой тени звездчатой формы с неровными контурами, гипоехогенным сигналом и гетерогенной структурой с наличием микрокальцинатов. Наиболее четко тень опухоли дифференцируется у женщин старшей возрастной группы на фоне инволюционных изменений ткани молочной железы [106].

Важным *количественным* параметром оценки риска развития РМЖ является маммографическая плотность, определяемая на большинстве современных маммографов автоматически [109]. Маммографическая плотность – мера соотношения между количеством рентгеноконтрастного плотного фиброгландулярного компонента и жирового, была признана эффективным критерием малигнизации молочной железы [109, 110]. В частности, женщины с повышенным соотношением между эпителиальными/стромальными элементами и жировой тканью в молочной железе имеют более высокую вероятность возникновения злокачественных новообразований в течение жизни, чем женщины с более низким значением критерия [111]. Большое количество (десятки тысяч) исследований подтвердило критическую роль оценки маммографической плотности в прогнозировании риска развития РМЖ [112-114].

Для повышения выявляемости РМЖ в клинической практике широко используется метод маммографии с цифровым томосинтезом [115]. Томосинтез – получение серии томограмм молочной железы на разной глубине с последующим формированием 3D изображения. Это снижает вероятность пропустить небольшие новообразования. В недавнем метаанализе точности метода цифровой маммографии по сравнению с цифровым томосинтезом для скрининга и диагностики РМЖ у женщин, отмечающих уплотнения в груди, было показано, что использование цифрового томосинтеза достоверно повышает частоту выявления опухолей [116].

В 2014 году группой канадских исследователей из *Института рака города Онтарио* под руководством профессора *N.F. Boyd* опубликованы результаты маммографического исследования, сопоставляющие биомеханические характеристики ткани молочной железы с риском развития рака. Впервые в этом исследовании описана математическая модель, в которой маммографическая плотность ткани молочной железы связана с ее упругостью (определённой методами эластографии на основе УЗИ и МРТ). Отсюда следует, что повышенные значения каждого из этих параметров связаны с высоким риском развития РМЖ [117]. Результаты этих исследований многократно подтверждались различными методами УЗИ- и МРТ-эластографии. Статистически было доказано, что высокая упругость молочной железы коррелирует с плохим прогнозом инвазивного РМЖ [118, 119], высоко злокачественными молекулярными [120] и морфологическими [121] подтипами РМЖ, метастазированием в регионарные лимфатические узлы [122, 123] и слабым ответом на проводимую неoadъювантную химиотерапию (НАХТ) [124, 125].

Несмотря на эффективность рентгенологического метода, разрешающая способность маммографии резко снижается в ряде ситуаций: при выраженных диффузных формах мастопатии, у молодых пациенток с плотными молочными железами, при наличии имплантатов, выраженных

воспалительных изменениях, отеке железы и фоновых заболеваниях (фиброаденоматоз) [106]. Классически, для таких клинических случаев показано проведение УЗИ молочных желез [126].

В основе УЗИ лежит способность ультразвуковых волн проходить через различные ткани организма, по-разному отражаясь от структур различной плотности [126]. При УЗИ опухоль выявляется в виде гипоэхогенной или анэхогенной зоны чаще округлой формы с неровными контурами [126]. При минимальных размерах опухоли УЗИ молочной железы обладает сравнительно низкой информативностью, поэтому развитие метода УЗИ, его модальностей и развитие алгоритмов обработки сигнала активно продолжаются [127]. В настоящее время в клинической практике применяются доплерографические методики, трехмерная эхография, используются ультразвуковые контрастные препараты, эластографические методики [127]. Развитие клинических установок для проведения ультразвукового исследования, оснащенных эластографической модальностью, дало начало большому количеству исследований, направленных на установление корреляционной взаимосвязи между упругостью опухолевого узла и тяжестью заболевания [128-130].

Эластография в аспекте клинического исследования – это инструментальная визуализация, эквивалентная пальпации [84, 131]. В отличие от ручной пальпации, эластография способна как качественно (по отношению к окружающим тканям), так и количественно определять степень упругости образования или определённого участка ткани. Для эластографии доступна оценка упругости глубоко лежащих образований, ручная пальпация которых затруднена или невозможна [131]. Внедрение эластографической модальности в коммерческие УЗИ системы позволило улучшить оценку различных патологий молочной железы [132], лимфатических узлов [133], щитовидной железы [134], печени [135], почек [136], простаты [137], мышц и сухожилий [138]. Использование эластографической модальности в эндосонографическом исследовании

[139] позволило повысить информативность и возможности визуализации поджелудочной железы [140], лимфатических узлов [141] и печени [142].

Первые клинические достижения метода УЗИ эластографии молочной железы связаны с использованием *компрессионного варианта метода* [143-145]. Стандартная процедура такого исследования заключается в неконтролируемой компрессии молочной железы стандартным УЗИ-датчиком [132]. В 2006 году издание *Radiology* опубликовало исследования научной группы из *Университета Цукабы (Япония)* [145], свидетельствующие, что с помощью методики *компрессионной УЗИ эластографии (соноэластографии)* удавалось с высокой вероятностью качественно дифференцировать злокачественную опухоль от окружающей неопухолевой ткани – упругость опухолевого узла превышала упругость окружающей ткани (Рис. 1а) [145]. Автором впервые была предложена *качественная* классификация поражения груди на основании эластографических карт (Рис. 1б), имеющая высокую диагностическую эффективность (сравнимую с общепринятыми критериями обнаружения злокачественных новообразований молочной железы методами маммографии, УЗИ и MPT – Breast Imaging-Reporting and Data System (BI-RADS) [146]).

Это обеспечило соноэластографии широкую клиническую применимость [145] с определением коэффициента деформации (*Strain Ratio*), который характеризует отношение упругости эталонной ткани (чаще всего используются области жировой ткани ввиду постоянства сигнала) к упругости новообразования [131]. Чем выше коэффициент деформации опухолевой узла, тем выше упругость опухолевой ткани по отношению к окружающим тканям. Коэффициент деформации – *относительный показатель*, но он в некоторой степени позволяет объективизировать наблюдаемую картину упругости участка ткани, открывает возможности проведения мониторинга изменения упругости [147].

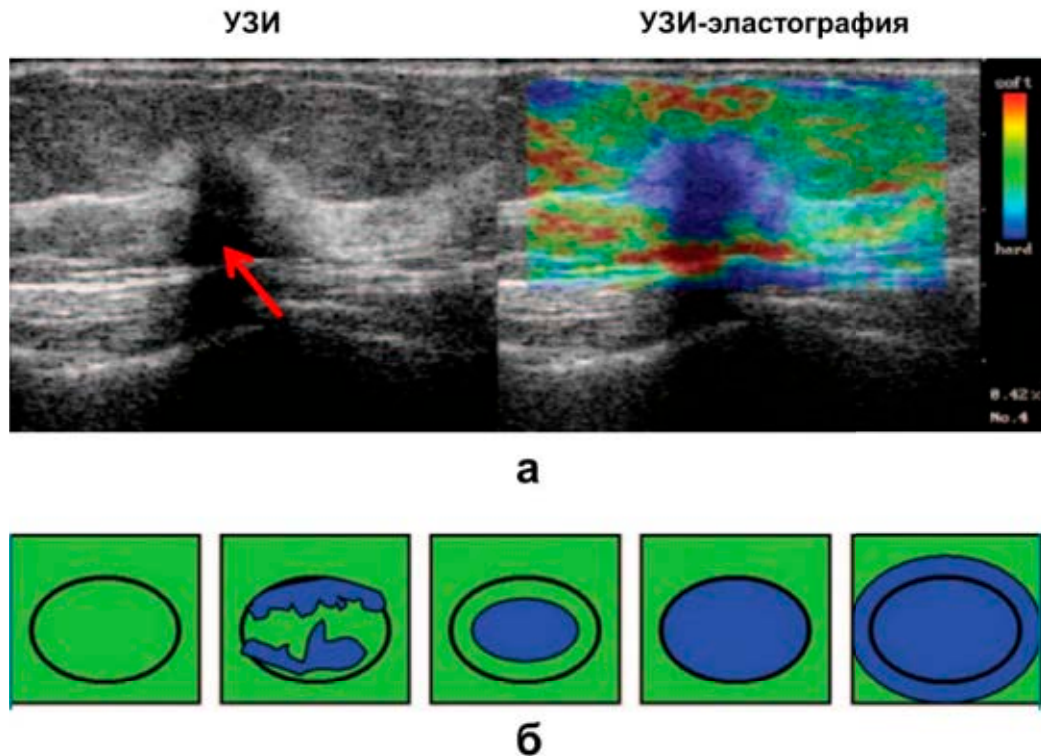


Рисунок 1. а – Изображение инвазивной протоковой карциномы молочной железы, полученное методом компрессионной УЗИ эластографии (соноэластографии) на устройстве EUB-6500 Ultrasonography System (Hitachi Medical, Tokyo, Japan); красная стрелка указывает на исчезновения УЗ-сигнала в проекции опухоли, тогда как на эластографической карте отчётливо видны границы опухолевого узла, который характеризуется высокими значениями модуля упругости по сравнению с окружающей его тканью молочной железы; **б** – схематично представлена качественная классификация поражения груди на основании эластографических карт; чёрный кружок указывает на контур гипоехогенной области (т.е. на границу между исследуемым очагом и окружающей его тканью) на эластографических картах; интерпретация картин слева направо: образования не выявлено, доброкачественное образование, вероятно доброкачественное образование, вероятно злокачественное образование, злокачественное образование [145].

Несмотря на преимущества соноэластографии, заключающихся в достаточной простоте метода, она имеет существенные недостатки [148]:

- доброкачественные образования иногда не видны на эластограмме;
- невозможность получить реальную количественную оценку упругости ткани;

- возможно только сравнение нескольких типов тканей (относительно друг друга), что требует включения в поле зрения эластограммы разных тканей (исследуемый очаг и жировая ткань, железистая ткань, грудная мышца);
- зависимость результата от силы и направления компрессии;
- возникающие ошибки и артефакты, связанные с различной вязкостью, упругостью и неоднородностью изучаемых тканей;
- возможный дискомфорт и болевые ощущения пациента.

Серьезным шагом к повышению диагностической точности эластографического исследования стала разработка *количественного* метода *УЗИ-эластографии сдвиговой волны (ЭСВ)*, принцип которой заключается в получении абсолютных значений модуля упругости (модуля Юнга, кПа), выраженного через установленную чувствительным датчиком скорость распространения сдвиговых волн [129, 144]. В настоящее время существует 2 основные разновидности ЭСВ – поинт-ЭСВ и 2D-ЭСВ. При реализации технологии поинт-ЭСВ определение количественных параметров упругости выполняется в небольшом окне или области интереса, что сильно ограничивает применение данной технологии для изучения ткани молочной железы при учёте вариабельности областей упругости внутри злокачественных образований и отсутствия возможности точного определения области максимальных значений [131]. Тогда как 2D-ЭСВ (технология детально будет обсуждаться в дальнейшем) применяется с целью снижения количества доброкачественных биопсий [149]. Внедрение ЭСВ позволило не только подтвердить более высокую относительную упругость опухолевых узлов по сравнению с окружающими тканями, но и определить абсолютные значения модуля упругости опухоли, что в значительной степени повысило эффективность метода в дифференциальной диагностике новообразований [144, 150]. В своих исследованиях 2011 года, проведенных на Aixplorer® US system (SuperSonic Imagine, Aix en Provence, France) в *Национальной университете Сеула J.M.*

Chang и соавторы установили, что абсолютные значения модуля упругости злокачественной аденокарциномы молочной железы статистически значимо отличаются от значений доброкачественной аденомы (Рис. 2) – 153 ± 58 кПа против 46 ± 43 кПа ($p < 0,0001$) [151].

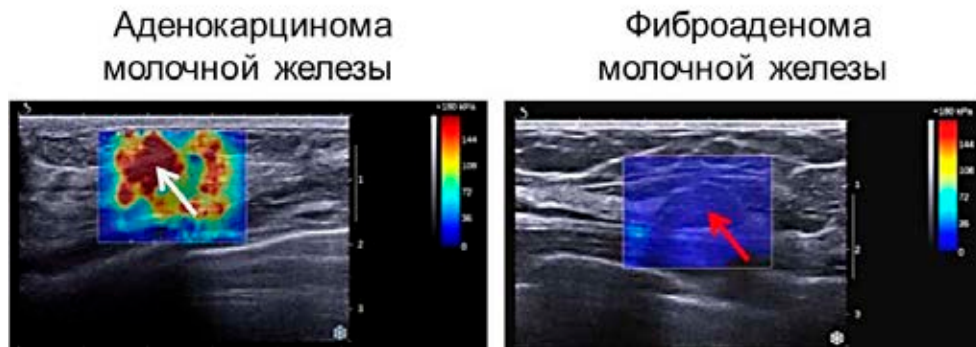


Рисунок 2. УЗИ-эластография сдвиговой волны аденокарциномы и фиброаденомы молочной железы, проведенная на Aixplorer® US system (SuperSonic Imagine, Aix en Provence, France); белая стрелка указывает на высокие значения модуля упругости (153 ± 58 кПа), гистологически соответствующие аденокарциноме молочной железы; красная стрелка указывает на низкие значения модуля упругости (46 ± 43 кПа), гистологически соответствующие фиброаденоме молочной железы; статистически значимые различия между значениями модуля упругости ($p < 0,0001$) подтверждают возможность ЭСВ с высокой точностью дифференцировать злокачественные новообразования от злокачественных [151].

Однако такие значения могут быть не объективны для глубинных локализаций новообразований, где для фокусирования опухоли в области эластографической обработки необходимо предварительное сжатие груди датчиком (прекомпрессия) [152]. Также, нередко прекомпрессия необходима в целях исключения артефактов рефракции (наблюдаемых при отсутствии начального поджатия) от связок Купера [131, 152]. Предварительное сжатие увеличивает начальную общую упругость ткани молочной железы, что искажает истинную картину распределения упругости на изучаемом участке ткани при компрессионном исследовании и исключает получение адекватных абсолютных значений модуля упругости при использовании ЭСВ. Аспекты предварительного сжатия при

проведении эластографического исследования подробно осветил в своей работе 2012 года профессор R.G. Barr из Северо-восточного медицинского университета Огайо, США [152]: в приведённом примере (Рис. 3) процедура исследования доброкачественной кисты усложняется изменением картины упругости окружающих кисту тканей по мере изменения степени предварительного сжатия. При высокой степени прекомпрессии классическая картина кисты приобретает признаки злокачественного образования (высокие значения модуля упругости) (Рис. 3); однако, чаще всего это не сильно сказывается на чувствительности эластографического исследования – при злокачественных поражениях упругость остается выше *порога злокачественности* независимо от степени предварительной компрессии. Но именно оптимальное минимальное предварительное сжатие ткани молочной железы зондом способно обеспечить высокую специфичность эластографического исследования.

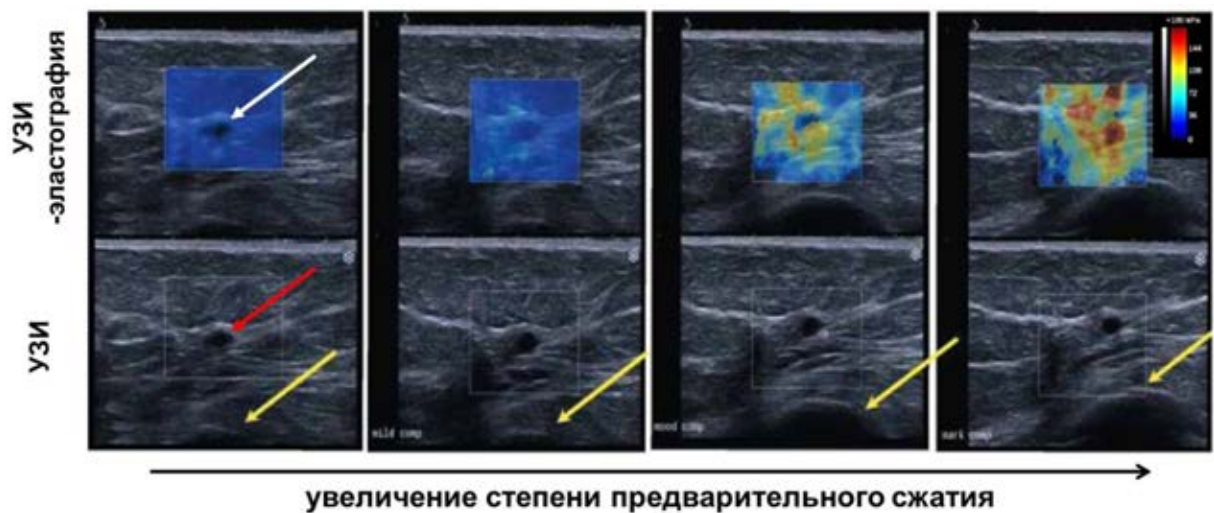


Рисунок 3. Соноэластографическое исследование доброкачественной кисты, проведённое на системе S2000 (Siemens Healthcare, Mountain View, CA). Классическая картина кисты на УЗИ (обозначена красной стрелкой) и эластографическом (обозначена белой стрелкой) изображениях при оптимальной степени предварительного сжатия ткани молочной железы зондом в первом столбце изображений. Изменение эластографической картины при неадекватном увеличении степени предварительного сжатия – приобретение черт злокачественного новообразования на третьем и четвёртом столбце изображений. Желтые стрелки указывают на ребро,

стабильный сигнал от которого можно использовать для определения величины предварительного сжатия [152].

Стоит отметить, что порог злокачественности, определяемый согласно максимальным значениям чувствительности и специфичности идентификации злокачественности образования, в разных исследованиях характеризовался разными значениями (Таб. 1). Это может быть связано с аппаратом, на котором производились измерения, так как подходы к представлению эластометрических параметров у различных фирм производителей отличаются. Однако, даже на одинаковых аппаратах в разных исследованиях были показаны разные пороговые значения для злокачественных образований молочной железы. В таблице 1 отражены пороговые значения для некоторых исследований; значения представлены в виде модуля упругости в кПа (для пересчёта значений скорости сдвиговой волны применена формула: $E \approx 3\rho c_s^2$, где E – модуль упругости, ρ – плотность ткани ($\approx 1000 \text{ кг/м}^3$), c_s – скорость сдвиговой волны (м/с) [129].

Таблица 1. Сравнение установленных порогов злокачественности для опухолей молочной железы пациентов по результатам разных научных исследований методом ЭСВ

Источник информации	Используемый аппарат для исследования методом ЭСВ	Установленный порог злокачественности, кПа
J.M. Chang, <i>et al.</i> (Корея) // Breast Cancer Research and Treatment – 2011 [151]	Aixplorer US system, SuperSonic Imagine, Aix en Provence, Франция	80,2
A. Evans, <i>et al.</i> (Великобритания) // Breast Cancer Research – 2010 [153]	Aixplorer US system, SuperSonic Imagine, Aix en Provence, Франция	50
W.A. Berg, <i>et al.</i> (США) // Radiology – 2012 [149]	Aixplorer US system, SuperSonic Imagine, Aix en Provence, Франция	80
D. Cebi Olgun, <i>et al.</i> (Турция) // Diagnostic and Interventional Radiology – 2014 [128]	Aixplorer US system, SuperSonic Imagine, Aix en Provence, Франция	54,3
В.В. Митьков, <i>и др.</i> (Россия) // Ультразвуковая и функциональная диагностика – 2014 [129]	Aixplorer US system, SuperSonic Imagine, Aix en Provence, Франция	85,7

S. Wojcinski, <i>et al.</i> (Германия) // International Journal of Women's Health – 2013 [154]	Acuson S2000, Siemens, Германия	248
J. Han, <i>et al.</i> (Китай) // Ultrasound in Medicine & Biology – 2019 [155]	Acuson S2000, Siemens, Германия	48
V. Ianculescu, <i>et al.</i> (Франция) // European Journal of Radiology – 2014 [130]	Acuson S3000, Siemens, Германия	33
D.D. Li, <i>et al.</i> (Китай) // European Radiology – 2016 [156]	Acuson S3000, Siemens, Германия	58

Серия работ продемонстрировала высокий потенциал метода ЭСВ в определении эффективности химиотерапии. Работа *F. Chamming* (Парижский университет Декарта), опубликованная в 2016 году в *Ultrasound in Medicine and Biology*, описывает возможность определения эффективности иммунодепрессивной противоопухолевой терапии (препаратом Эверолимус) на модели РМЖ НВСх-3 (клетки опухоли человека) у мышей [157], где контрольные опухоли имели более высокие значения модуля упругости (более 60 кПа), чем опухоли после 12 дней лечения (39 кПа) (Рис. 4). Данные различия были подтверждены большим площадями некроза опухолей после лечения (48%) по сравнению с контролем (9%).

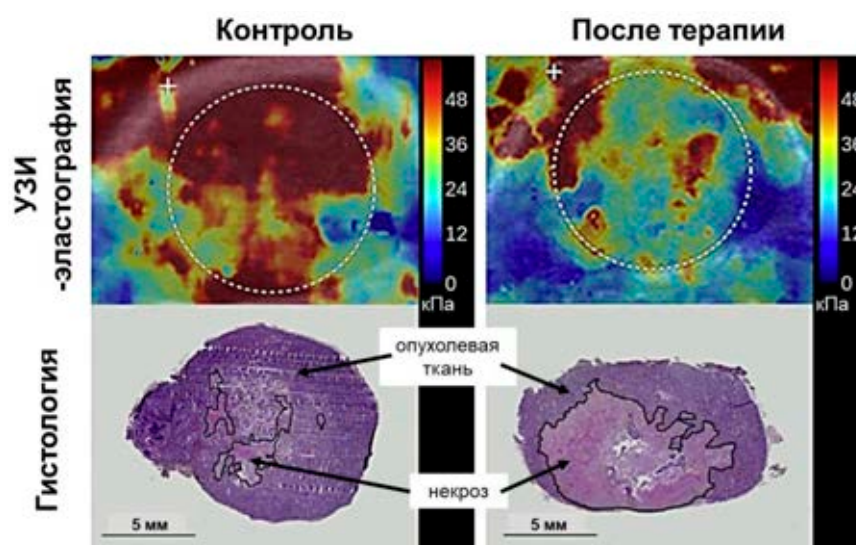


Рисунок 4. Демонстрация методом ЭСВ (Aixplorer® US system SuperSonic Imagine, Aix en Provence, France) снижения значений модуля

упругости РМЖ после проведения терапии (иммунодепрессивным противоопухолевым препаратом Эверолимус), показанного на мышинных опухолях НВСх-3: значения модуля упругости опухолей контрольных групп – более 60 кПа, значения модуля упругости опухолей группы терапии – 39 кПа, снижение значений модуля упругости связано с обширными областями некроза, обнаруженными при гистологическом исследовании; круги на эластографических изображениях – проекция гистологического среза опухолевого узла, приведенного ниже на изображения [157].

Andrew Evans (Университет Данди, Великобритания) в работе, опубликованной в 2018 году в *European Journal of Ultrasound*, продемонстрировал снижение модуля упругости опухолей молочной железы пациентов, ответивших на терапию согласно гистологическому исследованию, с $127,4 \pm 54$ кПа до $90,3 \pm 55$ кПа (Рис. 5), сравнив полученные данные УЗИ эластографии с результатами МРТ исследования (уменьшение максимального диаметра опухоли на $>30\%$ – индикатор ответа опухоли на терапию) и показав возможность определения степени эффективности неoadъювантной химиотерапии методом ЭСВ [125, 158].



Рисунок 5. Демонстрация методом ЭСВ (Aixplorer® US system SuperSonic Imagine, Aix en Provence, France) снижения значений модуля упругости РМЖ пациентов после проведения химиотерапии (3 стандартных цикла препаратов: 5-фторурацил, эпирубицин и циклофосфамид) – с $127,4 \pm 54$ кПа до $90,3 \pm 55$ кПа [158].

В исследовании показано, что использование порогового значения в 50 кПа позволило методу ЭСВ определять эффективность терапии (подтверждая золотым стандартом гистологического исследования) с показателями чувствительности и специфичности – 59% и 91%. В ряде других работ также продемонстрирована возможность метода ЭСВ в определении эффективности проводимой неоадьювантной химиотерапии РМЖ пациентов [124, 159, 160].

Сравнительные исследования клинической эффективности ЭСВ и соноэластографии для определения степени ответа опухоли молочной железы пациента на неоадьювантную химиотерапию описал в своей работе *У. Ма (китайский Медицинский университет г. Шэньян)*, опубликованной в 2017 году в *European Radiology* [147]. По результатам соноэластографического исследования коэффициент деформации РМЖ до лечения составлял $\approx 6,4$, после лечения $\approx 3,1$ (Рис. 6). Результаты исследования ткани РМЖ того же пациента методом ЭСВ в высокой степени коррелировали с результатами соноэластографического исследования – максимальное значение модуля упругости опухолевого узла до лечения составило 123,3 кПа, после лечения – 17,1 кПа. Снижение упругости опухолевого узла объяснялось отсутствием опухолевых клеток на гистологическом исследовании. Такие результаты говорят об сходных возможностях методов соноэластографии и ЭСВ для прогнозирования степени ответа опухоли молочной железы на неоадьювантную химиотерапию.

Важно отметить, что результаты серии исследований в области УЗИ-эластографии указывают на возможность определения деструктивных изменений опухолевого узла вследствие действия терапевтических агентов [147, 158, 161]. Однако значения модуля упругости в таких исследованиях сильно варьируют (Таб. 2).

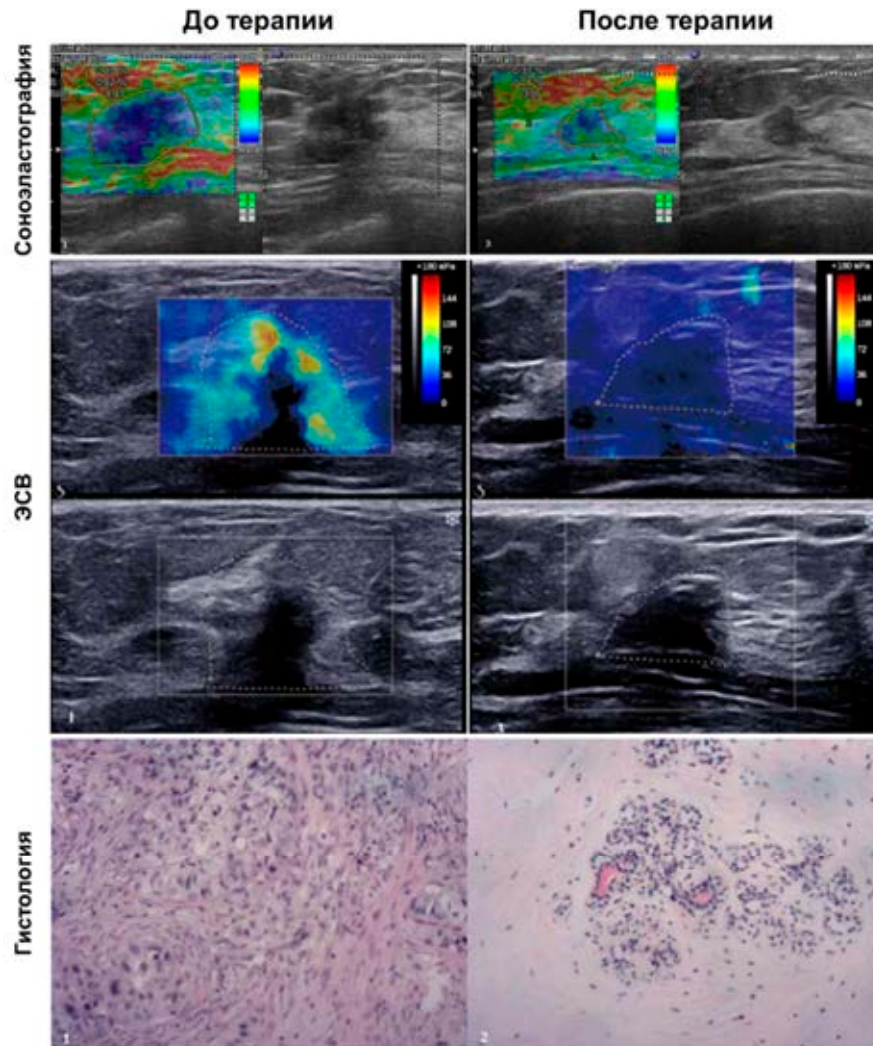


Рисунок 6. Оценка эффективности неoadъювантной терапии (3 цикла доцетаксела, затем 3 цикла эпирубина + доцетаксела) РМЖ пациента методами соноэластографии (HV-900 ultrasound system Hitachi Medical, Tokyo, Japan) и ЭСВ (Aixplorer® US system SuperSonic Imagine, Aix en Provence, France) с подтверждением изменений модуля упругости гистологическим исследованием; на картах упругости жёлтой кривой выделена проекция опухолевого узла согласно УЗИ изображению. Эквивалентные друг другу результаты соноэластографического исследования и ЭСВ показали снижение упругости опухолевого узла в ответ на терапию, что объясняется полным исчезновением опухолевых клеток при гистологическом исследовании (полный ответ) [147].

Невозможность прицельного комплексного изучения гистологических изображений и карт упругости, ввиду огромной разницы в разрешающей способности (разрешающая способность на уровне клетки для гистологического исследования и ~100-500 мкм – для УЗИ-эластографии), затрудняет осуществление адекватного точного определения диапазонов

значений модуля упругости исследуемых гистологических структур и патоморфологических изменений опухолевой ткани [13, 147]. Рисунок 6 демонстрирует результаты этой работы. Вывод объясняет ограничение метода УЗИ-эластографии в определении топографически-точных границ между различными микроструктурами и изменениями ткани молочной железы.

Таблица 2. Сравнение изменений значений модуля упругости опухолевой ткани молочной железы после проведения НАХТ по результатам разных научных исследований методом ЭСВ

Источник информации	Модуль упругости опухолевой ткани до начала НАХТ, <i>кПа</i>		Модуль упругости опухолевой ткани после проведения 6-8 циклов НАХТ, <i>кПа</i>	
	Средний	Максимальный	Средний	Максимальный
Ma, Y. и др. (Китай) // European radiology – 2017 [147]	44,2	123,3	10,9	17,1
Evans, A. и др. (Великобритания) // European Journal of Ultrasound – 2018 [158]	127,4	289	90,3	218
Athanasίου, A. и др. (Франция) // European Journal of Ultrasound – 2017 [161]	148,5	181,6	17,5	20,6

Попытка изучения упругости отдельных микроструктур ткани опухолей молочной железы была сделана научной группой профессора Т.А. Krouskop из Медицинского колледжа Бэйлора (США) еще в 1998 году и опубликована в *Ultrasonic Imaging* [162] (рис. 7). Гомогенные *ex vivo* послеоперационные образцы отдельно взятых компонентов ткани – жировой, стромальной фиброзированной ткани, протоковой карциномы, инвазивной протоковой карциномы были исследованы с помощью гидравлической экспериментальной установки для контролируемой компрессии и тензометрического датчика (преобразует величину деформации в электрический сигнал) с целью определения значений модуля упругости. Метод не подразумевал получения изображений и позволял

определять значения модуля упругости при определённом уровне компрессии образцов. Тип ткани оценивался визуально и подтверждался гистологически. Значения модуля упругости варьировали от 20 ± 6 кПа для жировой ткани до 490 ± 112 кПа для инвазивной карциномы (Рис. 7). Упругость тканей зависела от степени поджатия – наибольшие различия в упругости между образцами зафиксированы при большом поджатии ткани. Упругость жировой ткани не менялась при различной степени поджатия, тогда как упругость опухолевых тканей возрастала в несколько раз.

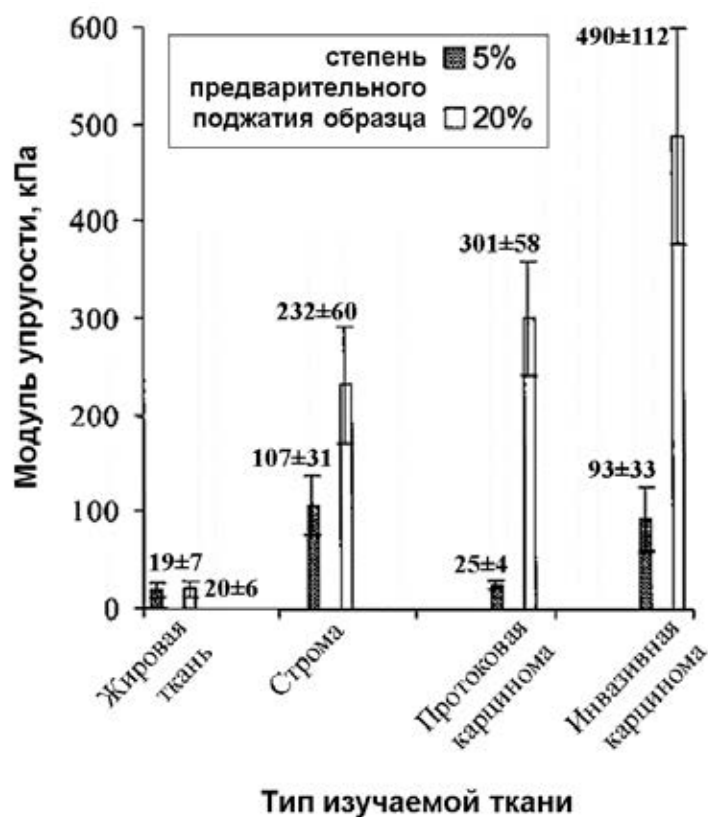


Рисунок 7. Диаграмма значений модуля упругости различных компонентов (структур) ткани молочной железы, полученных при различной степени предварительного поджатия образца (на 5% и 20%) с помощью гидравлической экспериментальной установки для контролируемой компрессии и тензометрического датчика [162].

По итогам обсуждения развития клинических методов оценки опухолевой ткани молочной железы можно наблюдать многообещающий вектор развития широко используемых технологий визуализации

(рентгеноскопия, УЗИ, МРТ, КТ) в сторону модернизации функциональности и работы с сигналом (развитие модальностей). Развитие технологий (в том числе – и изучения упругости) позволяет онкологу получать новую информацию о состоянии опухолевой ткани пациента, что в свою очередь ведёт к повышению диагностической точности комплекса исследований и повышению уровня выживаемости онкологических больных. Однако, разрешение применяемых методов позволяет выполнять мониторинг изменения размеров и упругости опухолевого узла в целом и исключает высокочувствительное определение ранних микроскопических изменений морфологии ткани.

Упругость ткани при колоректальном раке

В 2018 году колоректальный рак (опухоли ободочной и прямой кишки; КР) по статистике Глобальной онкологической обсерваторией Globocan стал третьим по частоте встречаемости онкологическим заболеванием с 1.800.000 новых случаев, и четвертым – по смертности, включающий статистику 881.000 смертей во всем мире [3].

Риск развития колоректального рака в возрасте до 40 лет низок. Однако он резко возрастает в возрасте после 50 лет, что связано с развитием рака из аденоматозных полипов, озлокачествление которых происходит в среднем за 10-15 лет. Смертность от колоректального рака низка, если болезнь выявлена на ранних стадиях [163].

Стандартное обследование пациентов с подозрениями на КР включает сбор анамнеза, взятие анализа кала на скрытую кровь, пальцевое ректальное исследование, проведение колоноскопии с возможным контрастированием и параллельным взятием биопсии [32, 164]. Другие инструментальные методы: УЗИ, КТ и МРТ – являются дополнительными методами исследования, применяются редко по особым показаниям для уточнения степени распространенности опухолевого процесса (чаще для определения

регионарных и отдалённых очагов метастазирования, но не для изучения поражённой стенки кишки) [164].

Недостаточное исследование упругости ткани колоректального рака человека ограничено малым числом работ на клетках и матриксе *in vitro*, а также на образцах рака *ex vivo* с применением технологий изучения упругости, практически не используемых в клинической практике (атомно-силовая микроскопии; иммуногистохимический анализ с корреляцией степени экспрессии генов и упругости матрикса, изученного на экспериментальных авторских установках).

Фундаментальные исследования биомеханических свойств опухолевой стромы (межклеточного матрикса опухоли толстой кишки человека), проведённые в *Калифорнийском университете* в 2017 году, включали оригинальные алгоритмы исследования активной микрореологии по технологии оптического пинцета методами флуоресцентной микроскопии с временным разрешением и масс-спектрометрии [165]. Установлено сильное влияние опухолевого межклеточного матрикса на активность раковых клеток и формирование изменённой сосудистой сети опухоли. Сосудистая сеть характеризовалась преобладанием ветвистых сосудов большого калибра. Активная микрореология, исследуемая на модифицированном инвертированном микроскопе и оригинальном устройстве для изучения градиента деформации (*R.L. Bennett Engineering*), установила 3х кратное превышение упругости опухолевого матрикса, по сравнению с неопуховым [165].

Изучение состояния клеток культуры колоректального рака человека НСТ-8, выращенных на культуральных средах с полиакриламидными гелями разной упругости (0,5-50 кПа) (измерялось на установке атомно-силовой микроскопии *Asylum* в 2010 году в *Университете Иллинойса, США*) показало прямую зависимость между повышением упругости среды для роста клеток и возрастанием количества клеток с метастатическим фенотипом [166]. Тогда как, рост клеток в среде низких значений модуля

упругости выявил повышенную митотическую активность и быстрый рост клеток с образованием монослоя. Можно предположить, что компрессия, оказываемая на опухолевые клетки в среде с повышенными значениями модуля упругости, способствует перепрограммированию фенотипа клеток и изменению тенденций поведения – от локального распространения к метастатической диссеминации [167].

Исследования 2017 года группы *Университета Сунь Ятсена (Китай)*, основанные на детальном иммуногистохимическом анализе и определении упругости межклеточного матрикса (оценка степени ремоделирования – по изучению регуляции экспрессии гена LOX, коррелирующего с увеличением упругости, при иммуногистохимическом исследовании) на микрочипах Alenabio с образцами ткани колоректального рака пациентов, подтвердили гипотезу о том, что высокая упругость и ригидность опухолевой стромы образцов толстой кишки статистически свидетельствует о прогрессировании онкологического заболевания и преобладании случаев его плохого прогноза [168].

По итогам обсуждения различных биомеханических особенностей и характеристик упругости опухолевых тканей человека, можно говорить о том, что современным научным сообществом сформирована концепция канцерогенеза, где злокачественные опухоли человека состоят из двух компонентов: раковых клеток и окружающей их стромы. Биологическое поведение, степень агрессивности опухоли и, как следствие, прогноз течения заболевания у онкологических больных, зависят от особенностей структуры не только опухолевых клеток, но и стромы. Риск развития рака и результаты его лечения также зависят как от свойств опухолевых клеток, так и от характеристик окружающего их межклеточного матрикса. Однако, описанные выше результаты исследований, посвященных влиянию упругости на возникновение и течение онкологических процессов *in vitro* и *in vivo* в различных типах тканей человека, лишь положили начало

изучению новых потенциально применимых в клинике диагностических методов. Только крупномасштабное изучение данной проблемы может сформировать понимание относительно общих механизмов и тенденций изменения упругости тканей в процессе канцерогенеза.

Анализируя данные литературы и клинического опыта, можно с уверенностью сказать лишь о том, что физический параметр «упругость биологической ткани» в большинстве случаев коррелирует с риском возникновения опухоли и плохим прогнозом онкологического заболевания.

1.4 Изучение структуры тканей по анализу модуля упругости методом оптической когерентной эластографии

Высокий потенциал в сфере клинической диагностики механических свойств ткани имеет новый метод компрессионной оптической когерентной эластографии (ОКЭ) [169]. Впервые, ОКЭ визуализация была продемонстрирована в работе *одного из классиков развития оптической когерентной томографии Joseph Schmitt (Гонконгский университет науки и технологии) в 1998 году*, где данные о степени деформации ткани были получены при использовании метода оптической когерентной томографии (ОКТ) и технологии квазистатического шагового сжатия всей поверхности изучаемого образца [170].

Современную компрессионную ОКЭ можно охарактеризовать как высокоразрешающую, неповреждающую технологию получения информации об упругости ткани. Реализация ОКЭ неразрывно связана с технологией ОКТ. Метод ОКТ способен получать объемные изображения микроструктур тканей с высоким разрешением, достигающим 1-10 мкм, благодаря фокусировке в тканях светового пучка ближнего инфракрасного спектра [171]. ОКТ характеризуется неповреждающими свойствами зондирующего инфракрасного излучения, осуществляется в реальном времени и не требует каких-либо контрастирующих агентов. Вследствие характерных градиентов показателя преломления зондирующего пучка в неоднородной биологической ткани, падающий свет проникает на глубину не более 1-2 мм, рассеивается в обратном направлении, что позволяет получать структурную карту изучаемого объекта [172].

Неповреждающие свойства зондирующего инфракрасного излучения, высокое пространственное разрешение и получение изображения в реальном времени обеспечили методу ОКТ высокую актуальность в офтальмологии, где проведение гистологического исследования невозможно [173]. Несмотря на ограниченную глубину визуализации, использование эндоскопических зондов и зондов-катетеров позволило

методу ОКТ стать коммерческим в сферах гастроэнтерологии [174] и кардиологии [175]. Также, ОКТ используется как инструмент изучения поверхностных тканей в дерматологии [176] и мониторинга терапии рака кожи [177].

Суть метода компрессионного варианта ОКЭ заключается в определении градиента межкадровой вариации фаз сигнала в попарно меняющихся ОКТ-изображениях ткани в процессе оказания на неё контролируемого компрессионного воздействия [15, 178]. Для получения абсолютных значений модуля упругости (модуль Юнга, кПа) используется закон Гука [179]. Поверх изучаемого образца ткани располагается эталонный калибровочный слой для калибровки деформации [179-181]. Для равномерной компрессии изучаемый образец должен быть практически плоским, что является ограничением метода [182, 183]. Изображения градиента колебания фаз получают на всём промежутке приложения к ткани компрессионного воздействия от несжатого до сжатого состояния. Сжатие в большинстве случаев осуществляется вдоль оси z (компрессия по вертикали, сверху вниз). Контролируемое компрессионное воздействие осуществляется с помощью пьезоэлектрического привода до достижения уровня деформации изучаемой ткани $<1\%$ [14]. Последующие процессы оценки записанной деформации ткани комбинируются с оценкой смещения фаз через векторную [184] и гибридную [16] формы. Определённые значения деформации отображаются в поперечном или объемном виде на картах эластографической деформации (ОКЭ изображениях). Детальное описание и демонстрация этапов осуществления метода описана в разделе 2.3 главы Материалы и Методы.

Разрешение метода ОКЭ эквивалентно разрешению конкретной ОКТ системы, на базе которой проводится визуализация [17]. Разрешающая способность метода ОКЭ в среднем для различных устройств составляет 40-50 мкм, что всегда несколько ниже, чем разрешающая способность метода ОКТ. Это связано с особенностью обработки сигнала методом ОКЭ,

закрывающейся в определении градиента смещения колебаний фаз сигнала между двумя соседними спеклами (элементами разрешения) [185]. Характеристики метода ОКЭ по сравнению с другими экспериментальными и клиническими методами определения упругости ткани приведены в таблице 3. Это сравнение демонстрирует *высокое разрешение* метода, но *небольшую глубину визуализации* ткани [13].

Таблица 3. Сравнительная характеристика особенностей и ограничений экспериментальных и клинических методов определения упругости биологических тканей

Метод	Разрешение, мкм	Глубина сканирования	Скорость получения изображения	Ширина поперечного поля изображения
ОКЭ	15 – 100	0,5 - 3,0 мм	20 - 100 мкс	5 - 15 мм
УЗИ-эластография	100 – 500	4 - 5 см	4 - 30 мкс	5 - 10 см
МРТ-эластография	1000 – 3000	Всё тело	2 - 20 мин	Всё тело
Атомно-силовая микроскопия	0,001 – 0,1	Только поверхность	10 - 30 мин	0,1 – 0,5 мм

Резюмируя вышеизложенное, можно говорить о том, что онкологические патологии в значительной степени изменяют механические свойства ткани [186]. Учитывая значимость онкологических заболеваний ОКЭ стала объектом изучения возможностей клинической визуализации [92, 187]. Стоит отметить, что в настоящее время ОКЭ и эластография в целом, находятся скорее на стадии демонстрации и экспериментальных исследований, и пока не зарекомендовали себя, как доступный, эффективный и достоверный метод визуализации в клинической практике. Самым серьезным ограничением в применении ОКЭ для визуализации опухоли заключается в непреодолимом пределе проникновения оптического излучения в ткань – 1-2 мм, который затрудняет просмотр всей толщи опухолевого узла [169].

Преодоление этого ограничения стало возможно при исследовании *послеоперационных образцов ткани*. В 2015 году научная группа профессора *B.F. Kennedy* из *Университета западной Австралии (г. Перт)*, впервые продемонстрировала возможность ОКЭ визуализации неоднородности ткани РМЖ на послеоперационных образцах [18]. В работе показана гетерогенность структуры ОКЭ изображений РМЖ (Рис. 8). Важно отметить, что *структурные ОКТ изображения* (Рис. 8ж) не имеют столь различного контраста опухолевых клеток (Рис. 8з) и стромы (Рис. 8и), в то время как ОКЭ изображения (Рис. 8г) демонстрируют высокую гетерогенность опухолевых областей (Рис. 8д). Данный результат стал многообещающим для интраоперационной оценки «чистых» краёв резекции и предотвращения рецидива опухолевого роста.

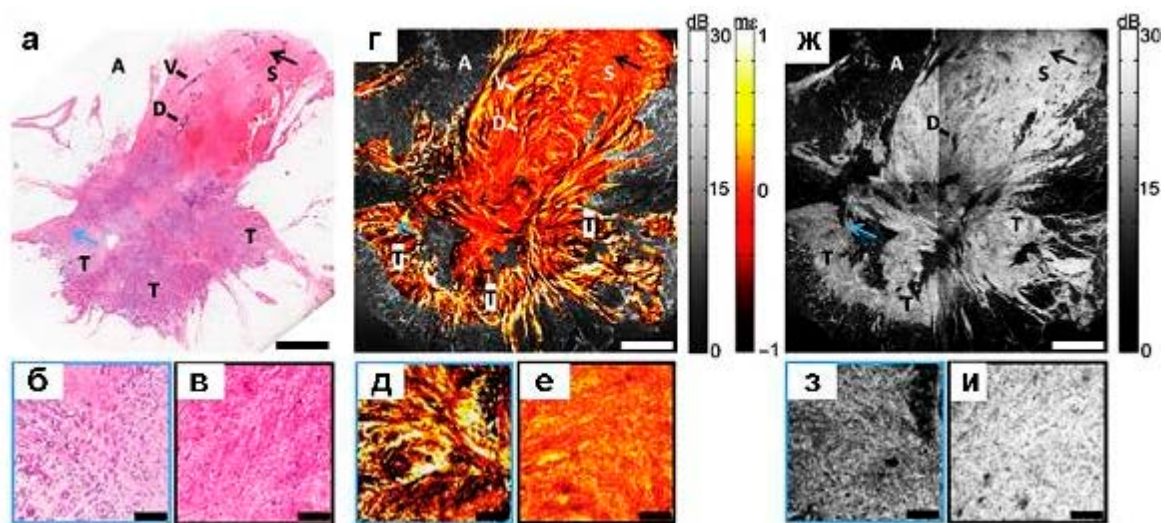


Рисунок 8. Изучение инвазивной протоковой карциномы: **а,б,в** – гистологические изображения; **г,д,е** – эластографические изображения; **ж,з,и** – ОКТ структурные изображения. Увеличенные изображения области опухолевой ткани (**б,д,з**) и стромы (**в,е,и**). Синими и чёрными стрелками показаны, соответственно; **А** – жировая ткань, **Д** – млечный проток, **С** – строма, **Т** – опухоль, **В** – кровеносный сосуд. Размер бара на изображениях **а,г,ж** – 3 мм, **б,в,д,е,з,и** – 0,5 мм [18].

Одновременно, в том же 2015 году исследования группы *G. Nabi* из *Университета Данди, Великобритании* на подобной установке ОКЭ показали возможность изучения структуры образцов *биопсий простаты*

[188], где проиллюстрирована возможность дифференцировать ткань опухоли от неизменённой простаты (Рис. 9). Авторами продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность метода по выявлению рака простаты, которая составила 0,98 и 0,91 с площадью под ROC кривой (*Receiver Operating Characteristic*) $> 0,99$, т.е. возможность экспресс-оценки биопсий методом ОКЭ.

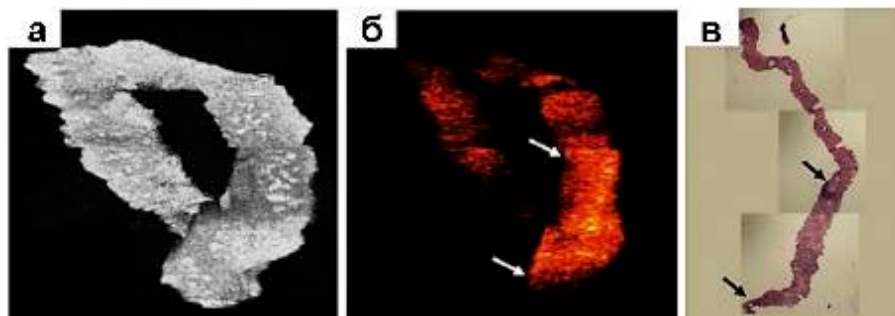


Рисунок 9. Изучение образца биопсии с раком простаты: **а** – ОКТ структурное изображение; **б** – эластографическое изображение с диапазоном модуля упругости 0-1 МПа; **в** – гистологическое изображение; стрелки указывают начало и конец опухолевой ткани; образцы биопсий имеют длину 5-20 мм [188].

Результаты группы *B.F. Kennedy* 2018 года намечают вектор развития ОКЭ в сторону определения абсолютных значений модуля упругости опухолевой и неизменённой тканей [189]. Такие исследования характеризуют упругость участков ткани не только в виде качественных изображений, но и количественно – в виде ОКЭ карт распределения модуля упругости, где каждый элемент разрешения выражен в абсолютном значении модуля упругости в кПа (Рис. 10). Проиллюстрирована возможность на ОКЭ картах упругости различать в одном образце фрагменты протоковой карциномы *in situ* от протоковой карциномы *in situ* с очаговой кальцификацией (Рис. 10 д,з), что недоступно для структурных ОКТ изображений (Рис. 10 в,е) и качественных ОКЭ изображений (Рис. 10 г,ж). Количественные ОКЭ изображения (Рис. 10 д,з) визуализируют области протоковой карциномы *in situ* с очаговой кальцификацией как более упругие в сравнении с участками типичной протоковой карциномы *in situ*.

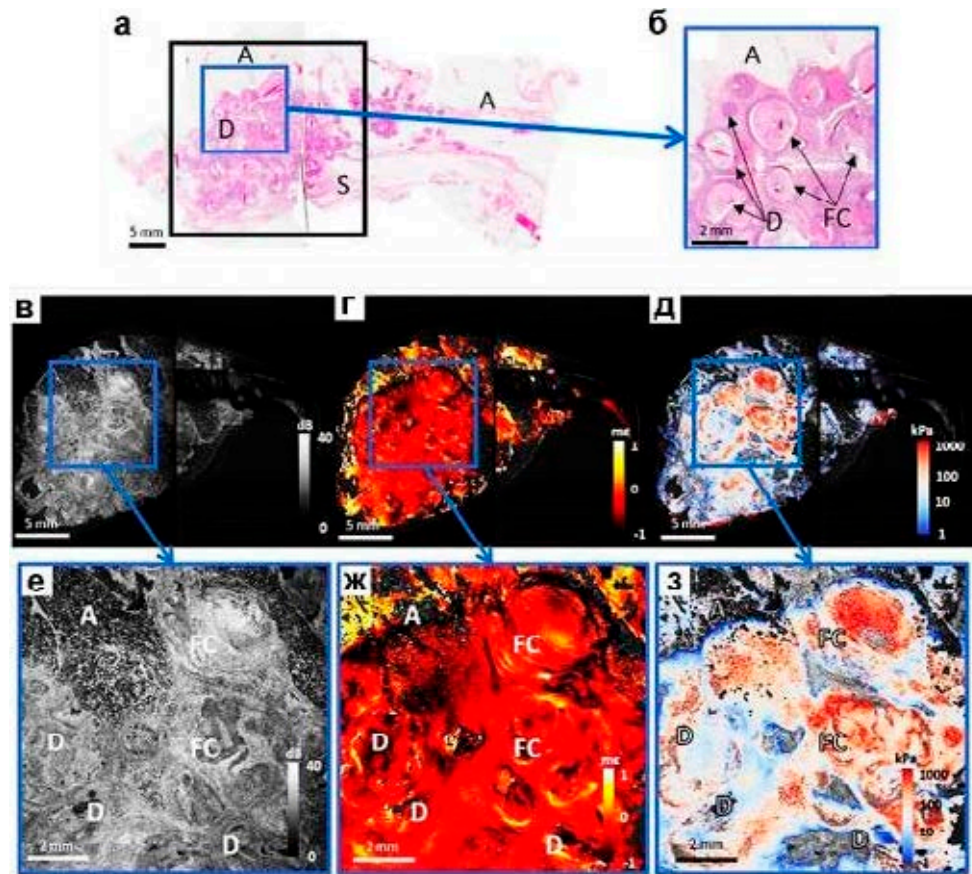


Рисунок 10. Изучение образца протоковой карциномы *in situ*: **а** – гистологическое изображение образца; чёрный квадрат – область сканирования; **б** – увеличенное гистологическое изображение; **в** – масштабное сшитое ОКТ изображение; **г** – масштабное сшитое качественное ОКЭ изображение; **д** – масштабное сшитое количественное ОКЭ изображение; **е, ж, з** – увеличенные ОКТ, качественное и количественное ОКЭ изображения; **А** – жировая ткань, **Д** – протоковая карцинома *in situ*, **FC** – Д с очаговой кальцификацией, **С** – строма; размер бара на изображениях **а, в, г, д** – 5 мм, **б, е, ж, з** – 2 мм [189].

Данное наблюдение позволило сделать предположение, что метод ОКЭ имеет возможность дифференцировать различные микроструктуры тканей, ввиду чего метод может иметь потенциал в диагностике различных морфологических подтипов опухолей. Это было показано исследованиями нашей группой (Приволжский исследовательский медицинский университет; Институт прикладной физики РАН, Россия) опубликованными в *Biomedical Optics Express* в 2019 году [190]. Оставалась актуальная задача определения степени ответа опухолевой ткани на производимую терапию, посредством обнаружения дистрофически

изменённых клеток, очагов некроза и других патоморфологических структур, что и стало целью данной диссертационной работы.

Обнаружение методом ОКЭ скоплений клеток человека стало задачей новейших (2020 год) исследований группы профессора *B.F. Kennedy*. Продемонстрирована возможность метода ОКЭ визуализировать отдельные скопления человеческих стволовых клеток, встроенных в 3D модели желатиновых гидрогелей [101]. Работа показывает высокое разрешение метода ОКЭ (15-30 мкм) и возможность обнаруживать отдельные клеточные скопления, характеризующиеся более высокими значениями модуля упругости по сравнению с окружающим их гидрогелиевым слоем (Рис. 11). Исследование подчёркивает актуальность метода ОКЭ для изучения влияния механических свойств микроокружения на состояние и функции клеток.

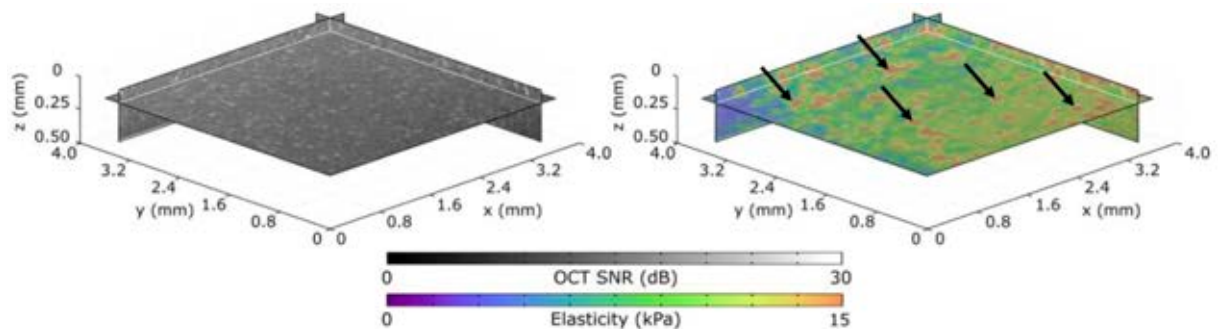


Рисунок 11. ОКТ структурное и ОКЭ изображения 3D модели желатинового гидрогеля, внутри которого распределены в виде отдельных скоплений человеческие стволовые клетки (обозначены стрелками) [101].

Кроме того, компрессионная ОКЭ применялась в других работах для изучения характеристики упругости гидрогелей, используемых для оценки миграции стволовых клеток и механотрансдукции [191], а также для характеристики механических свойств опухолевых сфероидов [192].

Суммируя, можно утверждать, что ОКЭ является перспективным методом визуализации в клинической диагностике, в частности — в

онкологии. Изучение как новых объектов в онкологии (моделей и послеоперационных образцов опухолей), так и влияния на них терапевтических агентов (химио- и лучевой терапии) позволит определить объективность клинического диагностического метода ОКЭ.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

Предметом исследования являлись упругие свойства биотканей, в том числе отдельных гистологических структур опухолевой ткани. Объектами ОКЭ исследований являлись послеоперационные образцы ткани молочной железы и стенки толстой кишки от пациентов с диагнозами умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома. Выбор данных типов рака обусловлен, главным образом, актуальностью и широкой распространённостью в клинической практике. Для определения возможностей ОКЭ визуализировать микроструктуру опухолевой ткани, были проведены исследования на более простых моделях опухолей мышей. Для этих целей подбирались соответствующие по морфологической структуре опухолевые модели мышей: рак молочной железы 4T1 и колоректальный рак СТ-26.

Лабораторные животные

Работа выполнена на 6-8 недельных самках мышей линии Balb/c, весом 18-23 г. Общее количество животных в эксперименте 114.

Для проведения исследования на экспериментальных животных получено разрешение Этического Комитета ПИМУ (Протокол заседания №2 от 29 января 2018 года).

Животных получали из НПП “Питомник лабораторных животных” ФИБХ РАН (г. Пущино). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Исследования выполнялись на базе НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ПИМУ.

При работе с животными руководствовались «Правилами для проведения работ с использованием экспериментальных животных» [193, 194] и «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» [195]. При

планировании экспериментов с животными опирались на «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [196].

Опухолевые модели

Для выполнения экспериментов по изучению возможностей метода ОКЭ в оценке ответа опухоли на терапию использовали экспериментальные опухолевые модели гистиоидного строения, близкие по своей морфологической структуре к умеренно- и низкодифференцированной аденокарциноме молочной железы (Grade II-III) – 4T1 [197, 198], и умеренно- и низкодифференцированной аденокарциноме толстой кишки (Grade II-III) – СТ-26 [199-201], но отличающиеся слабо выраженным стромальным компонентом – практически полным отсутствием пучков коллагеновых волокон.

Основным морфологическим отличием опухоли СТ-26 от опухоли 4T1 является сравнительная выраженность стромального компонента, который занимает около 5% площади. Строма опухоли представлена единичными капиллярами, преимущественно синусоидного типа [200, 202-204]. Более выраженная сосудистая составляющая опухолей СТ-26 в сравнении с опухолями 4T1 позволит определить различия в действии разнонаправленных противоопухолевых препаратов.

Клеточные линии карцином 4T1 и СТ-26 культивировали в RPMI-1640 с 10% FCS, 1% глутамина, 10 единиц/мл пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина; инкубировали при 37 °С и 5% CO₂. Всего производилось 3 субкультивирования культуры при 80% слияния [205]. Перед введением клетки собирали раствором трипсина-ЭДТА, подсчитывали в камере Горяева и ресуспензировали в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) [205].

Опухоль 4T1 моделировалась ортотопически в молочной железе (Рис. 12а) и внутрикожно на поверхности уха (Рис. 12б). Ортотопическая модель создавалась введением тонкой иглой 31G (в концентрации 5×10^5 клеток на

50 мкл PBS) суспензии опухолевых клеток 4T1 в молочную железу, расположенную на брюшке, по стандартной методике [206]. Модель опухоли на ухе создавалась путем введения тонкой иглой 31G внутрь кожи суспензии опухолевых клеток 4T1 (в концентрации 2×10^5 клеток на 20 мкл PBS) по стандартной методике [207].

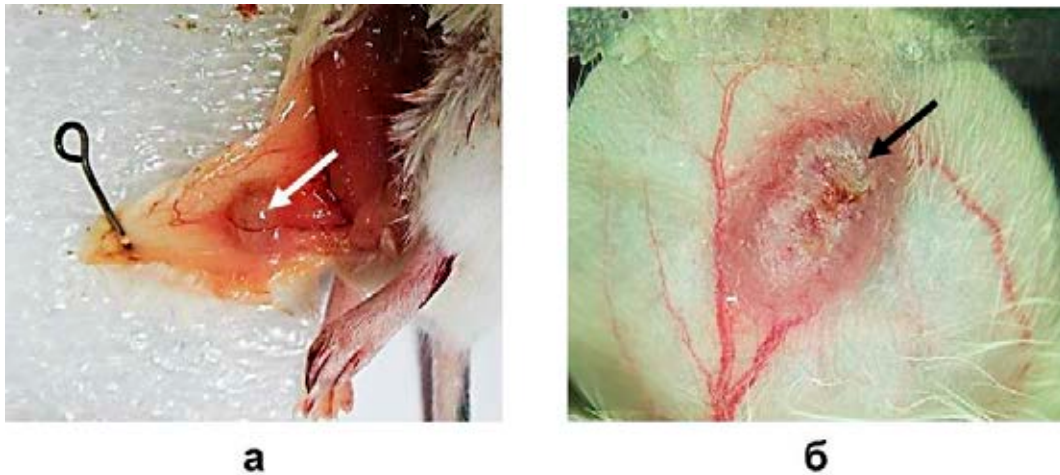


Рисунок 12. Опухолевая модель РМЖ 4T1: **а** – ортотопическая локализация; **б** – внутрикожная локализацией на поверхности уха; опухоли обозначены стрелками.

Модель КР СТ-26 моделировали только внутрикожно на ухе по аналогичной методике, описанной для 4T1. Ортотопическая модель СТ-26 на стенке толстой кишки не создавалась ввиду ее глубокого залегания, создающего препятствие для ОКТ исследования.

Определение оптимальной модели для периодического ОКЭ мониторингирования проводили на 7 день естественного роста опухолей. Исследование заключалось в сравнении оптических и эластических свойств, морфологической картины опухолей с ортотопической локализацией и внутрикожной локализацией на поверхности уха (Таб. 4).

Таблица 4. Сведения об объектах исследования наиболее оптимальной локализации модели 4T1

Локализация опухолевой модели	Количество животных, гол.	Количество ОКТ/ОКЭ изображений, шт.	Количество микроскопических препаратов, шт.
Ортотопическая	5	10/10	5
На поверхности уха	5	10/10	5
Всего	10	20/20	10

Послеоперационные образцы

Послеоперационный материал РМЖ получен в ГБУЗ НО Нижегородском областном клиническом онкологическом диспансере («НОКОД»); материал КР – в первой клинике Приволжского окружного медицинского центра («ПОМЦ №1»).

Исследование разрешено Этическим Комитетом ПИМУ по проведению научных исследований с участием человека в качестве объекта исследований (Протоколы заседания №1 от 28 сентября 2018 года и №3 от 21.02.2020 года).

Исследование соответствует международным и этическим нормам, изложенным в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» [208].

Послеоперационные образцы умеренно- и низкодифференцированной аденокарциномы молочной железы (*Grade II-III*) получены от 20 пациентов, возрастом от 39 до 72 года. Клиническим патоморфологом НОКОД на послеоперационном этапе были вынесены следующие заключения (по Ноттингемской градирующей системе SBR (*Scarff–Bloom–Richardson*) в зависимости от трёх факторов: степени дифференцировки ткани по направлению к нормальным протокам и долькам, степени ядерного полиморфизма и количества митотических фигур): для 16 образцов – аденокарцинома *Grade II-III* (от 6 до 9 баллов по шкале SBR), для 3 образцов – аденокарцинома *Grade III* (от 8 до 9 баллов по шкале SBR) и для

одного – аденокарцинома Grade II (от 6 до 7 баллов по шкале SBR); исходя из целей исследования упругих свойств отдельных микроструктур ткани (а не упругости резецируемого опухолевого узла в целом) было решено не разделять образцы и исследовать общую группу «умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома Grade II-III молочной железы». По морфологической структуре этот тип рака наиболее приближен к структуре модельной опухоли 4T1 ввиду гистиоидного строения с отсутствием/низким количеством железистоподобных структур [209]. 10 из 20 образцов получены от пациентов, перенесших курсы неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) согласно клиническим рекомендациям – антрациклин- (АС) и таксан- (Р) содержащие режимы: АС (доксорубицин 60 мг/м² в/в в 1-й день + циклофосфамид 600 мг/м² в/в в 1-й день) 1 раз в 3 недели, 4 цикла → Р (паклитаксел 80 мг/м² в/в еженедельно) 12 введений [210]. 4 пациента, опухоли которых характеризовались HER2-положительным статусом, получали параллельно с таксан-содержащим режимом трастузумаб 2-6 мг/кг в/в еженедельно 12 введений. Тотальная мастэктомия проводилась через 3-6 недель после окончания лечения. Общая характеристика пациентов представлена в таблице 5.

Таблица 5. Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Сравниваемые параметры	Значения
Рак молочной железы	
Возраст, среднее значение лет	55 ± 10
Место получения послеоперационного материала	НОКОД
Проводившееся до операции лечение: нет/химиотерапия	10/10
Колоректальный рак	
Возраст, среднее значение лет	53 ± 12
Пол, мужской/женский	6/11
Место получения послеоперационного материала	ПОМЦ №1
Проводившееся до операции лечение: нет/да	17/0

Послеоперационные образцы умеренно- и низкодифференцированной аденокарциномы без дополнительного уточнения (БДУ) толстой кишки (*Grade II-III*) получены от 17 пациентов (Таб. 6), возрастом от 37 до 82 лет. Клиническим патоморфологом ПОМЦ на послеоперационном этапе были вынесены следующие заключения (по международной классификации ВОЗ последнего пересмотра): для 12 образцов – аденокарцинома БДУ *Grade II-III* (от 0 до 95 эпителиальных элементов инвазивной опухоли представлены железистыми структурами), для 3 образцов – аденокарцинома *Grade II* (от 50 до 95 эпителиальных элементов инвазивной опухоли представлены железистыми структурами) и для одного – аденокарцинома *Grade III* (от 0 до 49 эпителиальных элементов инвазивной опухоли представлены железистыми структурами); исходя из целей исследования упругих свойств отдельных микроструктур ткани (а не упругости резецируемого опухолевого узла в целом) было решено не разделять образцы и исследовать общую группу «умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома БДУ *Grade II-III* толстой кишки». Гистиоидное строение и практическое отсутствие железистоподобных структур обеспечивает сходство с моделью опухоли КР СТ-26 [211].

Таблица 6. Общая характеристика послеоперационного материала

Диагноз	НАХТ	Количество образцов, шт.	Количество ОКТ/ОКЭ изображений, шт.	Количество микроскопических препаратов, шт.
Аденокарцинома молочной железы (<i>Grade II-III</i>)	-	10	50/50	10
	+	10	50/50	10
Аденокарцинома толстой кишки (<i>Grade II-III</i>)	-	17	85/85	17
Всего		37	185/185	37

Послеоперационный материал был получен сразу после завершения оперативного вмешательства, нарезался фрагментами длиной около 2 см (Рис. 13) и доставлялся к месту исследования в марле, смоченной 0,9% раствором NaCl, при 7°C. Исследования проводили в течение 1-2 часов после изъятия материала.

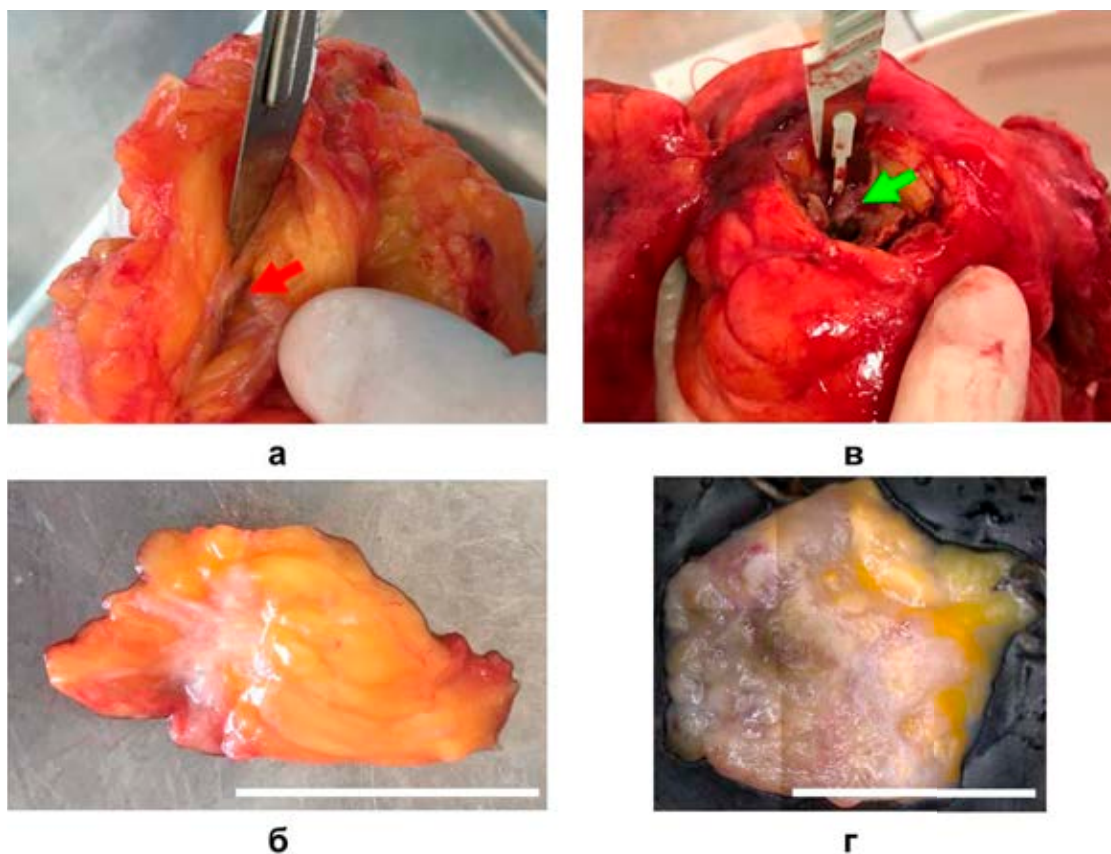


Рисунок 13. Получение послеоперационных образцов: **а** – выделение исследуемого образца РМЖ из общей резецируемой массы железы после радикальной мастэктомии; красная стрелка указывает на опухоль; **б** – исследуемый на ОКТ образец ткани молочной железы; **в** – выделение из аденокарциномы толстой кишки исследуемого участка ткани; зеленая стрелка указывает на локализацию опухоли; **г** – исследуемый на ОКТ образец ткани толстой кишки; размер бара на изображениях **б** и **г** – 1 см.

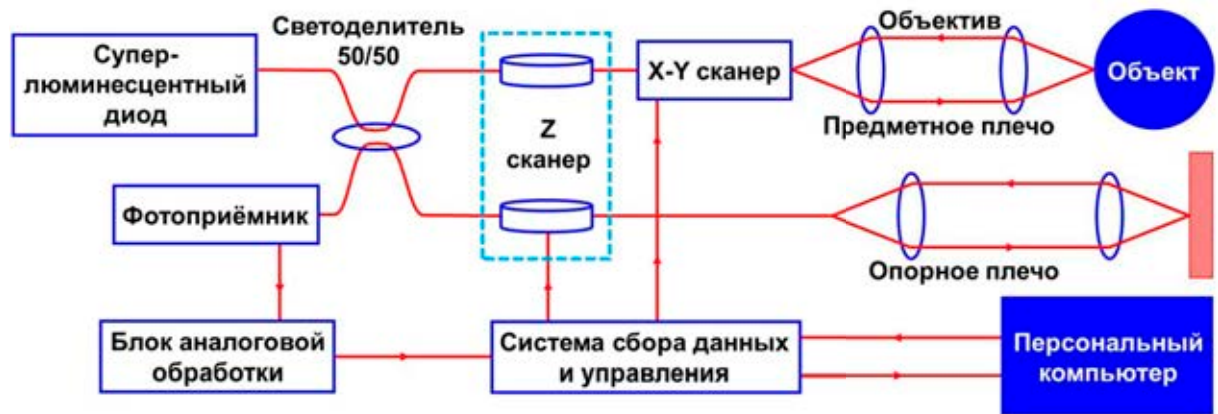
На послеоперационных образцах изучали возможность метода ОКЭ визуализировать типичные микроструктуры ткани. Для РМЖ – это опухолевые клетки, соединительная и жировая ткань, участки некроза (как результата НАХТ) [212]. Для КР – это опухолевые клетки, соединительная ткань и слизистая оболочка толстой кишки [213].

2.2. Оборудование

Оптический когерентный томограф

Исследования выполнены на скоростном спектральном мультимодальном оптическом когерентном томографе (ММ ОКТ), разработанном в Институте прикладной физики РАН (г. Нижний Новгород) на базе одномодовой изотропной волоконной оптики (Рис. 14), работа которого характеризуется спектральным принципом приёма сигнала [214]. Принцип работы заключается в спектральном анализе интерференционного сигнала при помощи спектрометра, обеспечивающего эквидистантную по оптической частоте последовательность спектральных отсчетов [215]. Основные технические характеристики ММ ОКТ представлены в таблице 7. В данном устройстве построение изображений осуществляется в режиме реального времени [216]; синтез комплексного ОКТ-сигнала производится за счёт применения модуляции длины пробега опорной волны [217]. Синтез непрерывного потока ОКТ-изображений в реальном времени и их интерактивная визуализация производится за счёт применения асинхронного метода сбора данных и организации параллельных вычислений [218]. Оптическая функциональная схема (построена по тандемному принципу – common path) [219] и внешний вид томографа представлены на рисунке 14а,б.

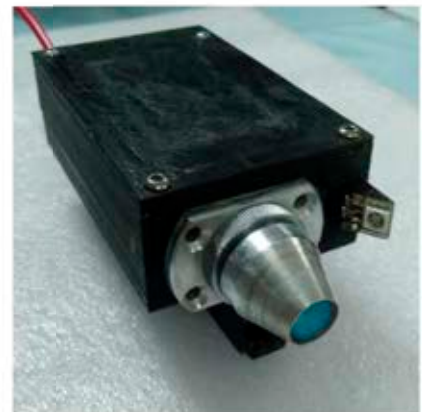
Совокупность последовательно идущих 256 В-сканов, сформированных из 512 А-сканов, обеспечивает построение 3D массива данных и позволяет воссоздать оптическую 3D картину участка ткани (Рис. 14г). Из данного участка в нашем исследовании анализу подвергался только центральный В-скан (Рис. 14д). Такие изображения были представлены в псевдоцветной желто-коричневой палитре, в которой оттенки желтого соответствуют большей интенсивности, а оттенки коричневого – меньшей интенсивности оптического сигнала.



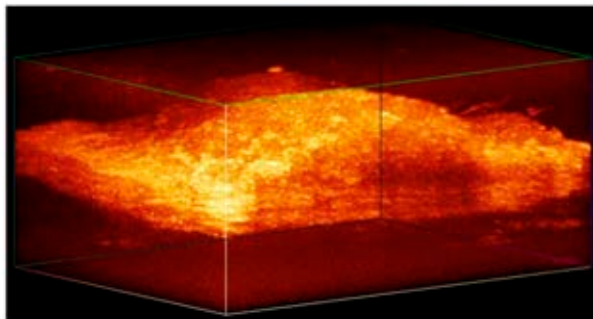
а



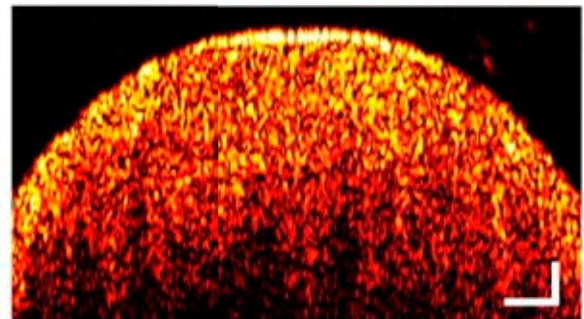
б



в



г



д

Рисунок 14. Мультиmodalный оптический когерентный томограф: **а** – функциональная схема; **б** – рабочее место для проведения ОКТ-исследования; **в** – ОКТ-зонд; **г** – получаемый 3D массив ОКТ данных; **д** – центральный В-скан; размер бара по вертикали и горизонтали – 100 мкм.

Для точного позиционирования ОКТ зонда на поверхности ткани было использовано устройство (Purelogic R&D PLRA4, г. Воронеж) (Рис. 146), позволяющее позиционировать ОКТ-зонд с минимальным шагом перемещения по осям x-y 10 мкм. Использование данной установки

обеспечило высокоточное позиционирование и перемещение зонда по поверхности изучаемых образцов.

Таблица 7. Технические характеристики оптического когерентного томографа

Технические параметры системного блока	
Тип устройства	Спектральный мультимодальный оптический когерентный томограф
Размер	45 см (ширина) × 40 см (глубина) × 25 см (высота)
Вес	~10 кг
Требования по мощности	220В±22В/50 Гц; максимальное потребление мощности — 50 ВА
Скорость получения изображений	20 000 А-сканов в секунду
Оптический источник	Низкокогерентное широкополосное излучение ближнего инфракрасного диапазона длин волн, излучаемое суперлюминесцентным диодом Рабочая длина волны — $1,3\pm 0,13$ мкм
Оптическая мощность	В оптическом разъеме или дистальном разделе зонда не превышает 9 мВт, но не менее 0,5 мВт
Технические параметры сканирующего зонда	
Тип	Торцевой волоконно-оптический зонд многоразового использования с внутренним электромеханическим сканированием
Диапазон сканирования по глубине	$\leq 2,0$ мм в воздухе
Диапазон сканирования поперек	4 мм (512 пикселей)
Поперечное пространственное разрешение	25 мкм
Пространственное разрешение по глубине	15 мкм

2.3. Методы и методики исследования

Метод компрессионной оптической когерентной эластографии

Компрессионный вариант оптической когерентной эластографии был реализован на базе спектрального мультимодального оптического когерентного томографа в виде специализированного программного обеспечения OSTRPolForm v.1.0.1; оригинальных методик проведения исследования и оригинальных алгоритмов обработки данных в ареале программы MatLab 2015b.

Получение абсолютных значений модуля упругости (модуля Юнга), выражаемых в кПа, стало возможным при размещении на поверхности биоткани калибровочного силиконового слоя [15, 16, 220]. Калибровочный слой должен соответствовать следующим механическим и оптическим свойствам: быть упругим (способным сопротивляться изменению своего объёма и формы под действием приложенных к нему внешних механических сил), эластичным (способным восстанавливать исходный размер и форму после воздействия приложенных к нему внешних механических сил), иметь собственную жёсткость (меру устойчивости к деформации, возникающую при действии приложенных к нему внешних механических сил), иметь высокую степень оптической прозрачности и положительный полезный сигнал в ко-канале ОКТ поляризации [221, 222].

На калибровочный слой и исследуемую биологическую ткань оказывается контролируемое однонаправленное механическое компрессионное воздействие торцевой (оптической) поверхностью ОКТ-зонда [183, 184]. Одновременно с этим производится запись ОКЭ-сигнала. В итоге, деформация в ткани определяется как градиент межкадровой вариации фазы ОКТ-сигнала по глубине среди попарно-меняющихся ОКТ-структурных изображений ткани в процессе компрессионного воздействия [223, 224].

Записанные ОКЭ файлы подвергают первичной обработке с получением видеофайла, представленного 4 окнами (Рис. 12). 1е окно

характеризует одномоментное состояние структуры калибровочного слоя и изучаемой биоткани, а также изменение положения рассеивателей (пикселей) в процессе компрессионного воздействия в виде последовательно меняющейся дорожки из 512 ОКТ изображений (Рис. 15а). 2е окно отображает одномоментное изменение состояния градиента вариации фазы каждого рассеивателя в процессе компрессионного воздействия (Рис. 15б). 3е окно, отображает состояние межкадровой деформации (Рис. 15в). 4е окно, отображает накопление смещения фазы градиента деформации пикселя в ту или иную сторону относительно соседних пикселей и их начального положения (Рис. 15г).

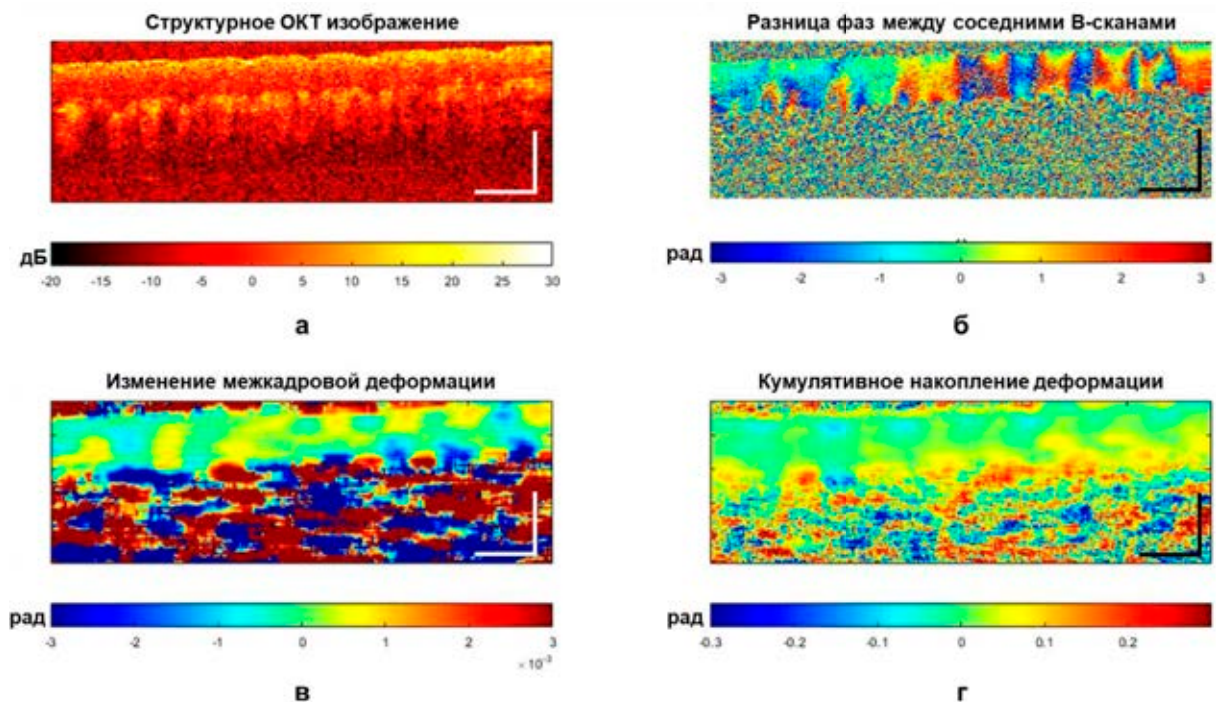


Рисунок 15. Первичная обработка ОКЭ записи. **а** – 1е окно изменения структуры ткани в процессе компрессии (стандартный ОКТ сигнал); **б** – 2е окно изменения разности фаз между соседними В-сканами, **в** – 3е окно изменения межкадровой деформации, **г** – 4е окно накопленной деформации; размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 0,5 мм.

Анализ видеофайлов позволяет выявить дефекты (артефакты) произведенной ОКЭ-записи, влияющие, в конечном итоге, на качество и адекватность получаемых ОКЭ изображений:

1. *неоднородность* в калибровочном силиконовом слое (Рисунок 16а: чёрная стрелка), характеризующаяся высоким обратным рассеянием, приводит к отсутствию колебаний градиента межкадровой деформации в нижележащих областях (Рисунок 16а: красная стрелка) и влияет на значения накопленной деформации в области изучаемой ткани, расположенной непосредственно под неоднородной областью (Рисунок 16а: синяя стрелка).

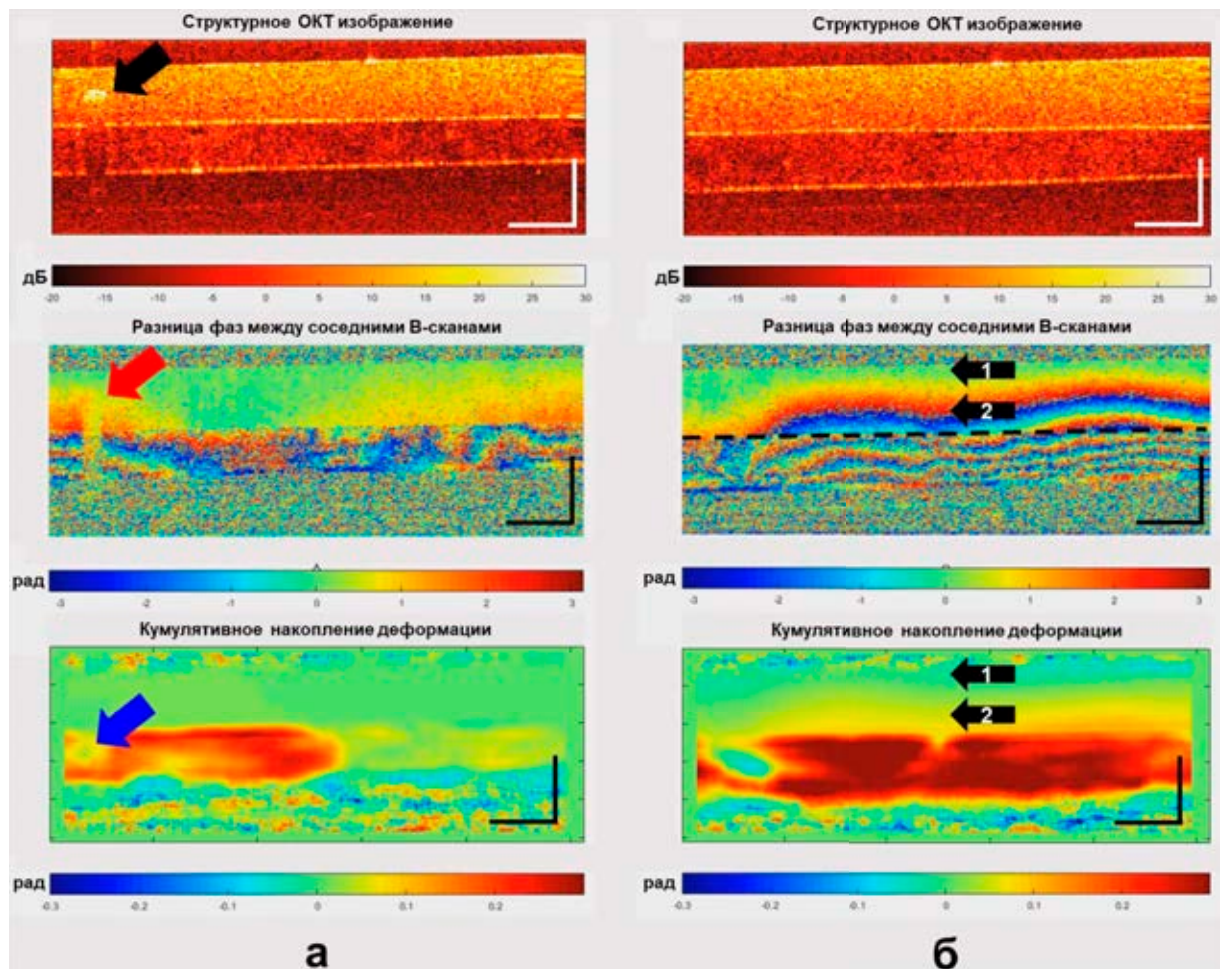


Рисунок 16. Репрезентативные иллюстрации определения артефактов при получении ОКЭ изображений: **а** – артефакт, связанный с неоднородностью силиконового слоя; **б** – артефакт, связанный со «слипанием» поверхности зонда и силиконового слоя; размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 0,5 мм.

2. *отсутствие колебаний градиента межкадровой деформации* в верхней части силиконового слоя (Рисунок 16б: стрелка 1 на средней панели

изображения) при наличии колебаний градиента межкадровой деформации в нижней части силиконового слоя и изучаемом образце (Рисунок 166: стрелка 2 на средней панели изображения), свидетельствуют о необходимости корректировки выбора правильной зоны калибровки, а именно, необходимо выбрать ту зону, в которой есть колебания градиента межкадровой деформации (Рисунок 166: стрелка 2 на нижней панели изображения). Данный артефакт обусловлен «слипанием» поверхности зонда и силиконового слоя.

Методика проведения in vivo ОКЭ исследования экспериментальных опухолевых моделей

1. Животное после наркотизации (в/м введение 100 мкл смеси, содержащей 50 мкл Золетила-100 (20 мкг/мл) и 0,50 мкл Рометара) размещалось на специальной платформе, опухоль фиксировалась [207]. ОКТ зонд устанавливался на центре опухоли.
2. До проведения ОКЭ исследования получали макрофотографии опухоли.
3. Калибровочный силиконовый слой помещали на поверхность опухоли в области интереса; на калибровочный слой и между калибровочным слоем и опухолевой тканью наносился 0,9% р-р NaCl во избежание слипания поверхностей.
4. Одновременно с монотонным поджатием калибровочного слоя и опухолевой ткани в течении 25 секунд торцевой частью ОКТ-зонда, производилась запись ОКЭ сигнала в память компьютера.
5. После завершения записи, давление ОКТ-зондом прекращалось.
6. Каждая запись ОКЭ сигнала сохранялась под кодированным именем, при необходимости записывался комментарий.
7. Опухолевая ткань после ОКЭ исследования резецировалась и отправлялась на гистологическое исследование.

Методика проведения ex vivo ОКЭ исследования послеоперационного материала аналогична *in vivo* исследованию, однако имела следующие особенности:

1. Послеоперационные образцы, размещённые и правильно ориентированные на плоской платформе, фиксировали иглами для предотвращения скольжения исследуемого образца в процессе поджатия.
2. После записи сигнала и прекращения давления производилось перемещение зонда с помощью устройства для пространственного позиционирования на заданное расстояние с целью получения последовательных изображений со всей площади образца ткани.

Построение ОКЭ изображений

С целью получения конечного ОКЭ изображения, которое будет в дальнейшем анализироваться, после первичной обработки записанных файлов требуется дополнительная обработка данных. Для этого, в специально написанной программе для среды MatLab на основе структурного ОКТ изображения (Рис. 17а) задаются параметры, такие как (1) директория расположения и название файла первично обработанной ОКЭ-записи, (2) границы изучаемой области ткани и калибровочного слоя, (3) границы калибровочного слоя – это максимально возможные границы калибровочного слоя, определяемые на финальном 512 ОКТ-структурном изображении, (4) значение пиковой величины компрессионного давления - в данной работе, это 4 ± 1 кПа, (5) значение модуля упругости калибровочного слоя - в данной работе, это 100 кПа, (6) границы изучаемого участка ткани.

Для формирования окончательного ОКЭ изображения в программе удаляют калибровочный слой путём определения крайне левого и крайне правого пикселя границы калибровочного слоя согласно ОКТ-структурным изображениям. Для имеющих неровную поверхность экспериментальных

опухолей производится дополнительная корректировка линии границы согласно границе на ОКТ-структурных изображениях.

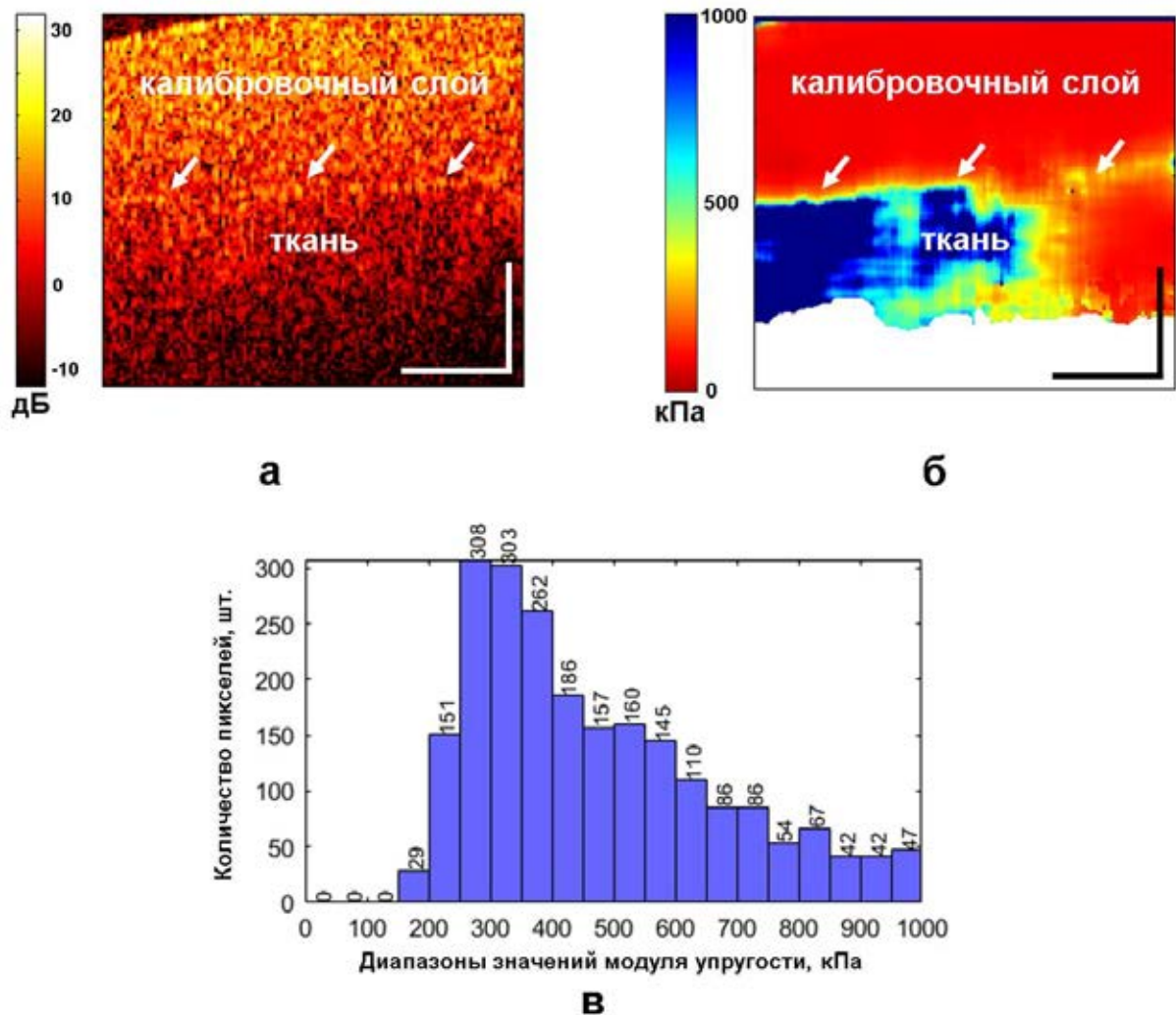


Рисунок 17. Построение ОКЭ изображения с помощью оригинального алгоритма в среде MatLab R2015b: **а** – ОКТ-структурное изображение калибровочного слоя и изучаемой ткани – белые стрелки указывают на границу между калибровочным слоем и тканью; **б** – получаемое ОКЭ-изображение, где толщина калибровочного слоя – 0,8~0,9 мм, + глубина визуализации ткани – 0,6~0,8 мм; размер бара по вертикали и горизонтали на изображениях **а** и **б** – 0,5 мм; **в** – получаемая гистограмма распределения количества пикселей с задаваемыми диапазонам значений модуля упругости (на примере – шаг равен 50 кПа), характеризующая преобладание определённых диапазонов значений модуля упругости внутри опухолевой ткани.

В конечном итоге, формируется ОКЭ изображение в псевдо-цветной палитре, где синим цветом обозначены области ткани с высокими

значениями модуля упругости, а красным цветом обозначены области ткани с низкими значениями модуля упругости (Рис. 176). Кроме того, рядом приведена цветовая шкала значений модуля упругости в кПа, позволяющая не только качественно, но и количественно охарактеризовать упругость каждого пикселя изучаемой ткани. Количественная информация получаемого ОКЭ изображения представлена в виде диаграммы зависимости количества пикселей от спектра значений их модуля упругости (Рис. 17в). Данная диаграмма отображает как преобладание пикселей с одними значениями модуля упругости над пикселями с другими значениями модуля упругости, так и среднее значение модуля упругости по данному участку опухоли [16, 184].

Противоопухолевая терапия

Для моделирования различных патоморфологических изменений, на экспериментальные опухолевые модели РМЖ и КР воздействовали противоопухолевыми препаратами с разными механизмами действия, широко используемыми в клинической практике в качестве препаратов для неoadъювантной и адъювантной терапии таких онкологических процессов [32]:

- Цисплатин (Цисплатин-ЛЕНС, ООО Ленс-Фарм, Россия) – алкилирующий цитотоксический противоопухолевый препарат, неорганическое вещество, комплексный хлорид-аммиакат двухвалентной платины (цис-диамминдихлороплатина II); бифункционально алкилирует нити ДНК, подавляет биосинтез нуклеиновых кислот, вызывает гибель клеток [225];
- Бевацизумаб (Авастин, Roche, Швейцария) – таргетный антиангиогенный противоопухолевый препарат, рекомбинантные гиперхимерные (гуманизированные, приближенные к человеческим) моноклональные IgG1 антитела, которые селективно связываются и ингибируют биологическую активность фактора роста эндотелия

сосудов (VEGF); препарат ингибирует связывание VEGF с рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, что приводит к снижению васкуляризации опухоли и угнетению её роста [226].

Препараты вводили инсулиновым шприцом внутривенно (в/в) в следующих дозировках: Цисплатин – 6 мг/кг, Бевацизумаб – 15 мг/кг. Схема введения препаратов была выбрана согласно работе [227], и скорректирована нами в ходе предварительного исследования [228, 229]. Таким образом, противоопухолевые препараты вводили на 2-ой день после инокуляции опухолевых клеток. Этот день принят за 0 день эксперимента. Повторные инъекции делали на 2, 5 и 7 дни эксперимента.

Определение оптимальных доз и режимов введения препаратов

Выбор терапевтически эффективных доз и режимов введения препаратов осуществлялся согласно анализу коэффициента торможения роста опухоли (ТРО, %). Доза препарата Цисплатин 6 мг/кг была выбрана согласно большому количеству литературных данных [227, 230, 231]. Для выбора наиболее терапевтически эффективного режима провели сравнительный анализ коэффициентов ТРО, полученных при однократном и многократном введении препарата Цисплатин в дозе 6 мг/кг [231-234].

В случае препарата Бевацизумаб, проводили сравнительный анализ коэффициентов ТРО, полученных при разных дозах 10 мг/кг и 15 мг/кг [235-238]. Кратность введения Бевацизумаб была выбрана такой же как для препарата Цисплатин, т.е. многократно, что согласовывалось с литературными данными [227, 239].

Исследования выполняли на моделях 4Т1 и СТ-26 с локализацией на поверхности уха мыши, ввиду выбора такой модели как наиболее оптимальной на этапах предварительных экспериментов. Для предварительных исследований по определению оптимальных доз и режимов введения препаратов животных разделили на 10 групп:

■ мыши с опухолями 4Т1:

1. с в/б введением физиологического раствора (n= 5);
2. которым проводили терапию препаратом Цисплатин однократно в дозе 6 мг/кг (n= 5);
3. которым проводили терапию препаратом Цисплатин многократно в дозе 6 мг/кг (n= 5);
4. которым проводили терапию препаратом Бевацизумаб многократно в дозе 10 мг/кг (n= 5);
5. которым проводили терапию препаратом Бевацизумаб многократно в дозе 15 мг/кг (n= 5);

■ мыши с опухолями СТ-26:

6. с в/б введением физиологического раствора (n= 5);
7. которым проводили терапию препаратом Цисплатин однократно в дозе 6 мг/кг (n= 5);
8. которым проводили терапию препаратом Цисплатин многократно в дозе 6 мг/кг (n= 5);
9. которым проводили терапию препаратом Бевацизумаб многократно в дозе 10 мг/кг (n= 5);
10. которым проводили терапию препаратом Бевацизумаб многократно в дозе 15 мг/кг (n= 5).

Классические методики оценки эффективности проводимой терапии

На всём протяжении экспериментов на моделях 4Т1 и СТ-26 (0, 2, 5, 7, 9 дни) проводилась макроскопическая оценка опухоли, заключающаяся в измерении объёма опухоли и вычислении коэффициента торможения роста опухоли (ТРО) на дистанции эксперимента. Объём опухоли определяли по формуле [240]:

$$V=\pi/6\times a\times b\times c,$$

где а, b, с — длина, ширина и глубина опухоли, измеренные штангенциркулем. Коэффициент ТРО вычислялся по формуле [241]:

$$\%TPO = \left(1 - \frac{(V_T - V_{T0})/V}{(V_C - V_{C0})/V}\right) \times 100\%,$$

где V_T – средний объем опухоли на день 12 после первого сеанса лекарственной терапии; V_{T0} – средний объем опухоли в день начала лекарственной терапии; V_C и V_{C0} – средние объёмы опухолей контрольной группы на аналогичных временных точках.

Метод светопольной микроскопии

Сразу после проведения ОКЭ исследования мышинные опухоли и послеоперационные образцы подвергали гистологическому исследованию. Резецируемые мышинные опухоли и послеоперационные образцы фиксировали в 10% формалине в течение 48 ч. Затем выполняли несколько (3-6) серийных срезов толщиной 7 мкм. Для мышинных опухолей срезы выполнялись из центральной области (Рис. 18а, б); для послеоперационных образцов – в плоскости гистологических меток (Рис. 18в), нанесённых гистологической краской (Histo-Line, red) для обозначения начальной и конечной границы исследования (Рис. 18г). Плоскости получения гистологических срезов совпадали с плоскостями получения ОКЭ изображений. Все гистологические препараты окрашивались по стандартной методике гематоксилином и эозином, что позволяло оценить общую структуру ткани и происходящие в ней под действием противоопухолевой терапии патоморфологические изменения (Рис. 18б, г).

Гистологические препараты были оценены на микроскопе Leica DM2500 DFC (Leica Microsystems, Германия), оснащённом цифровой камерой Leica DFC290 (Leica Microsystems, Германия). С помощью цифровой видеокамеры получены гистологические изображения зоны интереса, точно совпадающие с соответствующими ОКЭ изображениями, при увеличении объектива $\times 10$ (размер изображений составил 1305×979 мкм). Гистологические изображения для демонстрации состояния и изменений опухолевых клеток получены при увеличении объектива $\times 20$

(размер изображений составил 653×490 мкм) и $\times 40$ (размер изображений составил 245×245 мкм).

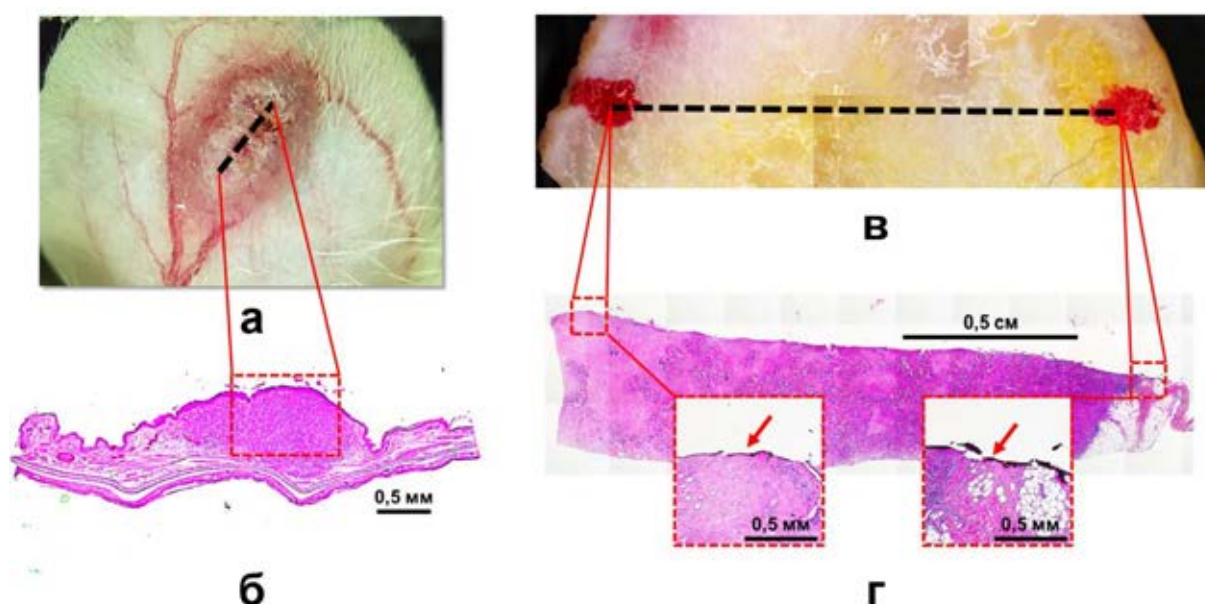
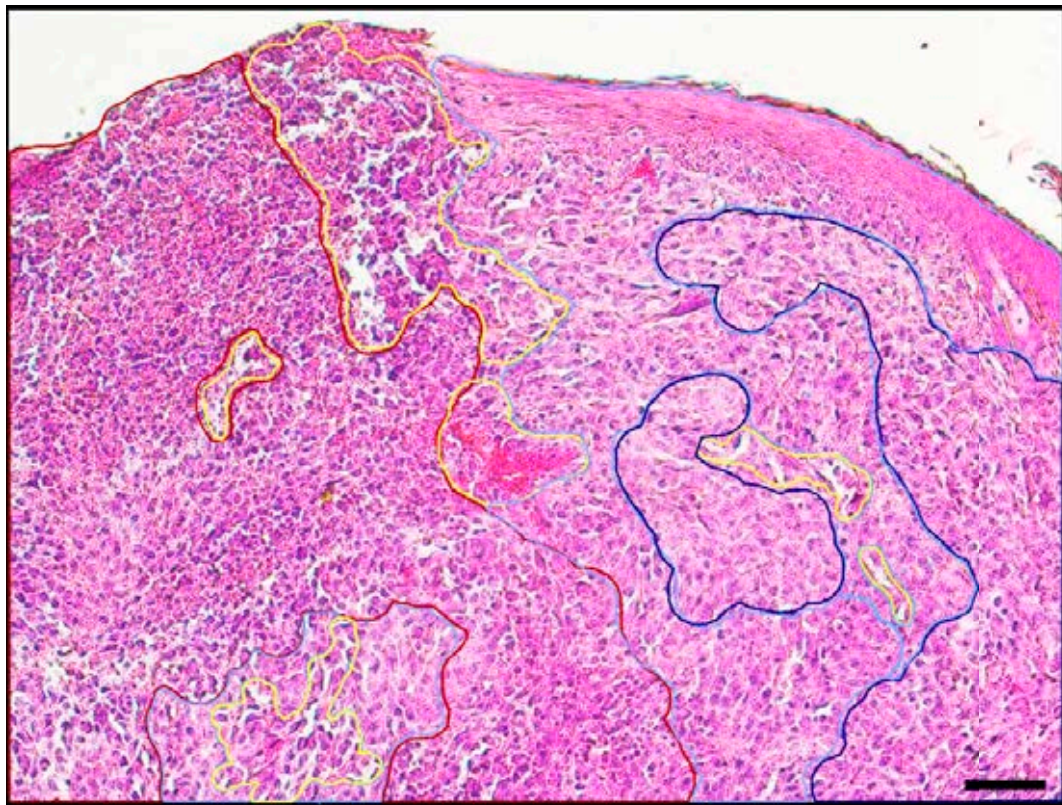


Рисунок 18. Демонстрация областей проведения исследований; плоскости исследования обозначены чёрными пунктирными линиями; **а** – фотография опухолевой модели; **б** – гистологическое изображение мышинной опухолевой модели; **в** – фотография послеоперационного образца; **г** – гистологическое изображение послеоперационного образца; увеличенные области демонстрируют нанесенные красителем метки на границах областей исследования. Размеры баров обозначены на изображениях.

Количественный анализ гистологических препаратов

Гистологические изображения, соответствующие ОКЭ изображениям, были сегментированы в программе QuPath software (v0.1.2) [242]. Данная программа позволила полуавтоматически выделить точные границы и определить площади, занимаемые теми или иными микроструктурами на гистологическом изображении (Рис. 19а). С помощью программы были выделены 4 гистологические структуры: скопление жизнеспособных опухолевых клеток (клетки без видимых повреждений ядра и цитоплазмы), дистрофически изменённые опухолевые клетки (клетки с необратимыми изменениями ядра и цитоплазмы), некротические опухолевые клетки и отек (Рис. 19б). Определение границ и топографии гистологических структур

позволило установить диапазоны значений модуля упругости этих структур на ОКЭ изображениях и, как следствие, получать сегментированные ОКЭ изображения.



а

Key	Value
■ Necrosis – некроз	39%
■ Edema – отёк	12%
■ Dystrophy – дистрофичные клетки	31%
■ Viable – жизнеспособные клетки	18%

б

Рисунок 19. Пример количественного анализа гистологических изображений в программе QuPath: **а** – гистологическое изображение с очерченными границами областей гистологических структур **б** – окно программы, отображающее данные о топографии и площади областей гистологических структур опухолевой ткани. Размер бара – 100 мкм.

Схема проведения основного этапа экспериментальных исследований

Основной этап экспериментальных исследований схематично представлен на рисунке **20** и включает в себя следующие пункты:

1. Подкожная инокуляция суспензии опухолевых клеток в концентрации 2×10^5 клеток, разведенных 20 мкл среды PBS, в ткань ушной раковины мышей.
2. На 2-ой день после инокуляции, что считалось 0-м днём эксперимента (по отношению к введению лекарств), проводили терапию препаратами Цисплатин или Бевацизумаб (внутрибрюшинное введение).
3. Дальнейшую терапию проводили на 2, 5 и 7 дни эксперимента: в общей сложности 4 сеанса противоопухолевой терапии.
4. На всём протяжении эксперимента проводили макроскопическую оценку опухоли.
5. На 5, 7 и 9 дни проводилось *in vivo* исследования тканей с получением структурных ОКТ и ОКЭ изображений (карт упругости).
6. Животных выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков, и опухоли направлялась на гистологическое исследование.

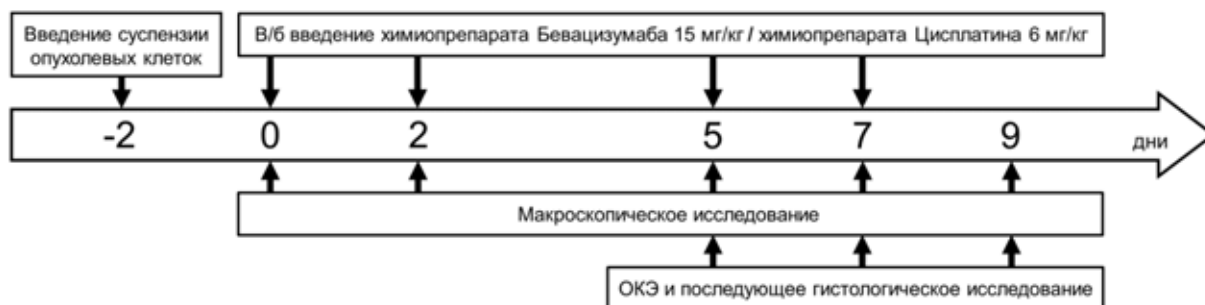


Рисунок 20. Схема проведения основного этапа экспериментальных исследований. За 0 день эксперимента принимался 2-ой день после инокуляции суспензии опухолевых клеток; он являлся днем начала терапии.

Для основного этапа экспериментальных исследований 54 мыши разделили на группы (Таб. 8):

- Контрольная группа I – мыши с опухолями 4T1 с в/б введением физиологического раствора ($n = 9$);
- Опытная группа I – мыши с опухолями 4T1, которым проводили терапию препаратом Цисплатин многократно в дозе 6 мг/кг ($n = 9$);

- Опытная группа II – мыши с опухолями 4T1, которым проводили терапию препаратом Бевацизумаб многократно в дозе 15 мг/кг (n = 9);
- Контрольная группа Ia – мыши с опухолями СТ-26 с в/б введением физиологического раствора (n = 9);
- Опытная группа Ia – мыши с опухолями СТ-26, которым проводили терапию препаратом Цисплатин многократно в дозе 6 мг/кг (n = 9);
- Опытная группа IIa – мыши с опухолями СТ-26, которым проводили терапию препаратом Бевацизумаб многократно в дозе 15 мг/кг (n = 9).

Таблица 8. Сведения об объектах основного этапа экспериментальных исследований

Объект	Количество животных, гол.	Количество ОКЭ/ОКЭ изображений, шт.	Количество микроскопических препаратов, шт.
Опухолевая модель 4T1	27	54/54	27
Опухолевая модель СТ-26	27	54/54	27
Всего	54	108/108	54

Методика определения диапазонов значений модуля упругости гистологических структур

Установление точных диапазонов значений модуля упругости разных гистологических структур стало возможным только при тщательном сопоставлении ОКЭ изображений и соответствующих им сегментированных гистологических изображений.

На гистологических изображениях, полуавтоматически сегментированных в программе QuPath, были выбраны репрезентативные квадратные области размером 110x110 мкм, находящиеся внутри очерченной области той или иной гистологической структуры, но не вблизи границы (Рис. 21а). Выделение этих областей на ОКЭ изображении (Рис. 21б) осуществляли наложением ОКЭ изображения на гистологическое

изображение (Рис. 21в). Размер одной квадратной области на ОКЭ изображении составлял 7х7 пикселей, согласно разрешению метода ОКЭ; размер является оптимальным, т.к. области бóльшего размера не представлялось возможным разместить вдали от границ гистологических структур.

Таким образом, для каждой квадратной области был получен набор из 49 пикселей, каждый из которых характеризуется абсолютным значением модуля упругости. Так, для всех гистологических структур было проанализировано по 50 квадратных областей (в общей сложности 2450 пикселей) – достаточное количество для определения суммарного спектра значений модуля упругости; в результате – получены диапазоны значений модуля упругости для каждой гистологической структуры (Рис. 21в).

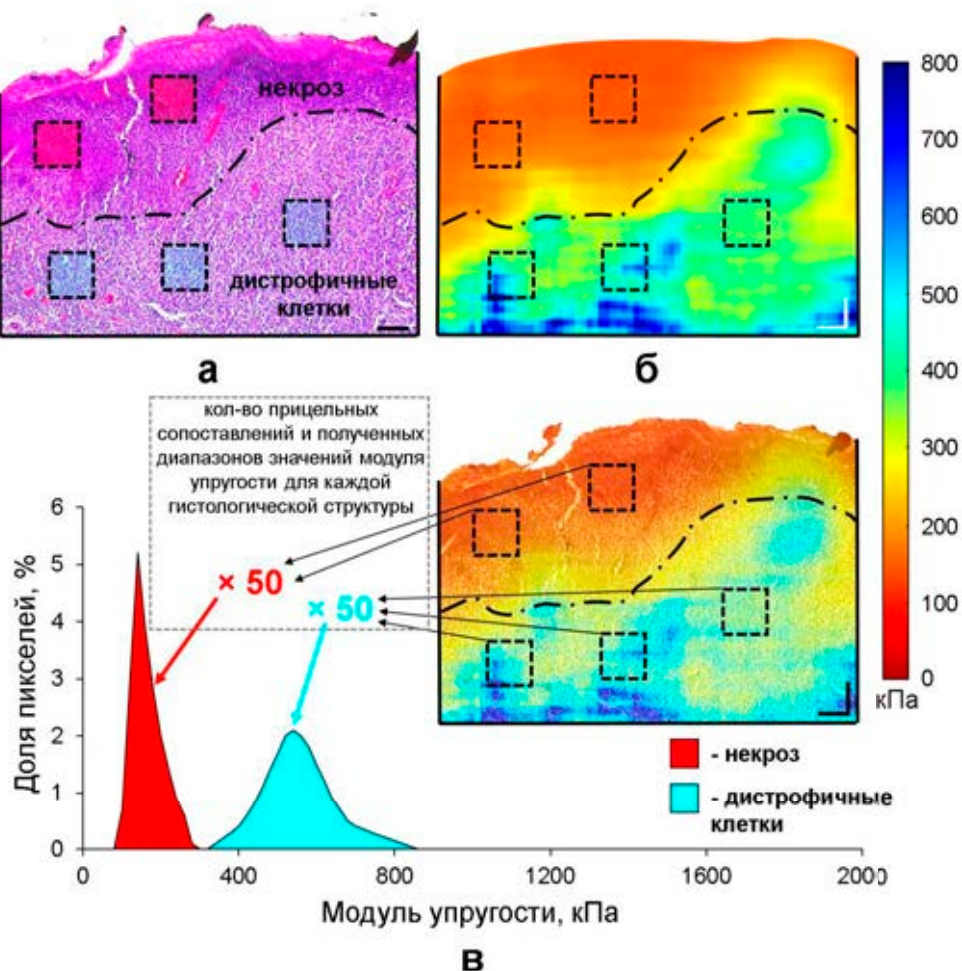


Рисунок 21. Схема алгоритма определения диапазонов значений модуля упругости гистологических структур: **а** – определение

микроструктур на гистологических изображениях; **б** – проецирование областей микроструктур на гистологические изображения; размер бара на изображениях – 100 мкм; **в** – картина наложения ОКЭ изображения на гистологическое изображение, суммирование 50 получаемых диапазонов значений для каждой морфологической микроструктуры и получение суммарного спектра значений модуля упругости для выделенных морфологических структур; размер бара по вертикали и горизонтали для всех изображений – 100 мкм.

Методика сегментации ОКЭ изображений

Определив диапазоны значений модуля упругости 4х гистологических структур (жизнеспособные опухолевые клетки, дистрофически изменённые опухолевые клетки, некротические опухолевые клетки и отек), стало возможным провести сегментирование ОКЭ изображений, где каждая из 4х гистологических структур окрашена своим цветом. Сегментированное ОКЭ изображение представляет собой некое подобие гистологического изображения, однако построенного на различии в упругости разных гистологических структур.

Сегментированное ОКЭ-изображение получали в результате программного автоматического окрашивания каждого пикселя на эластографическом изображении в тот цвет, который задан для того или иного диапазона значений модуля упругости, соответствующего определённой гистологической структуре.

В случае перекрывания диапазонов значений модуля упругости двух гистологических структур точное положение границы устанавливалось сдвигом границы диапазона на 10 кПа (минимальное значение для качественного и количественного изменения сегментированных ОКЭ-изображений) в ту или другую сторону до появления максимального совпадения гистологических структур на ОКЭ и гистологическом изображении. В итоге была получена шкала диапазонов значений модуля упругости для корректной сегментации ОКЭ изображений, т.е. сильно коррелирующих с гистологическими изображениями.

Диапазоны значений модуля упругости для жизнеспособных, некротизированных и дистрофически изменённых опухолевых клеток, а также отека, первоначально установленные для опухолевой модели 4T1, были в дальнейшем применены для опухолевой модели СТ-26 с целью доказательства универсальности метода ОКЭ. Для послеоперационных образцов тканей получали свою шкалу для сегментирования ОКЭ изображений, поскольку они характеризовались другими гистологическими структурами и отличались от экспериментальных моделей более сложным гистологическим строением.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистического анализа Statistica 7.0, MS Excel 2010 и GraphPad Prism 8.0. В работе проводилось определение средних значений (M) измеряемых величин и стандартных отклонений среднего ($\pm SD$). Нормальность распределения получаемых данных площадей гистологических структур, установленных посредством гистологического и ОКЭ исследований, определяли при использовании критерия Шапиро–Уилка (является надёжным при $8 < n < 50$). Статистическую значимость между группами рассчитывалась с использованием поправки Бонферрони для множественного сравнения данных и параметрического критерия Стьюдента. Для выявления корреляции (r) использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Во всех случаях статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Для определения возможности метода ОКЭ дифференцировать различные степени лечебного патоморфоза согласно Кельнской системе классификации регрессии по количеству наблюдаемых областей жизнеспособных опухолевых клеток были рассчитаны стандартные диагностические параметры: чувствительность, специфичность и диагностическая точность.

Чувствительность — доля истинно положительных результатов среди всех исследуемых опухолей, рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{Чувствительность (Se)} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) \cdot 100\%,$$

где TP — истинно положительный результат; FN — ложноотрицательный результат.

Специфичность — доля истинно отрицательных результатов среди всех исследуемых опухолей, рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{Специфичность (Sp)} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP}) \cdot 100\%,$$

где TN — истинно отрицательный результат; FP — ложноположительный результат.

Диагностическая точность рассчитывается как пропорция правильных результатов среди всех исследуемых опухолей — по следующей формуле:

$$\text{Диагностическая точность} = (\text{TP} + \text{TN}) / (\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN}) \cdot 100\%,$$

где TP — количество истинно положительных результатов; TN — количество истинно отрицательных результатов; FP — количество ложноположительных результатов; FN — количество ложноотрицательных результатов.

Исходя из значений чувствительности и специфичности строились характеристические кривые, ROC-кривые (*receiver operating characteristic curve*), которые показывают зависимость количества верно определённых положительных случаев (TP) от количества неверно определённых отрицательных случаев (FN). Идеальный диагностический тест должен иметь Г-образную форму характеристической кривой, проходящей через верхний левый угол, в котором доля истинно положительных случаев — 100% (или 1), а доля ложноположительных случаев равна 0. Чем ближе характеристическая кривая проходит к значению (0; 1) (идеальная чувствительность), тем выше эффективность теста. Количественная оценка характеристической кривой проводилась путем расчета площади под ней — AUC (*area under curve*), где наибольшее значение отражало высокое качество диагностического теста.

Глава 3. Результаты

Работа по изучению возможностей оптической когерентной эластографии в оценке ответа опухоли на терапию согласно изменению упругих свойств компонентов ткани включала в себя 2 основных этапа исследования. Первый этап был направлен на изучение возможностей метода ОКЭ для визуализации гистологической структуры биотканей на примере просто устроенных экспериментальных опухолей, а также для прижизненной оценки степени лечебного патоморфоза. Второй этап был направлен на определение возможности метода ОКЭ для выявления гистологической структуры более сложно организованной опухолевой ткани пациента.

3.1 *In vivo* исследование упругости микроструктур экспериментальных опухолей методом оптической когерентной эластографии

3.1.1 Выбор оптимальной модели и терапевтических доз химиопрепаратов

Определение наиболее оптимальной для периодического ОКЭ мониторингования модели опухоли

По результатам гистологического исследования экспериментальной опухолевой модели 4T1 с ортотопической локализацией на 7 день естественного роста определена опухолевая ткань гистиоидного строения с характерным преобладанием паренхиматозного компонента (97-99% площади опухолевой ткани) над стромальным (1-3% площади опухолевой ткани) (Рис. 22а). Строма представлена мелкими диффузными пучками коллагеновых волокон, занимающих 1-2% ткани новообразования, и единичными мелкими капиллярами преимущественно синусоидного типа. Менее 10 % опухолевых клеток находились в состоянии дистрофических изменений ядра (кариорексис, кариопикноз, кариолизис, вакуолизация ядра) и цитоплазмы (вакуолизация цитоплазмы). При увеличении микроскопа x20 в поле зрения 490×490 мкм детектируется в среднем 3-6 фигур митоза (60-

70% митозов характеризуется как паталогические/необратимые). Областей некроза и отёка опухолевой ткани не обнаружено.

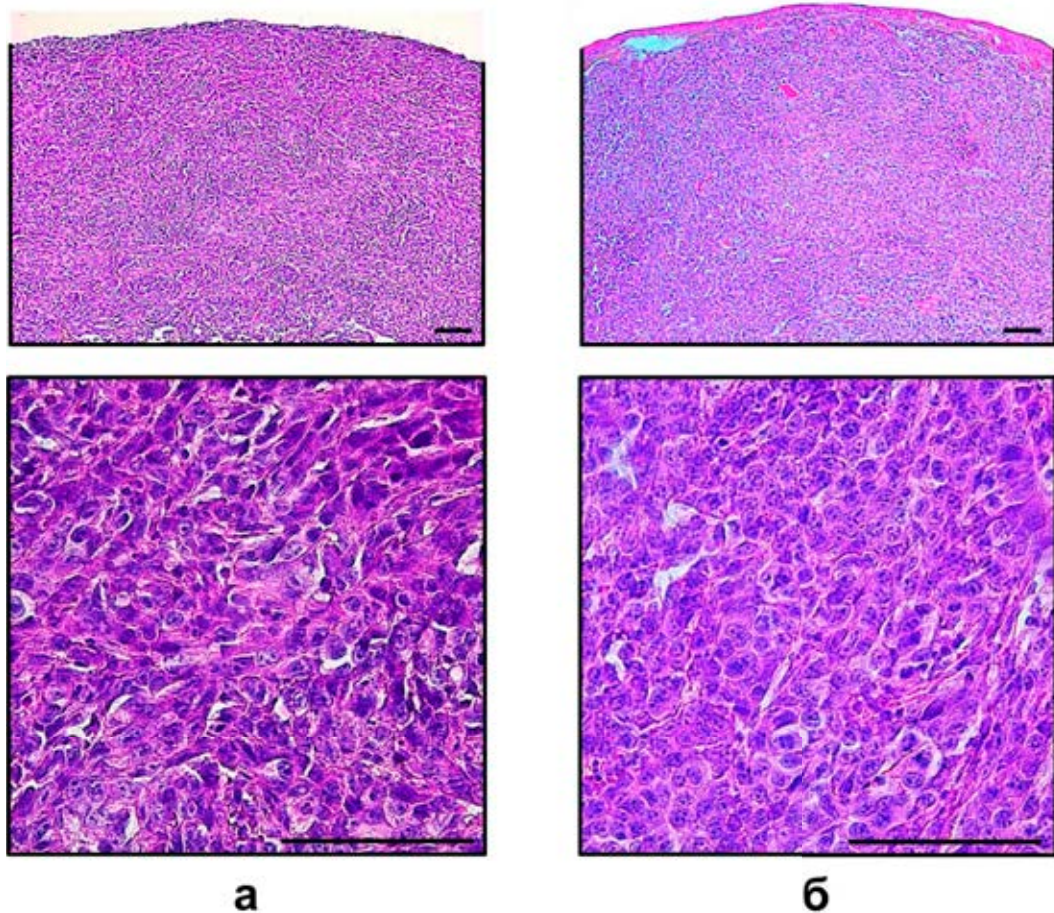


Рисунок 22. Гистологические изображения участков опухолевых тканей, представленные при увеличении микроскопа $\times 10$ (1305×979 мкм) (верхний ряд) и $\times 40$ (245×245 мкм) (нижний ряд), полученные на 7 день естественного роста для экспериментальной опухолевой модели 4T1: **а** – с ортотопической локализацией; **б** – с внутрикожной локализацией на поверхности уха. Размер бара на всех изображениях – 100 мкм.

В результате гистологического исследования экспериментальной опухолевой модели 4T1 с внутрикожной локализацией на поверхности уха на 7 день естественного роста обнаружена опухолевая ткань гистиоидного строения с преобладанием паренхимы (98-99% площади опухолевой ткани) – полиморфные клетки расположены плотно друг к другу (Рис. 22б). Стромальный компонент представлен мелкими диффузными пучками коллагеновых волокон и единичными мелкими капиллярами синусоидного

типа строения, занимающими 1-2% площади новообразования. 7-10% опухолевых клеток характеризуются различными дистрофическими формами: изменение ядра (явления кариопикноза, кариорексиса, кариолизиса) и вакуолизация цитоплазмы. При увеличении микроскопа $\times 20$ в поле зрения 490×490 мкм детектируется в среднем 4-7 фигур митоза (50-70% митозов характеризуется как паталогические/необратимые). Областей некроза и отёка опухолевой ткани не обнаружено.

Таким образом, по результатам морфологической оценки опухолевой модели РМЖ 4Т1, локализованной ортотопически и на поверхности уха, определена схожая гистологическая картина. Это позволяет сделать вывод, что локализация модели 4Т1 не оказывает влияние на гистологическую структуру опухоли.

При изучении ОКЭ изображений экспериментальной опухолевой модели 4Т1 с ортотопической локализацией на 7 день естественного роста определено среднее значение модуля упругости опухолевой ткани 703 ± 37 кПа. ОКЭ изображениях таких опухолей характеризуются преобладанием областей высоких значений модуля упругости (>600 кПа) и единичными небольшими областями сниженной упругости (400-600 кПа) (Рис. 23а).

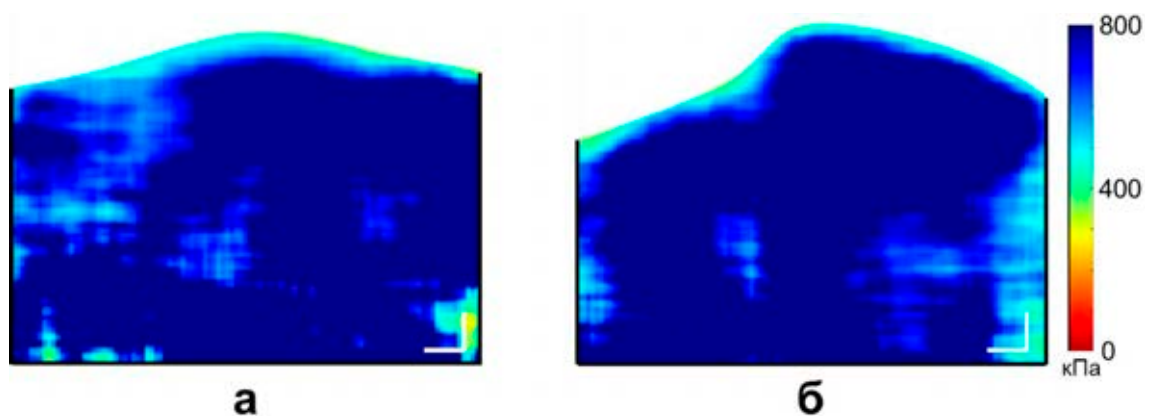


Рисунок 23. ОКЭ изображения экспериментальной опухолевой модели 4Т1, полученные на 7 день естественного роста: **а** – ортотопическая локализация; **б** – внутрикожная локализация на поверхности уха. Размер бара по вертикали и горизонтали для всех изображений – 100 мкм.

При изучении ОКЭ изображений экспериментальной опухолевой модели 4T1 с внутрикожной локализацией на поверхности уха на 7 день естественного роста определено среднее значение модуля упругости опухолевой ткани 708 ± 42 кПа. На ОКЭ изображениях этих опухолей также преобладают области высоких значений модуля упругости; кроме того, также наблюдаются и единичные небольшие области сниженной упругости (Рис. 236).

По результатам параллельно-проведённых гистологических и ОКЭ исследований ортотопической опухолевой модели 4T1 и опухоли 4T1 расположенной на поверхности уха мыши было показано, что локализация опухоли не оказывает влияние на гистологическую структуру и на упругие свойства опухоли, следовательно, модель опухоли 4T1 на ухе является адекватным аналогом ортотопической. Однако, учитывая ее преимущества для удобства исследования – поверхностное расположение и доступность для мониторингового макроскопического и ОКТ исследований, эта локализация выбрана для дальнейших экспериментов [229].

Подбор оптимальных доз и режимов терапии

В таблице 9 представлены значения коэффициентов торможения роста опухоли (ТРО), полученные на опухолевых моделях СТ-26 и 4T1 на 12 день после воздействия разных доз и разной кратности введения препаратов Цисплатин и Бевацизумаб. Статистически значимые различия обнаружены при многократном введении препарата Цисплатин по сравнению с однократным на обеих опухолевых моделях ($p < 0,05$). Статистически значимые отличия в значениях коэффициента ТРО получены при воздействии на экспериментальные опухоли 4T1 и СТ-26 препаратом Бевацизумаб в дозе 15 мг/кг по сравнению с дозой 10 мг/кг ($p < 0,05$) (Таб. 9).

При исследовании динамики роста экспериментальных опухолевых моделей 4T1 и СТ-26 после лекарственной терапии препаратами Бевацизумаб и Цисплатин в выбранных оптимальных дозах и режимах было

показано, что скорость роста опухолей в контрольных группах статистически значимо превышала таковую в опытных группах на протяжении всего исследования ($p < 0,05$) (Рис. 24а, б). Так, на 12 день после начала многократной терапии экспериментальной опухолевой модели 4Т1 препаратом Цисплатин в дозе 6 мг/кг среднее значение объёма опухолей в опытной группе увеличилось в $6,8 \pm 2$ раза по отношению к исходному значению (Рис. 24а); среднее значение объёма опухолей после многократной терапии препаратом Бевацизумаб в дозе 15 мг/кг увеличилось в $8,3 \pm 3$ раза; тогда как среднее значение объёма опухоли контрольной группы увеличилось в $25,3 \pm 6,7$ раза.

Таблица 9. Результаты предварительного этапа экспериментов по подбору оптимальных доз и режимов терапии

Препарат	Доза / Режим дозирования	ТРО, %	
		4Т1	СТ-26
Цисплатин	6 мг/кг/ однократно	$47,2 \pm 3,8$	$40 \pm 2,1$
	6 мг/кг/многократно	$72 \pm 8,4^*$	$79,5 \pm 9^*$
Бевацизумаб	10 мг/кг/многократно	$48,6 \pm 2,0$	$47,1 \pm 2,4$
	15 мг/кг/многократно	$60,1 \pm 4,4^\#$	$65,6 \pm 7^\#$

* – статистически значимые отличия коэффициентов ТРО опухолей группы многократной терапии препаратом Цисплатин от опухолей группы однократной терапии ($p < 0,05$); # – статистически значимые отличия коэффициентов ТРО опухолей групп терапии препаратом Бевацизумаб в дозе 15 мг/кг от опухолей групп терапии в дозе 10 мг/кг ($p < 0,05$).

Также, среднее значение объёма опухолей СТ-26 при многократной терапии препаратом Цисплатин в дозе 6 мг/кг на 12 день после терапии увеличилось в $6,1 \pm 2,1$ раза по отношению к исходному значению (Рис. 24б); среднее значение объёма опухолей для многократной терапии препаратом Бевацизумаб в дозе 15 мг/кг увеличилось в $9,2 \pm 3,4$ раза; тогда как среднее значение объёма опухоли контрольной группы увеличилось в $29,9 \pm 8,1$ раза.

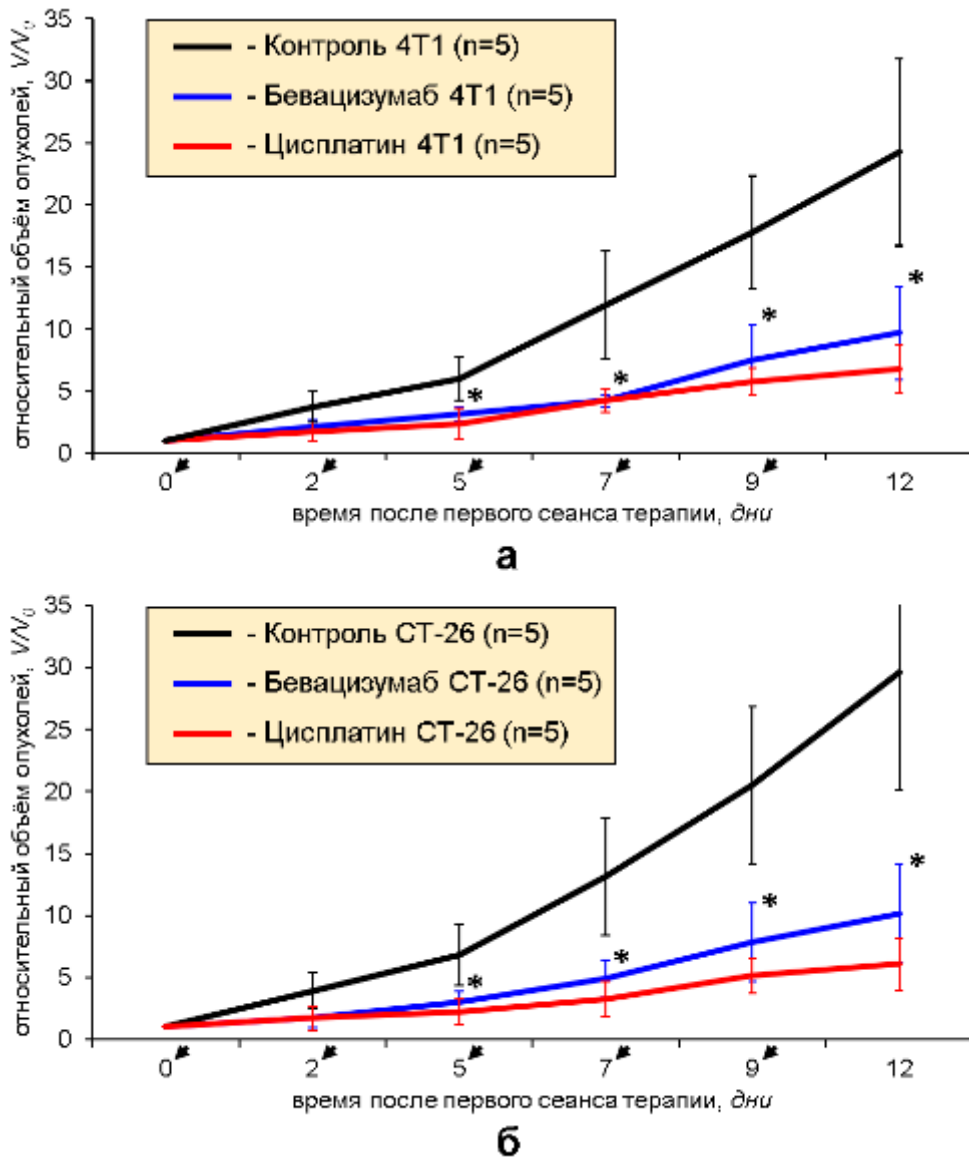


Рисунок 24. Кинетика роста экспериментальных опухолей на фоне многократной терапии препаратом Бевацизумаб (разовая доза 15 мг/кг) и препаратом Цисплатин (разовая доза 6 мг/кг): **а** – 4Т1; **б** – СТ-26. Объем опухоли (V) в каждой временной точке нормировали на исходное значение (V_0) в 0-ой день (значения объема опухолей в 0-ой день принято за единицу); чёрными стрелками показаны временные точки введения препарата Цисплатин; * – статистически значимые отличия объема опухолей групп терапии от контроля ($p < 0,05$).

В результате проведённых предварительных экспериментов статистически значимых отличий в эффективности антиангиогенной терапии препаратом Бевацизумаб и алкилирующей терапии препаратом Цисплатин ни у одной опухолевой модели не обнаружено, что

подтверждают графики роста опухолей моделей 4T1 (Рис. 24а) и СТ-26 (Рис. 24б).

В ходе проведения предварительных экспериментов было обнаружено два ограничения метода ОКЭ. Во-первых, сложность позиционирования ОКТ-зонда на опухолевом узле размером менее 2 мм^2 не позволяет получать информативные ОКЭ изображения на 0 и 2 дни эксперимента (Рис. 25).

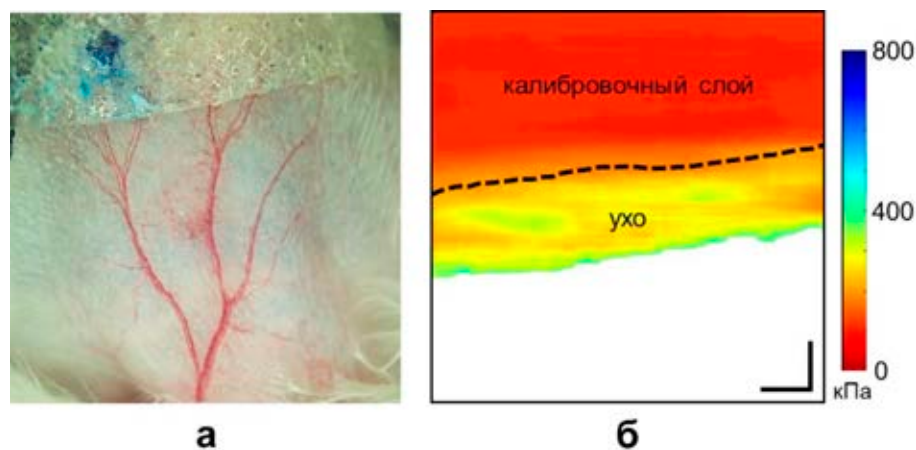


Рисунок 25. Демонстрация обнаруженных ограничений метода ОКЭ: **а** – фотография уха мыши, на которой не визуализируется опухолевый узел, размером $<2 \text{ мм}^3$; **б** – ОКЭ изображение, где опухолевая ткань не детектировалась, вследствие сложности правильного позиционирования ОКТ зонда; значения модуля упругости ткани 250-350 кПа; размер бара по вертикали и горизонтали – 100 мкм.

Во-вторых, формирование плотного струпа на поверхности опухоли на 12 день эксперимента (Рис. 26а) искажает получаемые ОКЭ данные. Формирование струпа является результатом инфильтративного прорастания опухолевой ткани в эпидермальные слои кожи с последующим изъязвлением ткани. На ОКЭ изображениях таких опухолей отмечено очень быстрое затухание полезного сигнала глубже 200 мкм, что говорит о невозможности получения корректной информации методом ОКЭ на этом сроке исследования (Рис. 26б). Ввиду обнаруженного отсутствия целесообразности ОКЭ исследования опухолевых моделей на 0, 2 и 12 дни эксперимента, определены оптимальные дни для ОКЭ исследований – 5, 7 и 9 дни.

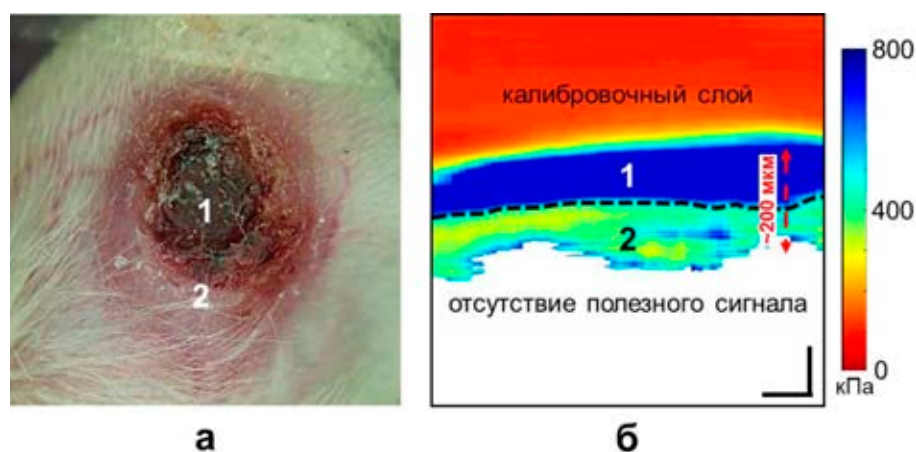


Рисунок 26. Демонстрация обнаруженных ограничений проведения ОКЭ исследования опухолевых моделей на 12 день эксперимента: **а** – фотография опухолевой модели, где наблюдалось образование струпа (1) на поверхности опухолевой ткани (2); **б** – ОКЭ изображение, где наблюдалось очень быстрое затухание полезного сигнала от опухолевой ткани под струпом; размер бара по вертикали и горизонтали – 100 мкм.

Полученные на предварительном этапе исследования результаты позволили:

1. определить наиболее эффективные дозы и режимы дозирования противоопухолевых препаратов: для Цисплатина это 4х кратное введение препарата в разовой дозе 6 мг/кг, для Бевацизумаба также 4х кратное введение в разовой дозе 15 мг/кг;
2. выявить ограничения метода ОКЭ: неинформативность метода при размере опухоли до 2 мм³ и после формирования струпа;
3. определить целесообразность проведения ОКЭ исследования на 5, 7 и 9 дни от начала терапии [228].

3.1.2 Исследование эффективности противоопухолевой терапии на модели рака молочной железы 4T1

Исследование гистологической структуры опухолей контрольной группы I

На гистологических препаратах опухоли 4T1 выявлены области жизнеспособных опухолевых клеток, площадь которых составила $89,7 \pm 4,5\%$, $83,3 \pm 2,9\%$ и $80,7 \pm 1,2\%$ от общей площади ткани на

гистологических изображениях на 5, 7 и 9 дни соответственно (Рис. 27, верхняя панель изображений). Также обнаружены области дистрофически изменённых опухолевых клеток. Площадь таких областей составила $8\pm3,5\%$, $13\pm1,7\%$ и $12,3\pm2,5\%$ от общей площади ткани на гистологических изображениях на 5, 7 и 9 дни соответственно. Слабый отек обнаружен в опухолях контрольной группы. Площадь отека составила $2\pm2,6\%$, $3,3\pm1,5\%$ и $6,3\pm1,5\%$ на 5, 7 и 9 дни соответственно. Отек может быть вызван выраженной лимфогистиоцитарной инфильтрацией на периферии опухолевого узла.

Слабый отёк опухолевой ткани, небольшой процент клеток с дистрофическими изменениями и визуально наблюдаемый достаточно ранний (12 день) струп на поверхности опухолей контрольной группы являются результатом высокой агрессивности и злокачественность роста опухолевой модели 4T1.

Структурные ОКТ изображения характеризовались средним по интенсивности, однородным, медленно затухающим сигналом (Рис. 27, средняя панель изображений); области и границы гистологических структур, обнаруженные на гистологических препаратах, визуально не различались.

ОКЭ изображения опухолей контрольной группы, полученные на 5 день наблюдения, характеризовались как относительно однородные с преобладанием высоких значений модуля упругости – около 600-900 кПа (Рис. 27, нижняя панель изображений). Гистологически, данные области опухоли соответствуют областям жизнеспособной опухолевой ткани. На 7 и 9 дни были получены неоднородные ОКЭ изображения опухолей, где появлялись области более низких значений модуля упругости – около 400-600 кПа. Данные области топографически соответствовали областям дистрофически изменённых опухолевых клеток и областям слабого отёка опухолевой ткани на 7 и 9 дни.

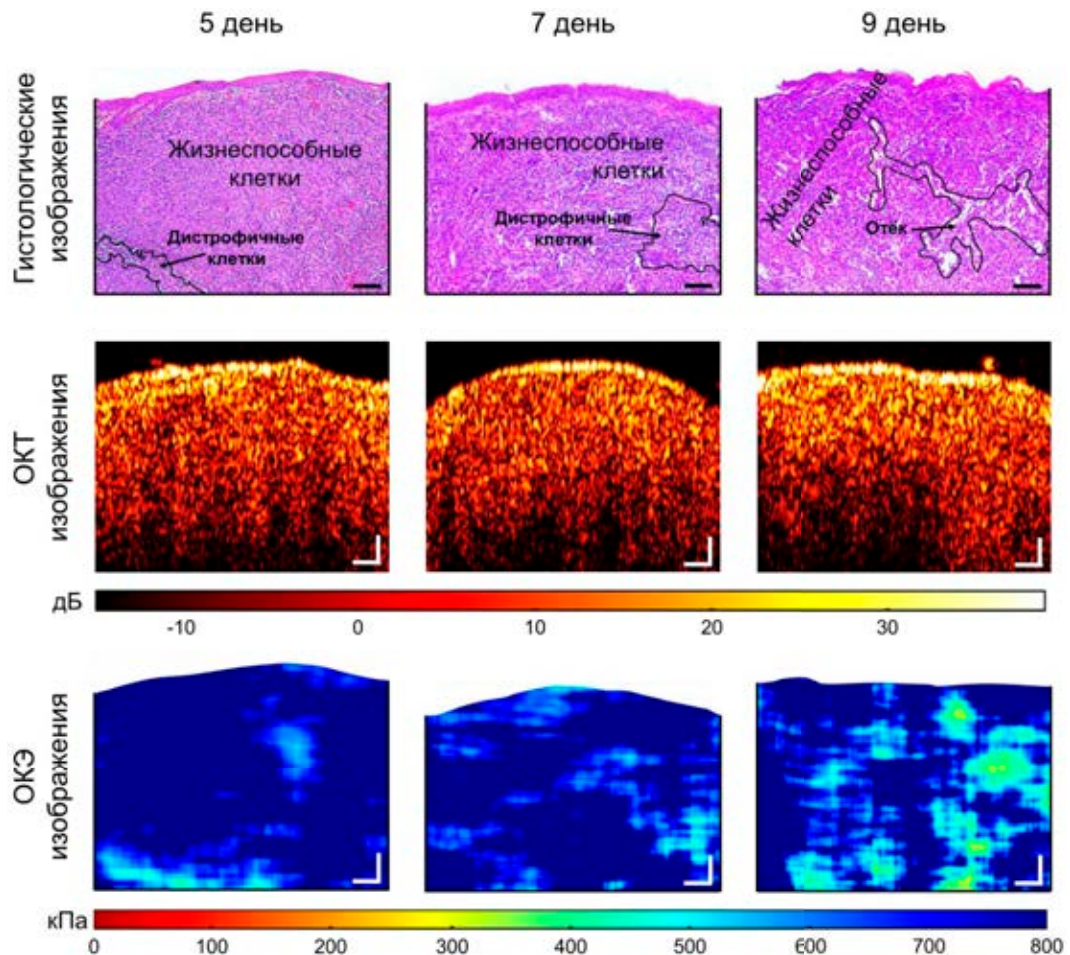


Рисунок 27. Пример результатов гистологического, ОКТ и ОКЭ исследований естественного роста опухолей контрольной группы I (модель 4T1 без лечения). Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 100 мкм. Преобладание областей жизнеспособных опухолевых клеток на гистологических изображениях; наблюдались небольшие области дистрофически изменённых опухолевых клеток и слабо выраженного отёка ткани. На структурных ОКТ изображениях области и границы гистологических структур визуально не определялись. Области жизнеспособных опухолевых клеток характеризовались высокими значениями модуля упругости (~600-900 кПа) на ОКЭ изображениях, дистрофически изменённых клеток и слабого отёка – более низкими значениями модуля упругости (~400-600 кПа).

Исследование изменения гистологической структуры опухолей опытной группы I

На гистологических препаратах опухолей 4T1 на 5й день после лечения препаратом Бевацизумаб обнаружены выраженные сосудистые расстройства – десквамации эндотелия сосудов (Рис. 28а), тромбозы и кровоизлияния (Рис. 28б), следствием которых является выраженный отёк

опухолевой ткани (Рис. 28в), занимающий $46,7 \pm 2,9\%$ на 5 день, $63,3 \pm 7,6\%$ на 7 день и $57 \pm 11,3\%$ на 9 день от общей площади ткани на гистологических изображениях (Рис. 29, верхняя панель изображений). На 5, 7 и 9 дни в опухолевой ткани в зоне ишемии образуются области некроза (Рис. 28г), занимающие по площади $1 \pm 1,7\%$ на 5 день, $4 \pm 1\%$ на 7 день и $18,3 \pm 6,2\%$ на 9 день.

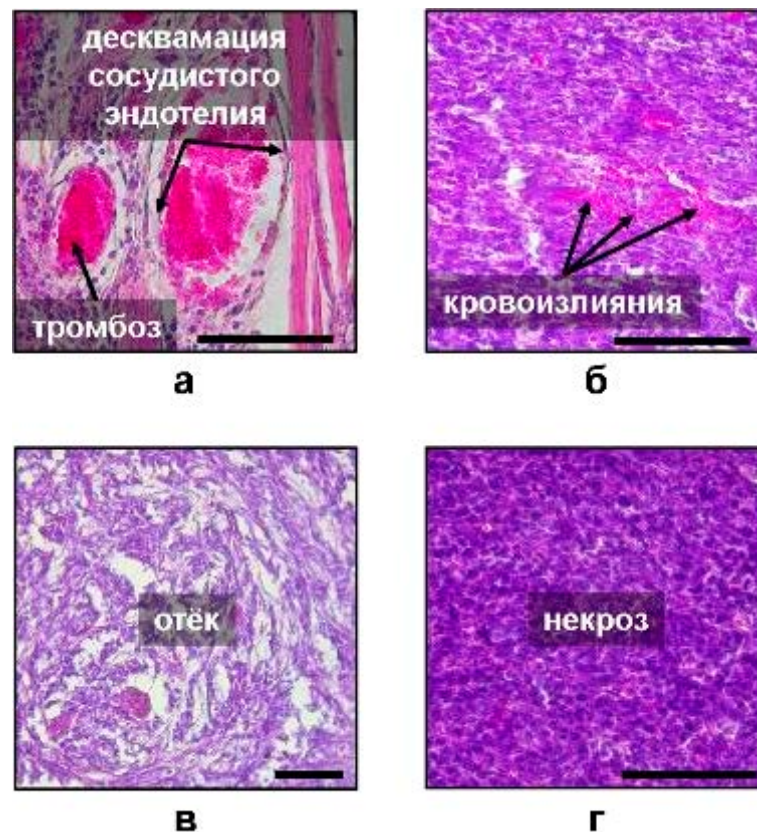


Рисунок 28. Пример последовательности возникновения патоморфологических изменений опухолевой ткани модели 4Т1 после лекарственной терапии препаратом Бевацизумаб: **а** – десквамация эндотелия и тромбоз кровеносных сосудов (наблюдали на 5 день); **б** – кровоизлияние (наблюдали на 5 день); **в** – обширный отёк опухолевой ткани (наблюдали на 5 день); **г** – некроз опухолевых клеток (наблюдали чаще на 7-9 дни). Размер бара на всех изображениях – 100 мкм.

Структурные ОКТ изображения характеризовались средним по интенсивности, однородным, медленно затухающим сигналом (Рис. 29, средняя панель изображений); области и границы гистологических

структур, обнаруженные на гистологических препаратах, визуально не различались.

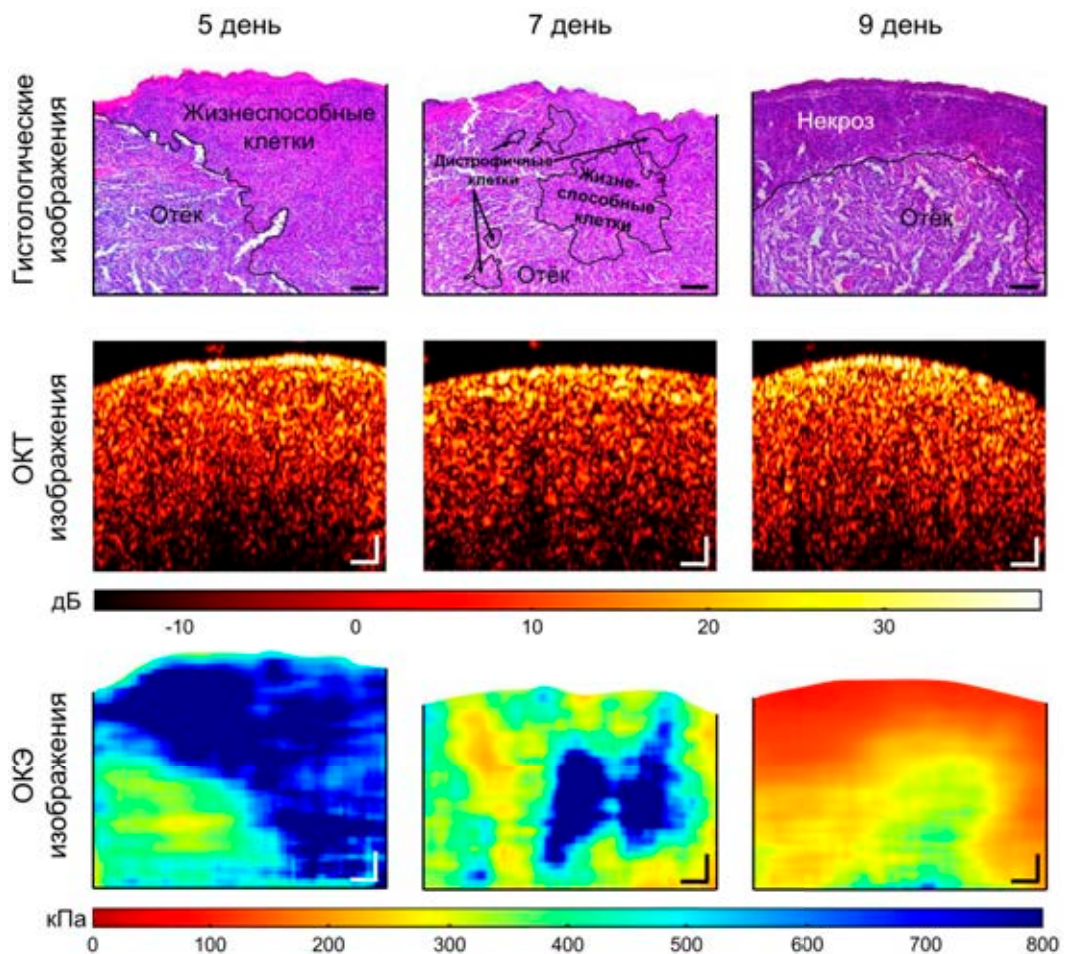


Рисунок 29. Пример результатов гистологического, ОКТ и ОКЭ исследований опухолей опытной группы I (модель 4T1 с антиангиогенной терапией препаратом Бевацизумаб). Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 100 мкм. Преобладание областей жизнеспособных опухолевых клеток на гистологических изображениях на 5 день; наблюдались обширные области выраженного отёка опухолевой ткани и небольшие области дистрофически изменённых клеток на 5, 7 и 9 дни, обширные области некроза ткани – на 9 день. На структурных ОКТ изображениях области и границы гистологических структур визуально не определялись. Морфологические структуры характеризовались следующими значениями модуля упругости на ОКЭ изображениях: жизнеспособные опухолевые клетки – ~600-900 кПа, дистрофически изменённые клетки – ~400-600 кПа, отёк ткани – ~200-400 кПа, и некроз ткани – ~100-200 кПа.

ОКЭ изображения опухолей группы терапии препаратом Бевацизумаб, полученные на 5 и 7 дни наблюдения, характеризовались неоднородным распределением значений модуля упругости на изображениях (Рис. 29, нижняя панель изображений), с преобладанием областей более низких значений модуля упругости, по сравнению с ОКЭ изображениями опухолей контрольной группы. Наблюдались обширные области средних значений модуля упругости ($\sim 200-400$ кПа), топографически соответствующие областям выраженного отёка на гистологических изображениях. Также наблюдались области более высоких значений модуля упругости ($\sim 400-900$ кПа), топографически соответствующие областям дистрофически изменённых опухолевых клеток и жизнеспособной опухолевой ткани на гистологических изображениях. На 9 день наблюдалось дальнейшее снижение значений модуля упругости и детектировались области низких значений модуля упругости ($\sim 100-200$ кПа), топографически соответствующие областям появления некроза опухоли на гистологических изображениях.

Исследование изменения гистологической структуры опухолей опытной группы II

По гистологическим данным в опухолях, подвергшихся воздействию алкилирующего препарата Цисплатин, наблюдается больше дистрофически изменённых клеток, чем в контрольной группе и чем в опытной группе I. Данная тенденция наблюдается как на периферии, так и в центральных частях опухоли. На 5 день наблюдения дистрофически изменённые клетки занимают $45,3 \pm 4,5\%$ площади опухолевой ткани (Рис. 30, верхняя панель изображений). На 7 и 9 дни наблюдения детектируются области некроза, занимающие по площади $27 \pm 8,2\%$ и $71,6 \pm 12,5\%$ ткани соответственно. В оставшейся опухолевой ткани преобладают области дистрофически изменённых клеток площадью $35,7 \pm 12,5\%$ ткани на гистологических

изображениях на 7 день и $5,3 \pm 1,5\%$ ткани на гистологических изображениях на 9 день.

Структурные ОКТ изображения характеризовались средним по интенсивности, однородным, медленно затухающим сигналом (Рис. 30, средняя панель изображений); области и границы гистологических структур, обнаруженные при гистологическом исследовании, визуальнo не различались.

ОКЭ изображения опухолей группы терапии препаратом Цисплатин, полученные на 5 день наблюдения, характеризовались неоднородным распределением значений модуля упругости, по сравнению с контрольной группой. Детектируемые на ОКЭ изображениях области со средними значениями модуля упругости ($\sim 400-600$ кПа) топографически соответствовали областям дистрофически измененных опухолевых клеток и отёка опухолевой ткани на гистологических изображениях (Рис. 30, нижняя панель изображений). На 7 день ОКЭ изображения отличались выраженной неоднородностью распределения значений модуля упругости. Чётко выражены на ОКЭ изображениях области средних и высоких значений модуля упругости ($\sim 400-600$ кПа), топографически согласующиеся с областями дистрофически изменённых опухолевых клеток; области более низких значений модуля упругости ($\sim 200-400$ кПа), топографически согласующихся с областями отёка опухолевой ткани; и области очень низких значений модуля упругости ($\sim 100-200$ кПа), топографически соответствующих областям некроза опухолевой ткани. Неоднородные ОКЭ изображения, полученные на 9 день, характеризовались преобладанием областей низких значений модуля упругости ($\sim 100-200$ кПа) над областями средних значений модуля упругости ($\sim 200-400$ кПа). Данные области топографически согласовались с областями некроза и отёка опухолевой ткани на гистологических изображениях.

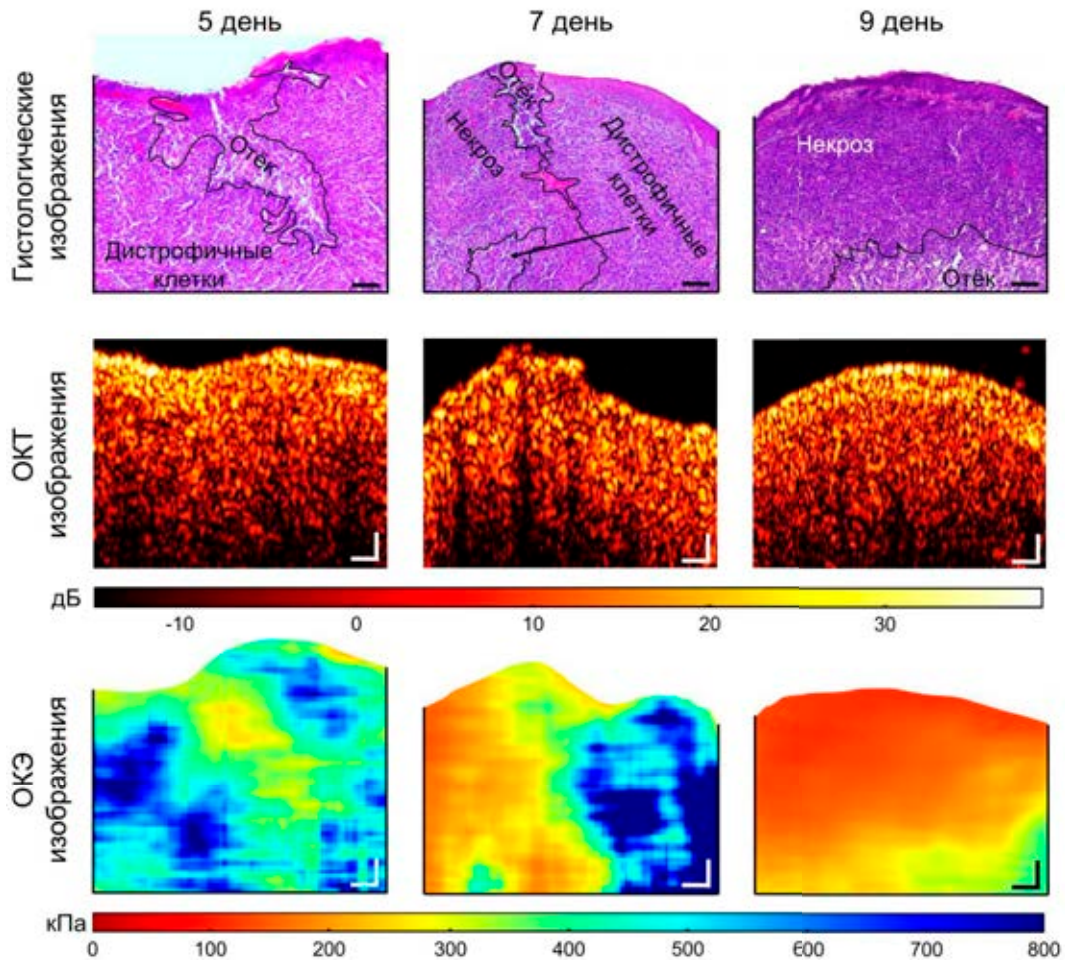


Рисунок 30. Пример результатов гистологического, ОКТ и ОКЭ исследований опухолей опытной группы II (модель 4Т1 с алкилирующей терапией препаратом Цисплатин). Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 100 мкм. Преобладание областей дистрофически изменённых клеток на гистологических изображениях на 5 день; наблюдались небольшие области отёка опухолевой ткани на 5, 7 и 9 дни, обширные области некроза ткани – на 7 и 9 дни. На структурных ОКТ изображениях области и границы гистологических структур визуально не определялись. Морфологические структуры характеризовались следующими значениями модуля упругости на ОКЭ изображениях: жизнеспособные опухолевые клетки – ~600-900 кПа, дистрофически изменённые клетки – ~400-600 кПа, отёк ткани – ~200-400 кПа, и некроз ткани – ~100-200 кПа.

По результатам детального сопоставления ОКЭ изображений и гистологических изображений наглядно продемонстрировано, что неоднородное и гетерогенное распределение показателей модуля упругости на ОКЭ изображениях топографически соотносится с гистологическими структурами, выделенными на гистологических изображениях. ОКТ

структурные изображения характеризовались медленно затухающим, однородным, средним по интенсивности сигналом; гистологические структуры не имели визуально различимой границы на структурных ОКЭ изображениях.

Таким образом, было показано, что на гистологических изображениях опухолей разных групп в ответ на терапию и Бевацизумабом, и Цисплатином выявляется один и тот же набор гистологических структур и изменений (жизнеспособные опухолевые клетки, дистрофически изменённые опухолевые клетки, некроз и отёк опухолевой ткани), которые отличаются друг от друга по модулю упругости. Прицельное сопоставление выделенных областей гистологических структур на ОКЭ и гистологических изображениях дает возможность установить диапазон модуля упругости для каждой из гистологических структур.

Определение диапазонов значений модуля упругости гистологических структур опухолевой модели 4T1. Сегментирование ОКЭ изображений

Дальнейшая работа была сосредоточена на количественном определении диапазонов значений модуля упругости выделенных гистологических изменений (Рис. 31а).

В результате сопоставления каждой гистологической структуры на ОКЭ и гистологическом изображениях, были получены кривые частоты встречаемости различных значений модуля упругости, соответствующие каждому сопоставлению, для каждой гистологической структуры (Рис. 31б). Усреднение таких кривых позволило получить спектр значений модуля упругости для каждой гистологической структуры (Рис. 31в), который был представлен в виде аппроксимированной эмпирической функции распределения колоколообразной формы. Изображая полученные спектры в одной графической плоскости, был получен суммарный спектр значений модуля упругости микроструктур и их изменений (Рис. 31г).

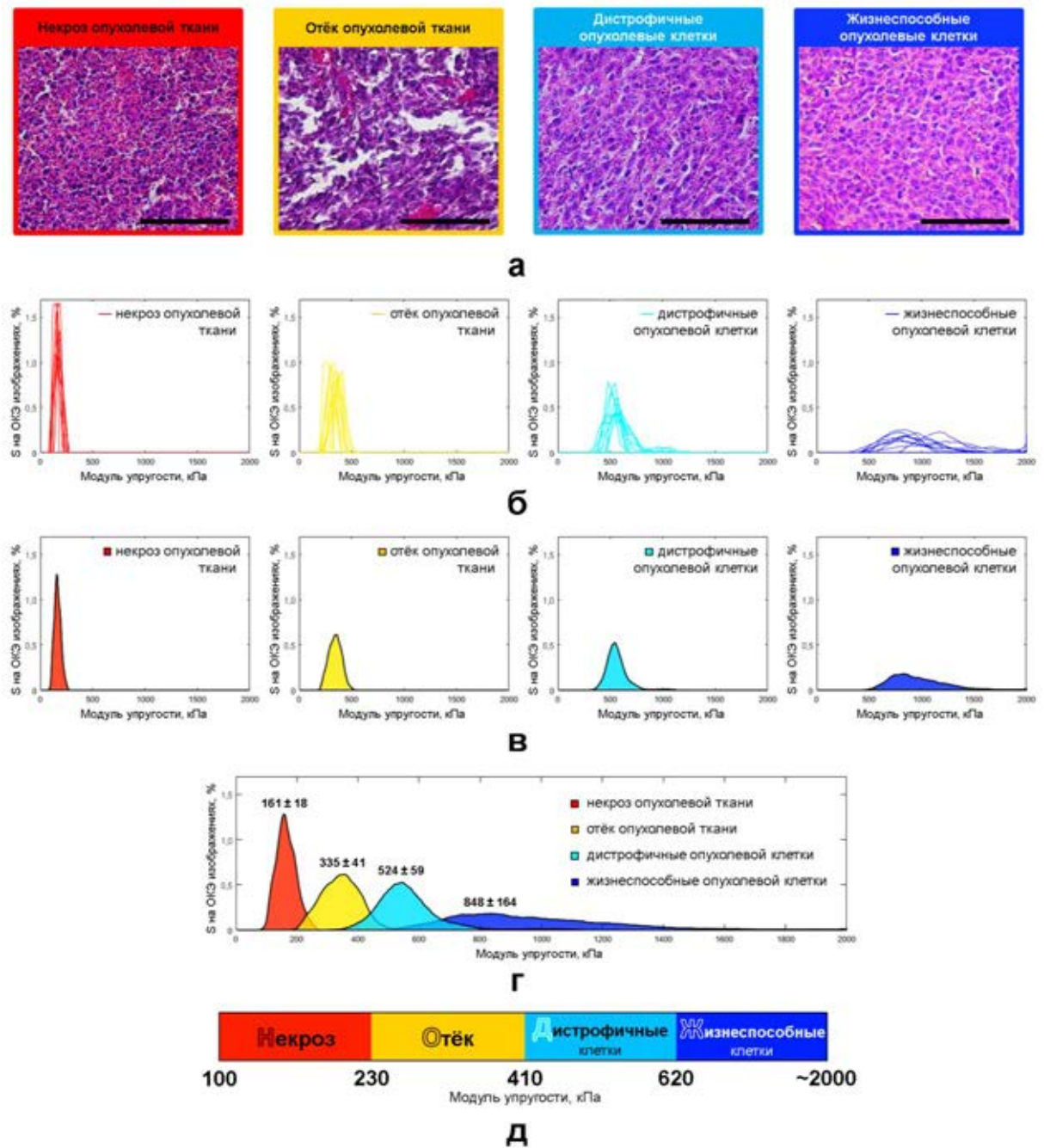


Рисунок 31. Количественное определение диапазонов значений модуля упругости гистологических структур: **а** – гистологические изображения изучаемых микроструктур; **б** – кривые распределения значений модуля упругости для обнаруженных микроструктур; **в** – спектры значений модуля упругости для каждой микроструктуры, полученные путём усреднения кривых; **г** – суммарный спектр упругости; **д** – границы диапазонов значений модуля упругости микроструктур; размер бара на всех изображениях – 100 мкм.

Следующим шагом являлось определение диапазонов значений модуля упругости для каждой гистологической структуры в соответствии с

полученным суммарным спектром значений упругости микроструктур. Суммарный спектр значений упругости представлен в виде четырёх функций распределения модуля упругости, разделенных небольшими перекрытиями, не превышающими 10% собственной площади каждой функции (Рис. 31г) – это позволило адекватно разделить диапазоны модуля упругости каждой структуры для последующего сегментирования.

Определено, что некротизированная опухолевая ткань характеризуется самыми низкими значениями модуля упругости от 101 кПа до 230 кПа (среднее значение модуля упругости 161 ± 18 кПа); отек опухолевой ткани имеет значения модуля упругости от 231 кПа до 410 кПа (среднее значение модуля упругости 335 ± 41 кПа); дистрофически изменённые опухолевые клетки имеют значения модуля упругости в диапазоне от 411 кПа до 620 кПа (среднее значение модуля упругости 524 ± 59 кПа). Жизнеспособные опухолевые клетки характеризуются самыми высокими значениями модуля упругости, превышающими 621 кПа, со средним значением модуля упругости 848 ± 164 кПа. Средние значения модуля упругости каждой гистологической структуры статистически значимо отличались друг от друга ($p < 0,01$).

Установленные диапазоны значений модуля упругости представлены в виде цветовой шкалы (Рис. 31д), на которой диапазон значений модуля упругости каждой гистологической структуры обозначен своим цветом.

На ОКЭ изображениях (Рис. 32а) отсутствуют чёткие границы между гистологическими структурами, обозначенные на гистологических изображениях (Рис. 32б). Однако сегментированные ОКЭ изображения (Рис. 32д) имеют высокий контраст и позволяют охарактеризовать топографию и границы наблюдаемых гистологических структур.

На сегментированном изображении опухоли контрольной группы (рис. 32д), наблюдается область скопления дистрофически изменённых опухолевых клеток, которая не была дифференцирована при первичном морфологическом исследовании. Однако при повторном исследовании было

подтверждено скоплении дистрофически изменённых опухолевых клеток в данной области (Рис. 32в).

Кроме того, на этом же сегментированном ОКЭ изображении обнаружена область дистрофически изменённых опухолевых клеток, представленная в виде единичного элемента разрешения. При повторном морфологическом обследовании гистологического изображения в топографически соответствующей локализации определена область скопления дистрофически изменённых клеток (Рис. 32г), количество которых не превышало 10. Исходя из этого, можно предположить о возможности метода ОКЭ дифференцировать небольшие скопления изменённых клеток (около 10) среди жизнеспособных опухолевых клеток.

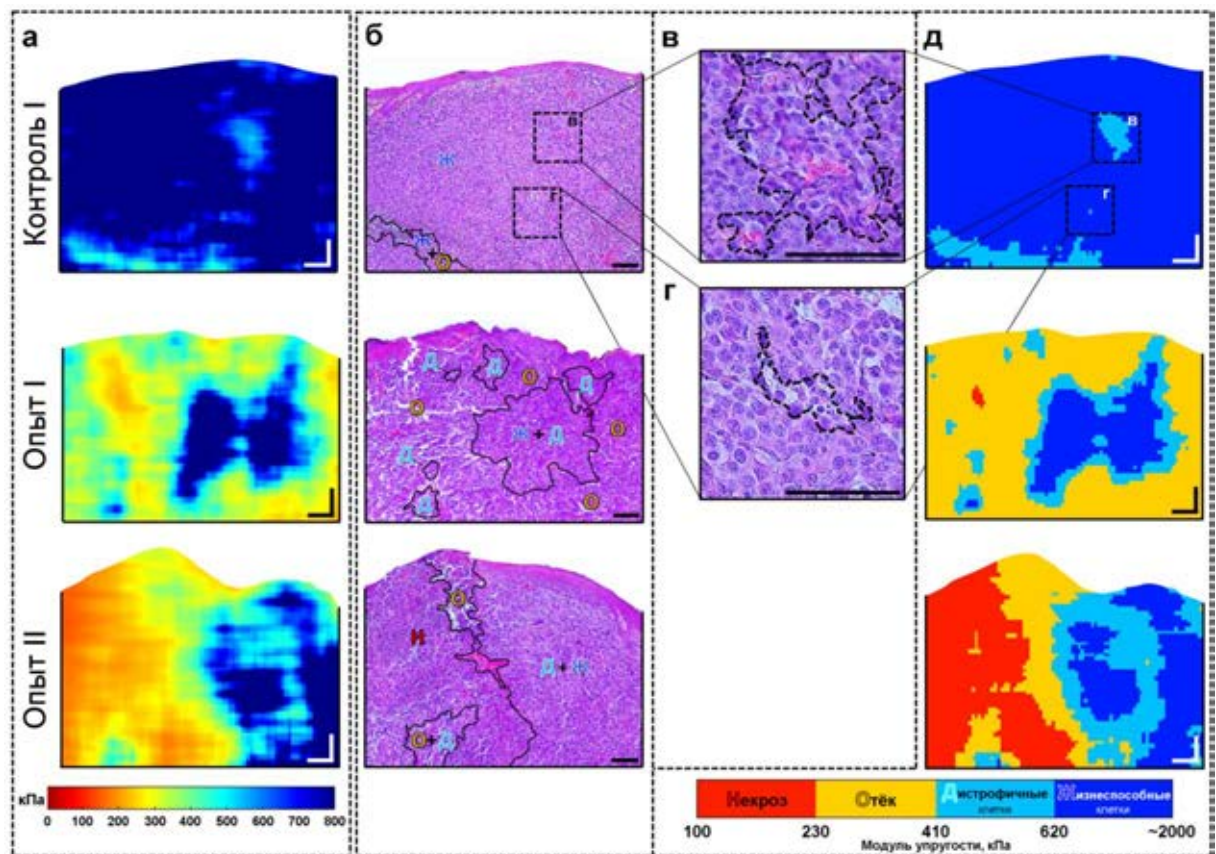


Рисунок 32. Пример сегментирования ОКЭ изображений согласно определённым диапазонам значений модуля упругости микроструктур опухолевой ткани модели 4T1: **а** – ОКЭ изображения; **б** – гистологические изображения; черные кривые – границы областей микроструктур и изменений опухоли; **в-г** – увеличенные гистологические участки; **д** –

сегментированные ОКЭ изображения. Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 100 мкм.

Следующим шагом, необходимым для верификации высокой эффективности метода ОКЭ в обнаружении различных гистологических структур опухолевой ткани, является статистическое определение корреляционной взаимосвязи результатов ОКЭ и морфологического исследования.

Статистический анализ мониторинга модели 4Т1

Было проведено сравнение площадей гистологических структур, рассчитанных при количественной обработке ОКЭ и гистологических изображений (Таб. 10). Результаты сравнения приведены на рисунке 33а. Из гистограмм на рисунке 33а можно сделать вывод о высокой степени согласованности результатов, полученных двумя способами.

Кроме того, показана взаимосвязь между значениями занимаемой площади каждой гистологической структуры опухолевой ткани, зафиксированными на гистологических и ОКЭ изображениях (Рис. 33б). В каждую статистическую группу были взяты все 27 пар гистологических и ОКЭ изображений. Получена сильная и прямая корреляция – определены коэффициенты корреляции по Пирсону: для жизнеспособных опухолевых клеток $r = 0,98$; для дистрофически изменённых опухолевых клеток $r = 0,93$; для отека опухолевой ткани $r = 0,96$; и для некроза опухолевой ткани $r = 0,97$ ($p < 0,001$). По полученным результатам можно сделать вывод об объективности определённых выше диапазонов значений модуля упругости каждой микроструктуры и изменения опухолевой ткани для модели 4Т1.

Таблица 10. Данные ОКЭ мониторинга и гистологического исследования площадей, занимаемых микроструктурами и изменениями опухолевой ткани модели 4T1

Гистологическая структура		Жизнеспособные опухолевые клетки		Дистрофически изменённые клетки		Отёк опухолевой ткани		Некроз опухолевой ткани	
Метод определения площади микроструктуры		Гистология, %	ОКЭ, %	Гистология, %	ОКЭ, %	Гистология, %	ОКЭ, %	Гистология, %	ОКЭ, %
Контроль I	5 день	90	89	10	11	0	0	0	0
		90	87	7	7	0	5	3	1
		85	90	10	9	5	1	0	0
	7 день	80	82	15	14	5	4	0	0
		85	81	12	16	3	3	0	0
		70	88	19	11	7	1	4	0
	9 день	80	80	15	19	5	1	0	0
		65	76	10	20	20	4	5	0
		82	78	12	13	6	9	0	0
Опыт I	5 день	35	40	20	25	45	35	0	0
		30	30	20	22	50	48	0	0
		27	28	25	16	45	53	3	3
	7 день	17	15	8	13	70	68	5	4
		25	22	17	18	55	56	3	4
		15	16	2	12	75	69	8	3
	9 день	6	5	4	4	65	71	25	20
		17	12	3	11	60	49	20	28
		22	17	3	13	65	53	10	17
Опыт II	5 день	32	32	41	42	26	26	1	0
		40	38	45	45	15	17	0	0
		30	31	50	50	20	19	0	0
	7 день	8	9	50	47	15	16	27	28
		9	22	45	33	35	25	11	20
		5	6	40	31	30	30	25	33
	9 день	0	4	5	1	20	27	75	68
		0	4	0	2	15	20	85	74
		20	20	10	1	15	11	55	68
Корреляция (r) по Пирсону		0,98		0,93		0,96		0,97	

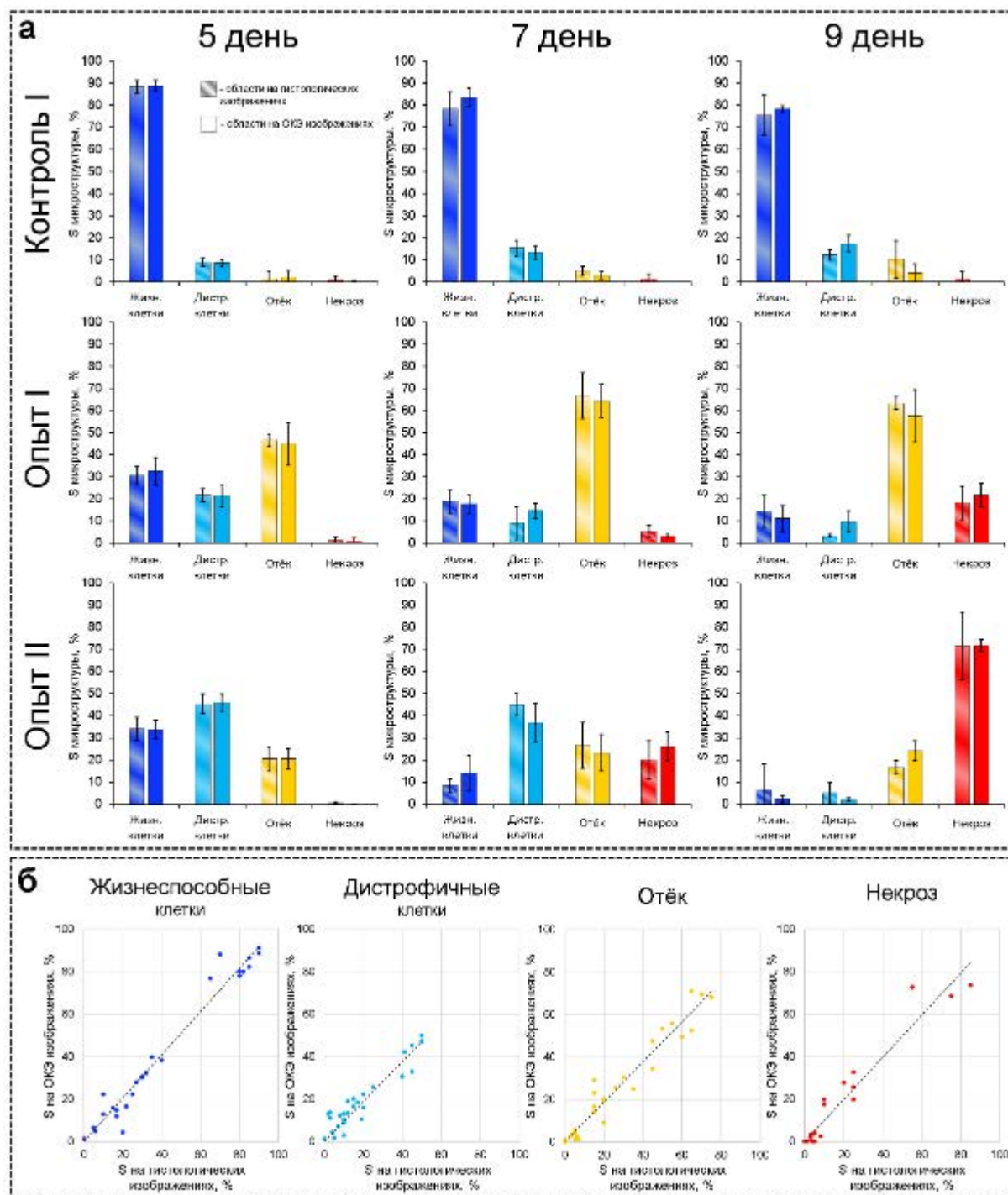


Рисунок 33. Количественное сравнение площадей гистологических структур, полученных посредством гистологического и ОКЭ исследований: **а** – сравнение средних для каждой временной точки значений площадей гистологических структур, полученных по результатам гистологического (полосатые столбцы) и ОКЭ (однотонные столбцы) исследований; **б** – диаграммы взаимосвязи значений площадей гистологических структур, определённых методом ОКЭ и гистологическим исследованием.

В итоге, можно утверждать, что результат ОКЭ мониторинга упругости опухолей в высокой степени согласуется с результатами

гистологического исследования. Это демонстрирует возможность ОКЭ с высокой точностью определять границы и топографию расположения в ткани модельных опухолей 4T1 различных микроструктур и изменений, возникших как в результате особенностей злокачественного роста опухоли, так и под воздействием противоопухолевых терапевтических агентов. Стоит отметить сильную и прямую корреляцию между значениями площадей микроструктур и изменений опухолевой ткани, полученными по результатам ОКЭ и гистологического исследований ($r = 0,93-0,99$; $p < 0,001$). Показана возможность ОКЭ детектировать небольшие области дистрофически изменённых опухолевых клеток, включающих 10 клеток опухоли 4T1, среди полей жизнеспособных опухолевых клеток. Результаты исследований, представленных в данном разделе 3.1.2, опубликованы в 2020 году в журнале издательства *Nature – Scientific Reports* [243].

3.1.3 Исследование эффективности противоопухолевой терапии на модели колоректального рака СТ-26

Следующим этапом экспериментальных исследований являлось изучение возможностей ОКЭ детекции изменения микроструктуры ткани в следствии терапевтического воздействия на опухолевую модель КР СТ-26. Цель данного этапа заключалась в доказательстве универсальности определённых ранее диапазонов значений модуля упругости наблюдаемых микроструктур и изменений опухолевой ткани модели 4T1. Достижение данной цели поможет сформировать понимание о возможной универсальности использования ОКЭ мониторинга в изучении изменений микроструктур различных гистиоидных моделей опухолевых тканей, часто используемых в доклинических испытаниях новых противоопухолевых средств и новых видов терапии.

Исследование гистологической структуры опухолей контрольной группы Ia

На гистологических препаратах опухоли СТ-26 выявлены области жизнеспособных опухолевых клеток, площадь которых составила $93 \pm 1,7\%$, $87 \pm 2,6\%$ и $72 \pm 8,7\%$ от общей площади ткани на гистологических изображениях на 5, 7 и 9 дни соответственно (Рис. 34, верхняя панель изображений). Также обнаружены области дистрофически изменённых опухолевых клеток. Площадь таких областей составила $7 \pm 1,7\%$, $12,3 \pm 2,5\%$ и $20,6 \pm 7,1\%$ от общей площади ткани на гистологических изображениях на 5, 7 и 9 дни соответственно. Слабый отек обнаружен в опухолях контрольной группы. Площадь отека составила $7,3 \pm 2,5\%$ на 9 дни.

Структурные ОКТ изображения характеризовались средним по интенсивности, однородным, медленно затухающим сигналом (Рис. 34, средняя панель изображений); области и границы гистологических структур, обнаруженные на гистологических препаратах, визуально не различались.

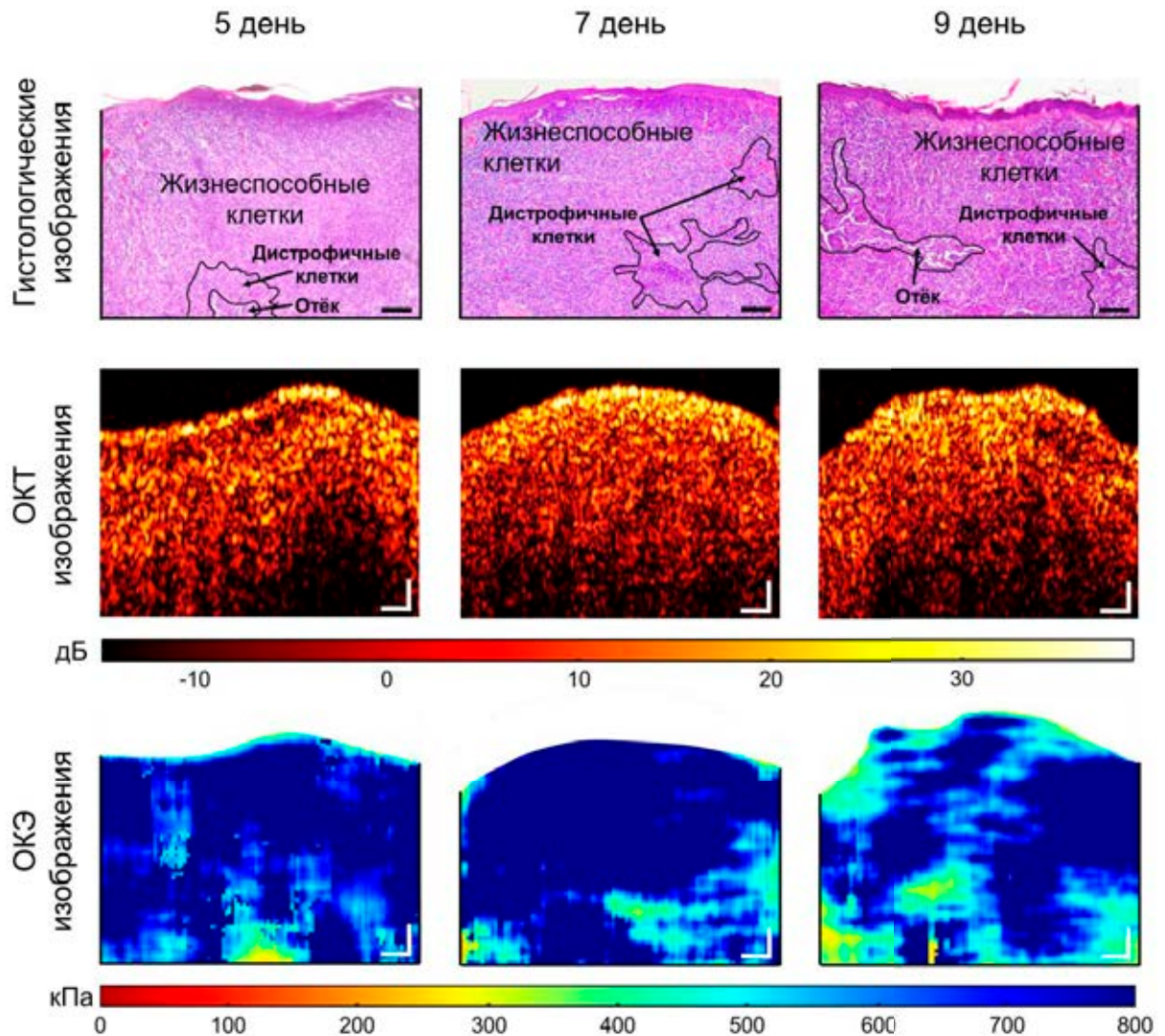


Рисунок 34. Пример результатов гистологического, ОКТ и ОКЭ исследований естественного роста опухолей контрольной группы Ia (модель СТ-26 без лечения). Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 100 мкм. Преобладание областей жизнеспособных опухолевых клеток на гистологических изображениях; наблюдались небольшие области дистрофически изменённых опухолевых клеток и слабо выраженного отёка ткани. На структурных ОКТ изображениях области и границы гистологических структур визуально не определялись. Области жизнеспособных опухолевых клеток характеризовались высокими значениями модуля упругости (~600-900 кПа) на ОКЭ изображениях, дистрофически изменённых клеток и слабого отёка – более низкими значениями модуля упругости (~400-600 кПа).

ОКЭ изображения опухолей контрольной группы, полученные на 5 день наблюдения, характеризовались как относительно однородные с преобладанием высоких значений модуля упругости – около 600-900 кПа (Рис. 34, нижняя панель изображений). Гистологически, данные области

опухоли соответствуют областям жизнеспособной опухолевой ткани. На 7 и 9 дни были получены неоднородные ОКЭ изображения опухолей, где появлялись области более низких значений модуля упругости – около 400-600 кПа. Данные области топографически соответствовали областям дистрофически изменённых опухолевых клеток и областям слабого отёка опухолевой ткани на 7 и 9 дни.

По результатам гистологического изучения опухолевой ткани модели СТ-26 обнаружены сходные с моделью 4T1 признаки высокой злокачественности и агрессивный рост колоректального рака: выраженный воспалительный процесс опухолевой периферии, и как следствие – слабый отёк ткани, небольшой процент клеток с дистрофическими изменениями.

Исследование изменения гистологической структуры опухолей опытной группы Ia

На гистологических препаратах опухолей СТ-26 на 5й день после лечения препаратом Бевацизумаб обнаружен выраженный отёк опухолевой ткани, занимающего $83,6 \pm 6,5\%$ на 5 день, $80 \pm 5\%$ на 7 день и $66,3 \pm 13,1\%$ на 9 день от общей площади ткани на гистологических изображениях (Рис. 35, верхняя панель изображений). На 5, 7 и 9 дни в опухолевой ткани в зоне ишемии образуются области некроза, занимающие по площади $4,1 \pm 3,6\%$ на 5 день, $8,6 \pm 4\%$ на 7 день и $20,6 \pm 5,7\%$ на 9 день. Кроме того, в опухолевой ткани наблюдаются области дистрофически изменённых опухолевых клеток, занимающие по площади $4,3 \pm 3\%$ на 5 день, $10,3 \pm 2,9\%$ на 7 день и $13 \pm 6,2\%$ на 9 день.

Структурные ОКТ изображения характеризовались средним по интенсивности, однородным, медленно затухающим сигналом (Рис. 35, средняя панель изображений); области и границы гистологических структур, обнаруженные на гистологических препаратах, визуально не различались.

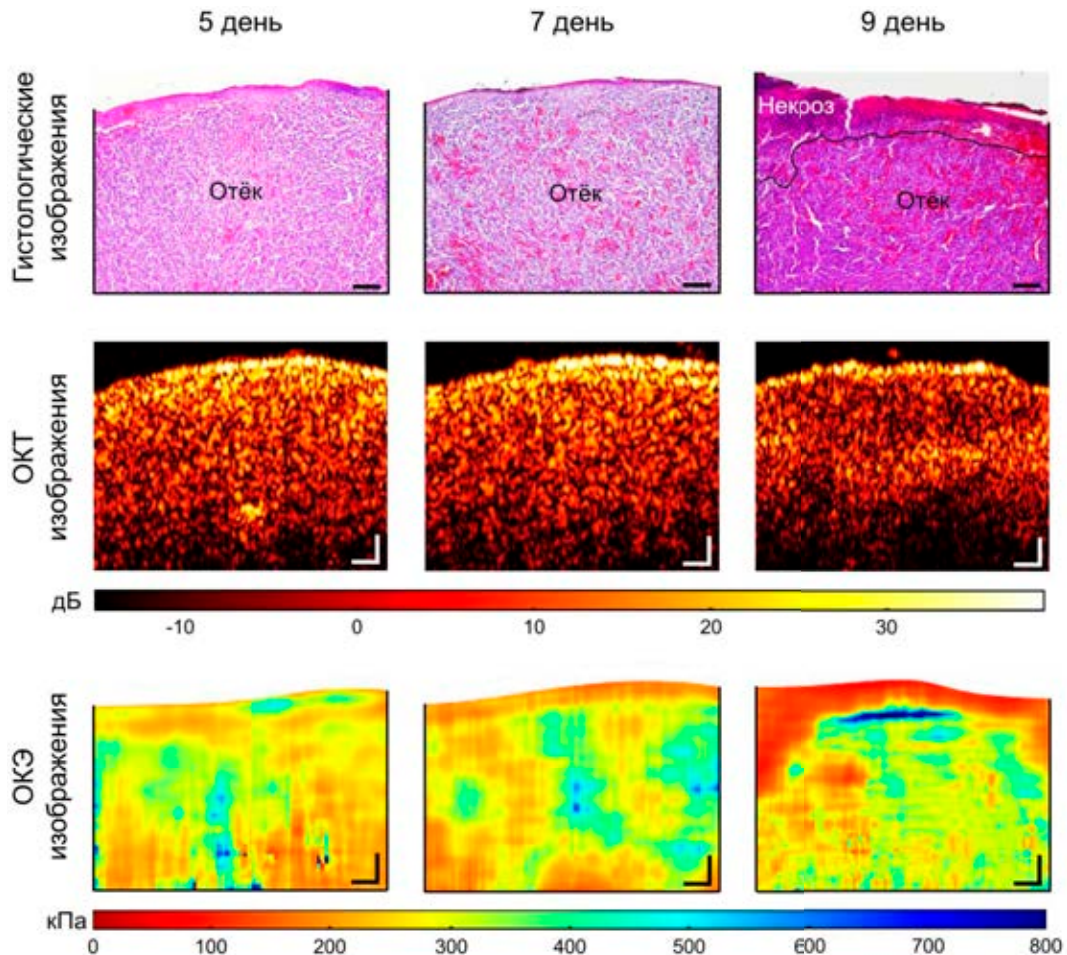


Рисунок 35. Пример результатов гистологического, ОКТ и ОКЭ исследований опухолей опытной группы Ia (модель СТ-26 с антиангиогенной терапией препаратом Бевацизумаб). Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 100 мкм. Преобладание областей отёка ткани на гистологических изображениях на 5, 7 и 9 дни; наблюдались небольшие области некроза ткани на 9 день. На структурных ОКТ изображениях области и границы гистологических структур визуально не определялись. Морфологические структуры характеризовались следующими значениями модуля упругости на ОКЭ изображениях: дистрофически изменённые клетки – ~400-600 кПа, отёк ткани – ~200-400 кПа, и некроз ткани – ~100-200 кПа.

ОКЭ изображения опухолей группы терапии препаратом Бевацизумаб, полученные на 5, 7 и 9 дни наблюдения, характеризовались неоднородным распределением значений модуля упругости на изображениях (Рис. 35, нижняя панель изображений), с преобладанием областей более низких значений модуля упругости, по сравнению с ОКЭ изображениями опухолей контрольной группы. Преобладали обширные

области средних значений модуля упругости ($\sim 200-400$ кПа), топографически соответствующие областям выраженного отёка на гистологических изображениях. Наблюдались небольшие области более высоких значений модуля упругости ($\sim 400-900$ кПа), топографически соответствующие областям дистрофически изменённых опухолевых клеток и жизнеспособной опухолевой ткани на гистологических изображениях. На 9 день наблюдались области низких значений модуля упругости ($\sim 100-200$ кПа), топографически соответствующие областям появления некроза опухоли на гистологических изображениях.

Исследование изменения гистологической структуры опухолей опытной группы IIa

По гистологическим данным в опухолях модели СТ-26, подвергшихся воздействию алкилирующего препарата Цисплатин, наблюдается больше дистрофически изменённых клеток, чем в контрольной группе и чем в опытной группе I. Данная тенденция наблюдается как на периферии, так и в центральных частях опухоли. На 5 день наблюдения дистрофически изменённые клетки занимают $43,3 \pm 9,5\%$ площади опухолевой ткани (Рис. 36, верхняя панель изображений). Кроме того, уже на 5 день обнаружены области некроза опухолевой ткани занимают $8,6 \pm 5\%$ площади опухолевой ткани. На 7 и 9 дни наблюдения детектируются области некроза, занимающие по площади $16,6 \pm 5\%$ и $58,3 \pm 12,7\%$ ткани соответственно. В оставшейся опухолевой ткани преобладают области дистрофически изменённых опухолевых клеток площадью $51,7 \pm 11,2\%$ ткани на гистологических изображениях на 7 день и $33,7 \pm 14,2\%$ ткани на гистологических изображениях на 9 день.

Структурные ОКТ изображения характеризовались средним по интенсивности, однородным, медленно затухающим сигналом (Рис. 36, средняя панель изображений); области и границы гистологических

структур, обнаруженные при гистологическом исследовании, визуально не различались.

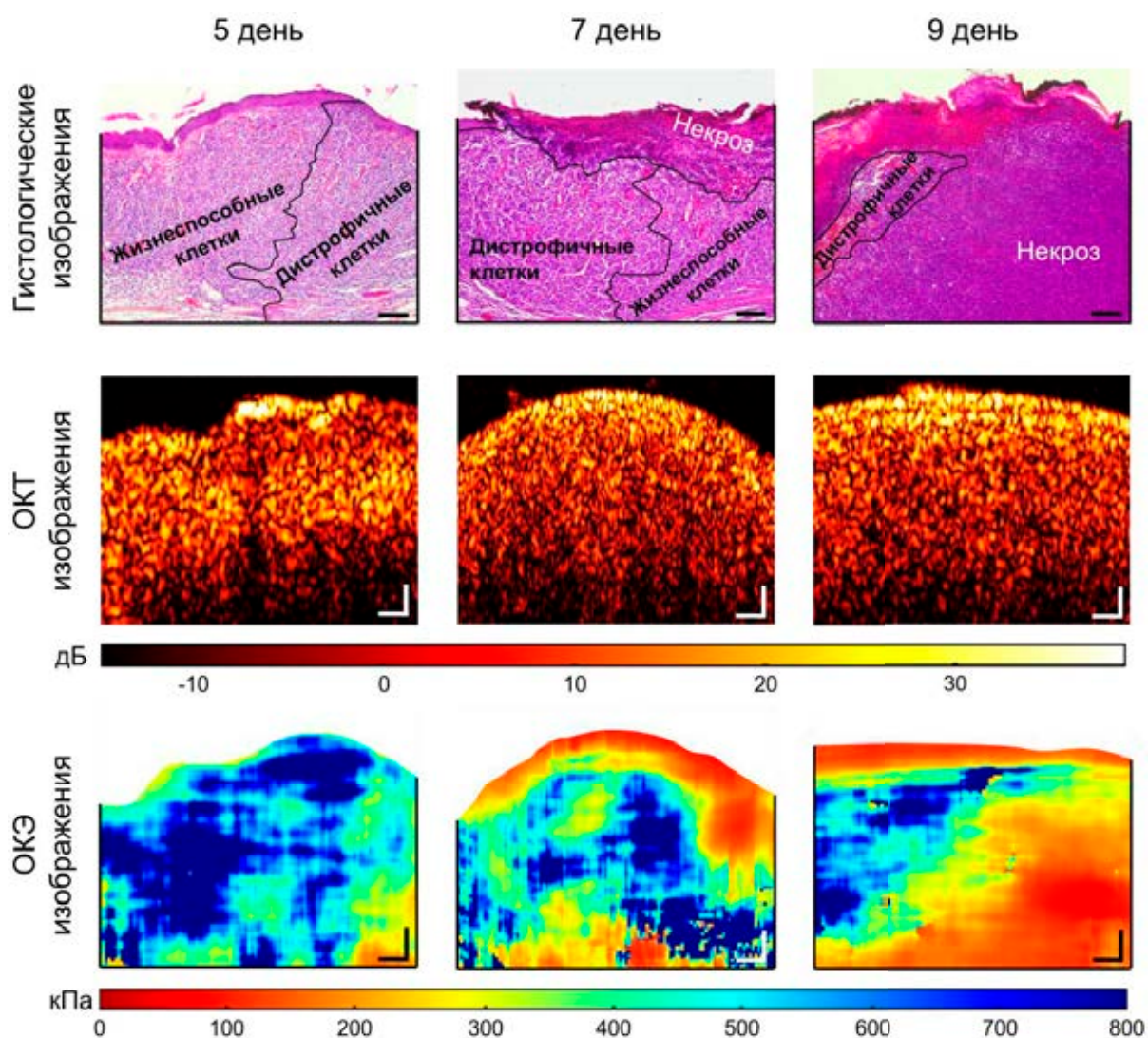


Рисунок 36. Пример результатов гистологического, ОКТ и ОКЭ исследований опухолей опытной группы IIa (модель СТ-26 с алкилирующей терапией препаратом Цисплатин). Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 100 мкм. Преобладание областей дистрофически изменённых клеток над областями жизнеспособных клеток на гистологических изображениях на 5 и 7 дни; наблюдались области некроза ткани на 7 и 9 дни. На структурных ОКТ изображениях области и границы гистологических структур визуально не определялись. Морфологические структуры характеризовались следующими значениями модуля упругости на ОКЭ изображениях: жизнеспособные опухолевые клетки – ~600-900 кПа, дистрофически изменённые клетки – ~400-600 кПа, отёк ткани – ~200-400 кПа, и некроз ткани – ~100-200 кПа.

ОКЭ изображения опухолей группы терапии препаратом Цисплатин, полученные на 5 день наблюдения, характеризовались неоднородным распределением значений модуля упругости, по сравнению с контрольной группой. Детектируемые на ОКЭ изображениях области со средними значениями модуля упругости (~200-600 кПа) топографически соответствовали областям дистрофически измененных опухолевых клеток и отёка опухолевой ткани на гистологических изображениях (Рис. 36, нижняя панель изображений). На 7 день ОКЭ изображения отличались выраженной неоднородностью распределения значений модуля упругости. Обнаружены на ОКЭ изображениях: области средних значений модуля упругости (~400-600 кПа), топографически согласующиеся с областями дистрофически изменённых опухолевых клеток; области более низких значений модуля упругости (~200-400 кПа), топографически соответствующих областям отёка опухолевой ткани; и области очень низких значений модуля упругости (~100-200 кПа), топографически согласующихся с областями некроза опухолевой ткани. Неоднородные ОКЭ изображения, полученные на 9 день, характеризовались преобладанием областей низких значений модуля упругости (~100-200 кПа) над областями средних и высоких значений модуля упругости (~300-600 кПа). Обнаруженные области низких значений модуля упругости топографически согласовались с областями некроза опухолевой ткани на гистологических изображениях.

По результатам детального сопоставления ОКЭ изображений и гистологических изображений наглядно продемонстрировано, что неоднородное и гетерогенное распределение показателей модуля упругости на ОКЭ изображениях в топографически соотносится с гистологическими структурами, выделенными на гистологических изображениях. Такое соотношение было присуще и ранее исследованной опухолевой модели 4Т1. ОКЭ структурные изображения характеризовались медленно затухающим, однородным, средним по интенсивности сигналом; гистологические

структуры не имели визуально различимой границы на структурных ОКЭ изображениях.

Таким образом, на гистологических изображениях опухолей разных групп был обнаружен один и тот же набор гистологических структур, а именно: жизнеспособные опухолевые клетки, дистрофически изменённые опухолевые клетки, некроз и отёк опухолевой ткани; принципиально отличных и не описанных ранее гистологических структур опухолевой ткани, в сравнении с вышеизложенным изучением опухолевой модели 4T1, для модели СТ-26 выявлено не было.

Последующее сегментирование и определение корреляционной взаимосвязи результатов ОКЭ и морфологического исследования поможет ответить на вопрос о возможной универсальности метода ОКЭ для исследования гистологических структур опухолевых моделей.

Определение универсальности диапазонов значений модуля упругости гистологических структур опухолевых моделей

Данная часть работы была направлена на определение адекватности установленных диапазонов значений модуля упругости гистологических структур опухолевой модели 4T1 для модели СТ-26. Полученные границы и диапазоны значений модуля упругости каждой гистологической структуры опухолевой модели 4T1 будут применены к обработке и сегментации ОКЭ изображений опухолевой модели СТ-26. Согласно определённой корреляции значений площадей гистологических структур, полученных при гистологическом исследовании и методом ОКЭ сегментации, будет установлена возможная универсальность диапазонов значений модуля упругости гистологических структур, применяемая для экспериментальных опухолевых моделей солидного строения / гистиоидного типа.

На ОКЭ изображениях (Рис. 37а) отсутствуют чёткие границы между гистологическими структурами, обозначенные на гистологических изображениях (Рис. 37б). Однако сегментированные ОКЭ изображения (Рис.

37в) имеют высокий контраст и позволяют охарактеризовать топографию и границы наблюдаемых гистологических структур.

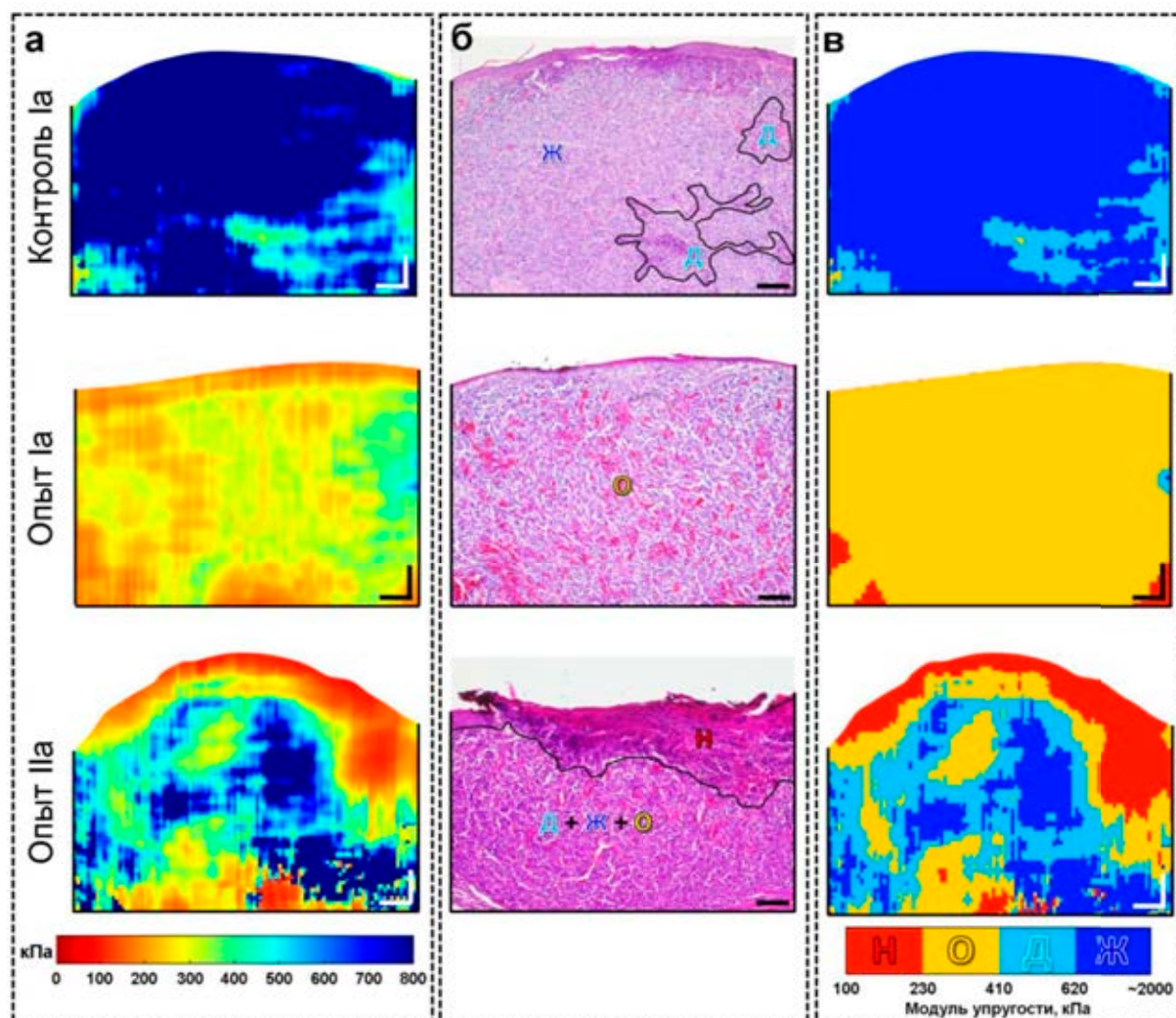


Рисунок 37. Пример сегментирования ОКЭ изображений опухолевой модели СТ-26 по определённым ранее для опухолевой модели 4T1 диапазонам значений модуля упругости микроструктур и их изменений: **а** – ОКЭ изображения; **б** – гистологические изображения; черные кривые – границы областей микроструктур и изменений опухоли; **в** – сегментированные ОКЭ изображения с чёткими границами гистологических структур. Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 100 мкм.

Для количественного подтверждения согласованности сегментированных ОКЭ и гистологических изображений было произведено сопоставление значений площадей гистологических структур опухолей СТ-26 с целью определения корреляционной связи. Значения площадей,

рассчитанные и выраженные в процентах от общей площади изображения, представлены в таблице 11.

Таблица 11. Данные ОКЭ мониторинга и гистологического исследования площадей, занимаемых гистологическими структурами опухолевой ткани модели СТ-26

Гистологическая структура		Жизнеспособные опухолевые клетки		Дистрофически изменённые клетки		Отёк опухолевой ткани		Некроз опухолевой ткани	
Метод определения площади микроструктуры		Гистология, %	ОКЭ, %	Гистология, %	ОКЭ, %	Гистология, %	ОКЭ, %	Гистология, %	ОКЭ, %
Контроль Ia	5 день	92	81	8	16	0	3	0	0
		95	90	5	10	0	0	0	0
		92	96	8	4	0	0	0	0
	7 день	85	80	15	20	0	0	0	0
		90	82	10	18	0	0	0	0
		86	83	12	17	2	0	0	0
	9 день	68	67	22	28	10	5	0	0
		82	77	13	20	5	0	0	3
		66	81	27	14	7	5	0	0
Опыт Ia	5 день	2	3	8	12	90	85	0	0
		13	12	0	2	84	86	3	0
		10	13	5	5	77	80	8	2
	7 день	3	0	7	11	85	82	5	7
		0	0	12	24	80	73	8	3
		0	0	12	11	75	82	13	7
	9 день	0	8	6	4	80	77	14	11
		0	0	15	15	65	72	20	13
		0	0	18	7	54	60	28	33
Опыт IIa	5 день	49	55	40	38	7	5	4	2
		33	40	54	50	5	0	8	10
		49	35	36	40	1	10	14	15
	7 день	24	39	39	40	25	11	12	10
		19	11	60	63	5	11	16	15
		12	9	56	53	10	13	22	25
	9 день	2	9	50	40	5	7	43	44
		0	0	24	12	2	8	74	80
		0	0	27	36	15	13	58	51
Корреляция (r) по Пирсону		0,98		0,93		0,99		0,98	

Также, было проведено сравнение значений площадей гистологических структур опухолевой ткани, полученных методом ОКЭ и гистологическим исследованием. Результаты сравнения приведены на рисунке 38.

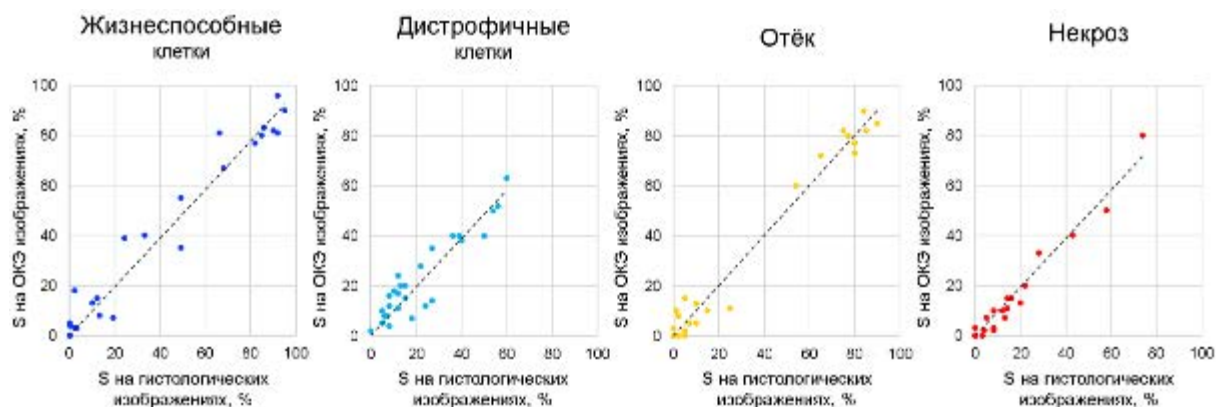


Рисунок 38. Диаграммы взаимосвязи значений площадей гистологических структур моделей опухолей СТ-26, определённых методом ОКЭ и гистологическим исследованием.

Показана взаимосвязь между значениями занимаемой площади каждой гистологической структуры опухолевой ткани, зафиксированной на гистологических и ОКЭ изображениях модели СТ-26 (Рис. 38). В каждую статистическую группу были взяты все 27 пар гистологических и ОКЭ изображений. Получена сильная и прямая корреляция – определены коэффициенты корреляции по Пирсону: для жизнеспособных опухолевых клеток $r = 0,98$; для дистрофически изменённых опухолевых клеток $r = 0,93$; для отека опухолевой ткани $r = 0,99$; и для некроза опухолевой ткани $r = 0,98$ ($p < 0,001$). По полученным результатам можно сделать вывод об адекватности установленных диапазонов значений модуля упругости гистологических структур для модели СТ-26 и универсальности таких диапазонов для опухолевых моделей гистиоидного типа с внутрикожной локализацией на поверхности уха в целом (данные результаты опубликованы в издании *Biomedical Optics Express* [244]).

Определение степени ответа экспериментальной опухоли на терапию методом оптической когерентной эластографии

Следующим шагом было проведено исследование возможности определения степени лечебного патоморфоза опухолевой модели согласно оценке упругих свойств морфологических компонентов ткани. Для этой цели была выбрана Кельнская система классификации регрессии, учитывающая количество наблюдаемых жизнеспособных опухолевых клеток [7]. Были проанализированы 36 опухолей животных, которые получали лечение (Опытные группы I, II, Ia и IIa). Порогом отсечения при статистическом анализе стали пороговые значения площадей жизнеспособных опухолевых клеток: для 1 степени – более 50% площади опухоли составляют жизнеспособные клетки; для 2 степени – от 11 до 50% площади опухоли составляют жизнеспособные клетки; для 3 степени – до 10% площади опухоли составляют жизнеспособные клетки; для 4 степени – полное отсутствие жизнеспособных опухолевых клеток. Были рассчитаны стандартные диагностические параметры (Таб. 12). В наших экспериментах опухолей с первой степенью патоморфоза не обнаружено. Получены значения диагностической точности способа определения ответа опухоли на терапию по упругим свойствам опухолевых клеток: 94,4% для 2 степени патоморфоза, 83,3% – для 3 степени, и 88,9% – для 4 степени. Проведенный ROC-анализ показал высокую прогностическую ценность по данным определения площади под кривой (Рис. 39): более высокую для 2 и 4 степеней патоморфоза и несколько ниже — для 3 степени, что, вероятно, связано с узким заданным диапазоном критерия данной степени патоморфоза (0-10%). Расчёт стандартных диагностических параметров подтвердил возможность определение степени ответа опухоли на лечение (согласно Кельнской системе классификации регрессии) по значениям модуля упругости опухолевых клеток методом ОКЭ с диагностической точностью 94–83–89% для 2–3–4 степеней лечебного патоморфоза.

Таблица 12. Диагностическая значимость способа определения степени ответа опухоли на лечение (согласно Кельнской системе классификации регрессии) по значениям модуля упругости опухолевых клеток методом ОКЭ

Степень лечебного патоморфоза	Чувствительность, %	Специфичность, %	Диагностическая точность, %
2 степень	95	93,8	94,4
3 степень	71,4	86,2	83,3
4 степень	66,7	96,3	88,9

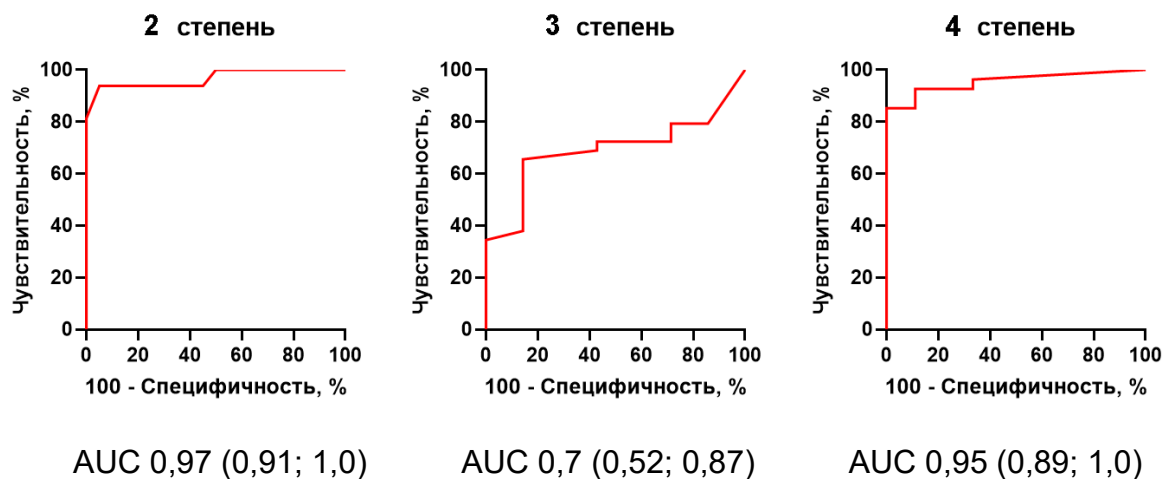


Рисунок 39. ROC-кривые для 2, 3 и 4 степеней лечебного патоморфоза согласно Кельнской системе классификации регрессии; AUC — площадь под кривой; в скобках – AUCmin и AUCmax.

Таким образом, на этапе *in vivo* исследований на экспериментальных опухолях животных были разработаны подходы к оценке упругих свойств отдельных гистологических структур, которые затем были применены для *ex vivo* изучения послеоперационных образцов опухолевой ткани пациентов.

3.2 *Ex vivo* исследование упругости микроструктур образцов опухолей человека методом оптической когерентной эластографии

На втором этапе работы были определены возможности ОКЭ согласно различиям в значениях модуля упругости визуализации различных морфологических микроструктур и изменений опухолей человека, в том числе – которые подвергались терапевтическому воздействию. Это поможет оценить возможности визуализации более сложно организованных тканей, и ответить на вопрос об эффективности применения ОКЭ для оценки упругости патоморфологических микроструктур опухолевых тканей человека.

Данный этап включал в себя изучение упругости микроструктур и изменений тканей послеоперационных образцов пациентов методом ОКЭ. Были исследованы образцы РМЖ от пациентов, получавших и не получавших неoadъювантную терапию (НАХТ), и образцы КР от пациентов, не получавших НАХТ.

3.2.1 Визуализация микроструктуры рака молочной железы

В результате исследования 10 послеоперационных образцов РМЖ от пациентов, которым не проводилась терапия, были получены гистологические изображения, структурные ОКТ и ОКЭ изображения, которые подверглись прицельному сопоставлению в целях определения характерных оптических и упругих критериев и особенностей наблюдаемых микроструктур ткани.

По результатам морфологического исследования образцов *умеренно- и низкодифференцированной аденокарциномы (Grade II-III) молочной железы* обнаружены области жировой ткани молочной железы, области жизнеспособных опухолевых клеток и области опухолевой стромы. На гистологических срезах преобладали области жизнеспособных опухолевых клеток – от 40 до 95% площади гистологического изображения (Рис. 40-41, гистологические изображения); опухолевая строма занимала 0-25%

площади гистологических изображений; на 4 образцах наблюдались области жировой ткани молочной железы, размеры которых достигали 15% площади гистологического изображения.

На структурных ОКТ изображениях визуально наблюдалось снижение глубины и интенсивности сигнала от областей жизнеспособных опухолевых клеток, в сравнении с сигналом от областей стромы опухолевой ткани (Рис. 40-41, ОКТ изображения). Жировая ткань отличалась характерным видом сигнала (ячеистая структура), позволяющим визуально дифференцировать её от других микроструктур.

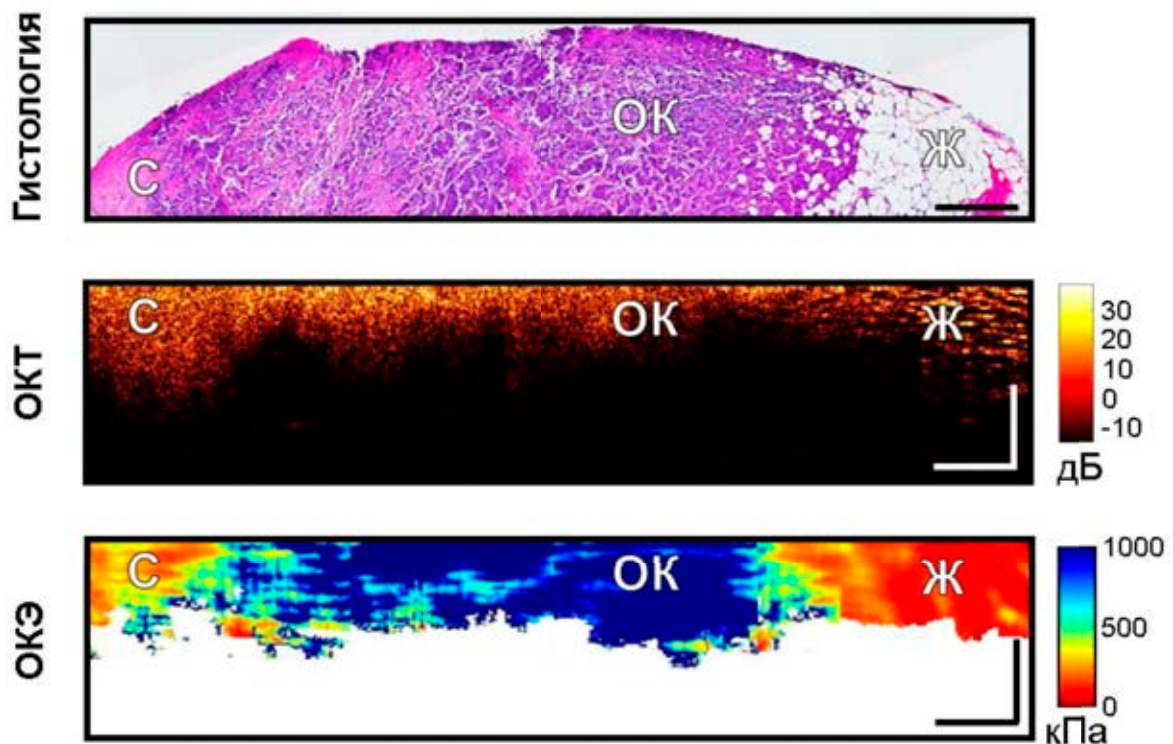


Рисунок 40. Репрезентативный пример исследования послеоперационного образца от пациентки Д. 72 года, которой лекарственная терапия не проводилась. Представлены результаты гистологического исследования, структурное ОКТ и ОКЭ (без демонстрации калибровочного слоя силикона) изображения; представленные панорамные ОКТ и ОКЭ изображения сформировано из 3-5 (в зависимости от размеров образца) последовательных ОКТ или ОКЭ изображений; Ж – области жировой ткани, ОК – области жизнеспособных опухолевых клеток, С – области стромы опухоли. Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 0,5 мм.

Всего ОКЭ анализу подверглись 10 образцов ткани РМЖ пациентов, на которых было проанализировано 8 областей, соответствующих жировой ткани, 14 областей, соответствующих жизнеспособным опухолевым клеткам, и 9 областей, соответствующих опухолевой строме. На ОКЭ изображениях области, топографически соответствующие областями жировой ткани, характеризовались низкими значениями модуля упругости – от 1 до 90 кПа, со средним значением модуля упругости 52 ± 13 кПа для 8 изучаемых областей (Рис. 40-41, ОКЭ изображения). Области, топографически соответствующие областям жизнеспособных опухолевых клеток, характеризовались высокими значениями модуля упругости – от 420 до 2000 кПа, со средним значением модуля упругости 849 ± 113 кПа для 14 изучаемых областей.

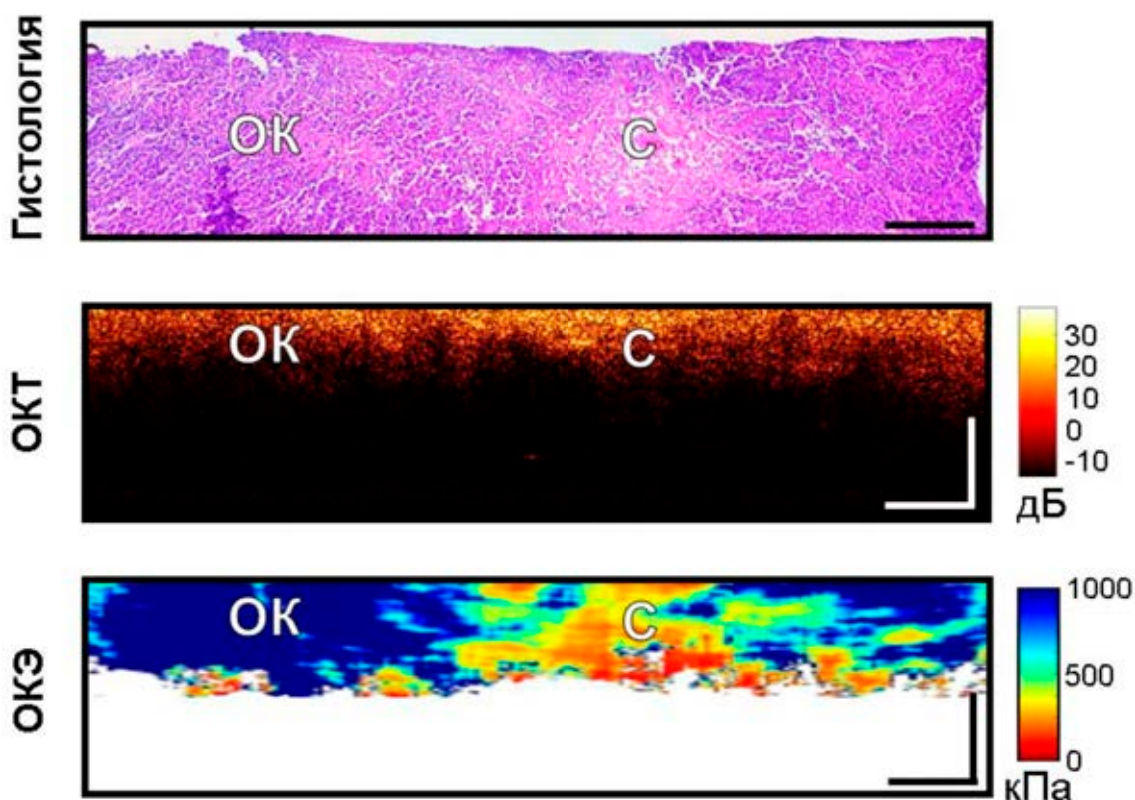


Рисунок 41. Репрезентативный пример исследования послеоперационного образца от пациентки И. 65 лет, которой не проводилась лекарственная терапия. Данный пример хорошо иллюстрирует стромальный компонент опухоли. Представлены результаты гистологического исследования, структурное ОКТ и ОКЭ (без демонстрации калибровочного слоя силикона) изображения;

представленные панорамные ОКТ и ОКЭ изображения сформировано из 3-5 (в зависимости от размеров образца) последовательных ОКТ или ОКЭ изображений; ОК – области жизнеспособных опухолевых клеток, С – области стромы опухоли. Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 0,5 мм.

Области, топографически соответствующие областям опухолевой стромы, характеризовались промежуточными значениями модуля упругости – от 70 до 460 кПа, со средним значением модуля упругости 260 ± 47 кПа для 9 изучаемых областей [190]. Средние значения модуля упругости каждой микроструктуры статистически значимо отличались друг от друга ($p < 0,001$).

По результатам визуализации микроструктур РМЖ в изученных образцах определены области жировой ткани, жизнеспособных опухолевых клеток и опухолевой стромы. Жировая ткань характеризовалась визуально различимой структурой на ОКТ изображениях, тогда как сигнал от жизнеспособных опухолевых клеток слабо отличался от сигнала опухолевой стромы – незначительное снижение глубины и интенсивности. На ОКЭ изображениях контраст различных микроструктур по модулю упругости очевиден. Определены средние значения модуля упругости каждой микроструктуры, которые статистически значимо отличались друг от друга ($p < 0,001$).

3.2.2 Визуализация патоморфологических изменений рака молочной железы после неoadъювантной химиотерапии. Оценка ответа опухоли на терапию

По результатам морфологического исследования 10 образцов умеренно- и низкодифференцированной аденокарциномы (*Grade II-III*) молочной железы от пациентов, проходивших курсы НАХТ, наряду с микроструктурами, характерными для интактных образцов РМЖ, на 3 образцах были обнаружены области некроза опухолевой ткани (Рис. 42,

гистологическое изображение). Размеры таких областей достигали 20% площади гистологического изображения. Всего было обнаружено и подверглись анализу на ОКЭ изображениях 5 областей, соответствующих некрозу опухолевой ткани.

Области некроза на структурных ОКТ изображениях визуально не отличались от жизнеспособных опухолевых клеток (по глубине и интенсивности сигнала – рис. 42, ОКТ изображение).

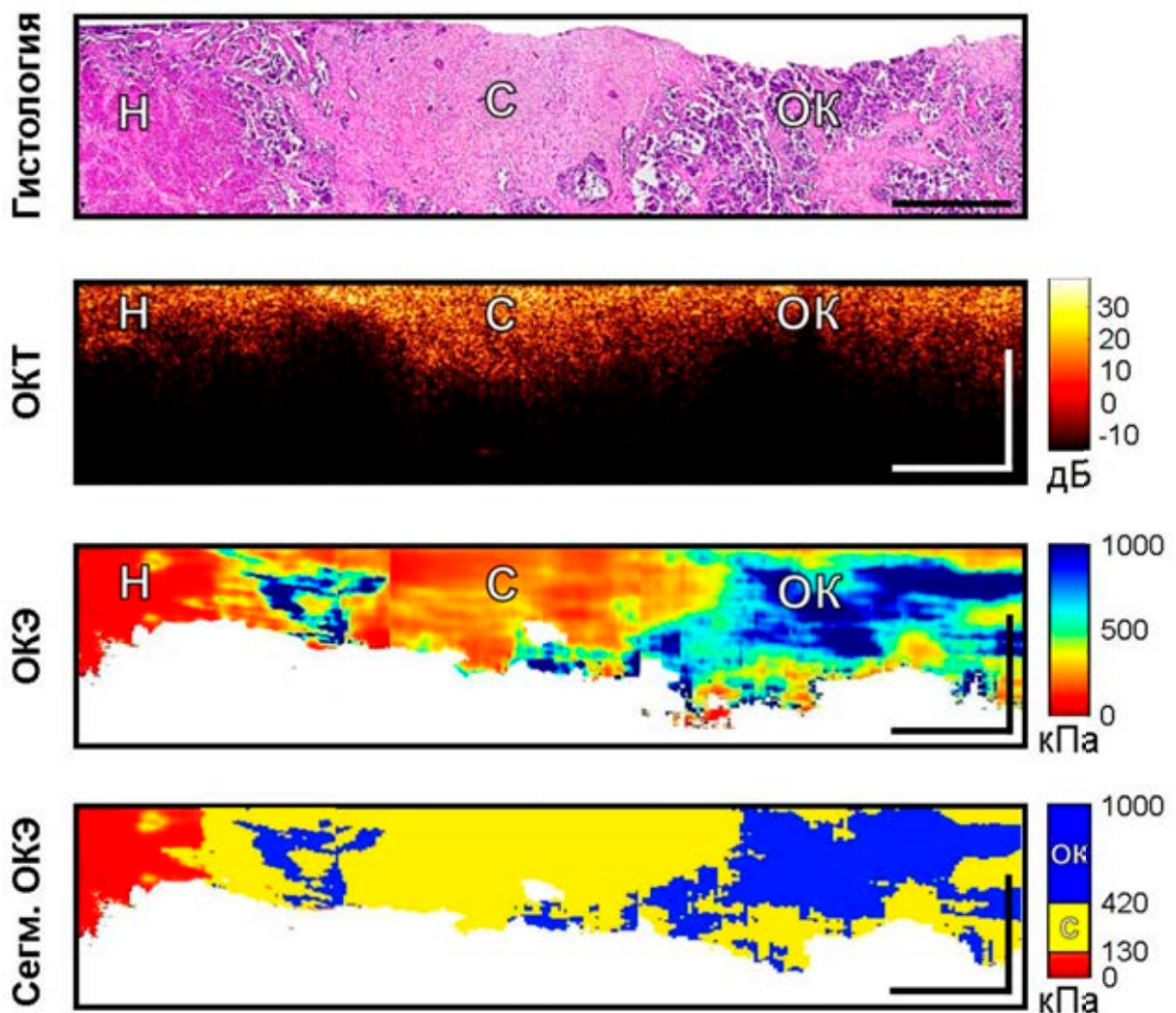


Рисунок 42. Репрезентативный пример исследования послеоперационного образца от пациентки С. 68 лет, которой проводились курсы НАХТ. Представлены результаты гистологического исследования, структурное ОКТ, ОКЭ и сегментированное ОКЭ (без демонстрации калибровочного слоя силикона) изображения; представленные панорамные ОКТ, ОКЭ и сегментированное ОКЭ изображения сформировано из 3-5 (в зависимости от размеров образца) последовательных ОКТ или ОКЭ

изображений; ОК – области жизнеспособных опухолевых клеток, С – области стромы опухоли; Н – области некроза опухолевой ткани. Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 0,5 мм.

На ОКЭ изображениях области, топографически соответствующие областями некроза опухолевой ткани, характеризовались низкими значениями модуля упругости – от 40 до 200 кПа, со средним значением 81 ± 19 кПа для 5 изучаемых областей (Рис. 42, ОКЭ изображение). Близкие значения были установлены для некроза опухолевой ткани в эксперименте на модельных опухолях РМЖ 4Т1 и КР СТ-26 (см. пункты 3.1.2 и 3.1.3).

По результатам исследования послеоперационных образцов РМЖ от пациенток, которым проводились курсы НАХТ, при морфологическом исследовании обнаружены области некроза опухолевой ткани, не наблюдаемые при исследовании послеоперационных образцов интактных опухолей. На структурных ОКТ изображениях такие области не имели характерную визуально различимую структуру по сравнению со структурой опухолевой ткани. По результатам ОКЭ исследования были определены диапазон значений модуля упругости и среднее значение для некроза опухолевой ткани – 40-200 кПа и 81 ± 19 кПа. Статистически значимых различий в модуле упругости жировой ткани (52 ± 13 кПа) и некроза не обнаружено. Однако выявлены легко читаемые визуальные признаки, отличающие на структурных ОКТ изображениях эти два вида ткани – жировая ткань имеет отчетливую зернистую текстуру, в то время как очаги некротической ткани представлены однородным, лишенным структуры ОКТ-изображениями.

Оценка ответа опухоли молочной железы на терапию методом оптической когерентной эластографии

Для определения степени ответа опухоли на лечение на морфологическом уровне произведена предельно точная сегментация ОКЭ изображений образцов опухолей молочной железы пациентов (Рис. 42,

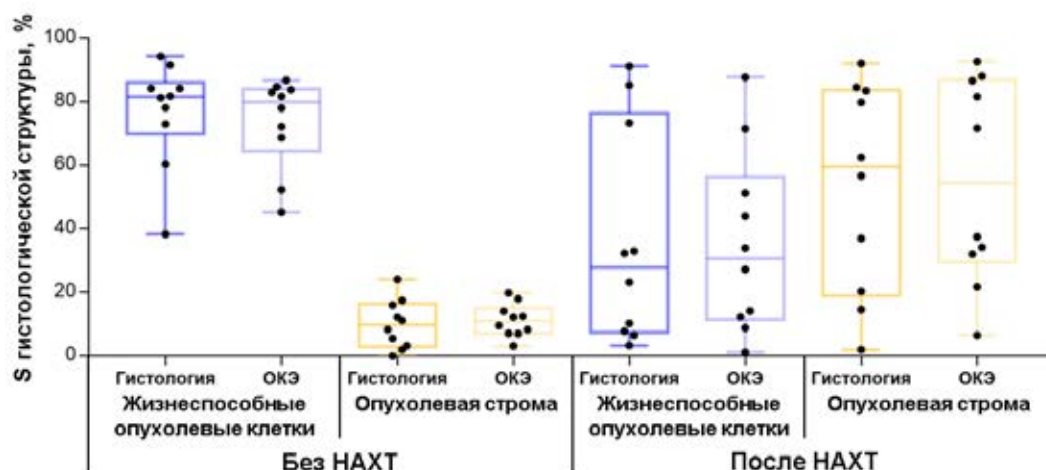
сегментированное ОКЭ изображение). Сегментации подверглись наиболее важные для оценки лечебного патоморфоза гистологические структуры (согласно общепризнанным системам оценки [8]) – жизнеспособные опухолевые клетки и опухолевая строма. Были установлены диапазоны значений модуля упругости таких гистологических структур для осуществления сегментации ОКЭ изображений. Границы диапазонов были установлены по максимальной наблюдаемой степени корреляционной зависимости площадей микроструктур, определённых на гистологических изображениях и по характерным диапазонам значений модуля упругости на ОКЭ изображениях для всех 20 образцов РМЖ (с целью повышения точности определения диапазонов). Были установлены диапазоны значений модуля упругости для последующей сегментации гистологических структур: жизнеспособных опухолевых клеток – 421-2000 кПа и опухолевой стромы – 130-420 кПа. Сегментация жировой ткани молочной железы и некроза опухолевой ткани была невозможна, ввиду значительного перекрытия диапазонов значений модуля упругости для этих структур.

Для подтверждения объективности установленных диапазонов было проведено сравнение площадей гистологических структур, рассчитанных согласно характерным значениям модуля упругости на ОКЭ изображениях и на гистологических изображениях для всех 20 образцов РМЖ (Таб. 13). Из полученных гистограмм (Рис. 43а) можно сделать вывод о высокой степени согласованности результатов определения площадей гистологических структур двумя способами. Затем была определена взаимосвязь между значениями занимаемой площади каждой гистологической структуры опухолевой ткани, зафиксированными на гистологических и ОКЭ изображениях (Рис. 43б). Получена сильная прямая корреляция по Пирсону ($r = 0,94-0,96$; $p < 0,001$). Наблюдаемая высокая корреляция результатов ОКЭ и гистологического сегментирования свидетельствует об объективности определённых диапазонов значений модуля упругости микроструктур

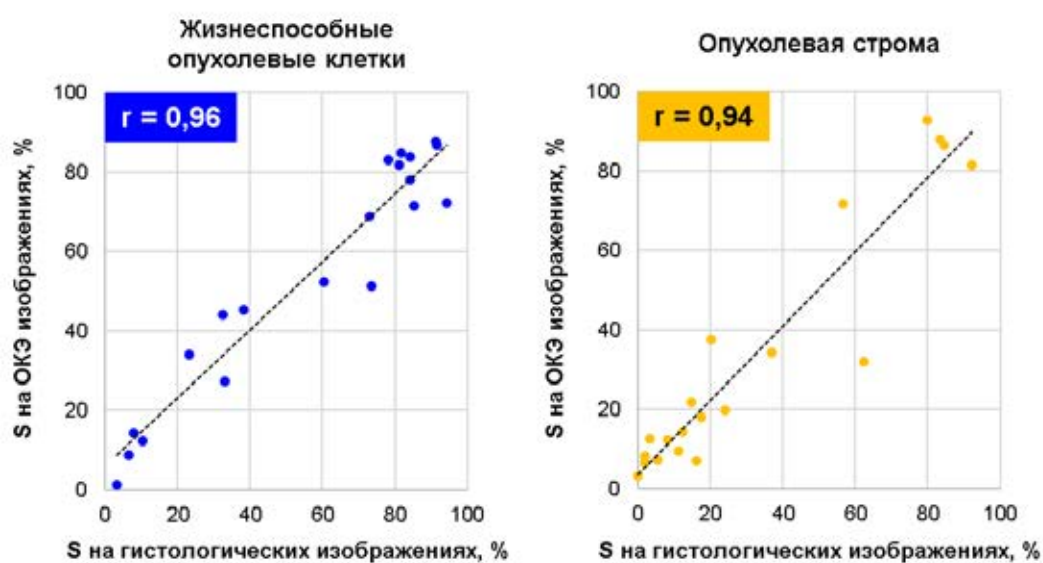
РМЖ. Опираясь на это, следующим шагом стала реализация такого способа для задач оценки ответа опухоли на терапию.

Таблица 13. Данные морфологического сегментирования гистологических и ОКЭ изображений ткани РМЖ пациентов

Гистологическая структура		Жизнеспособные опухолевые клетки		Опухолевая строма	
Метод определения площади микроструктуры		Гистология, %	ОКЭ, %	Гистология, %	ОКЭ, %
Без НАХТ	Образец 1	73	68,7	12,3	14,2
	Образец 2	81,8	84,8	16,1	7,1
	Образец 3	84,3	78	3,3	12,5
	Образец 4	91,6	86,8	8,4	12,3
	Образец 5	38,4	45,4	24,2	19,9
	Образец 6	94,4	72,2	5,6	7,2
	Образец 7	78,1	83	11,2	9,6
	Образец 8	81,3	81,7	2	8,4
	Образец 9	60,4	52,4	17,5	18
	Образец 10	84,3	83,9	0	3,2
После НАХТ	Образец 11	32,4	44,1	37	34,3
	Образец 12	10,3	12,4	84,6	86,6
	Образец 13	3,4	1,2	79,8	92,7
	Образец 14	73,4	51,3	20,4	37,5
	Образец 15	33	27,3	56,7	71,7
	Образец 16	91,2	87,7	2	6,6
	Образец 17	6,6	8,9	83,5	88
	Образец 18	7,9	14,3	92,1	81,6
	Образец 19	85,3	71,5	14,7	21,8
	Образец 20	23,3	34	62,5	32,1
Корреляция (r) по Пирсону		0,96		0,94	



а



б

Рисунок 43. Количественное сравнение площадей гистологических структур, полученных посредством гистологического сегментирования и сегментирования ОКЭ изображений согласно диапазонам модуля упругости компонентов ткани РМЖ: **а** – сравнения результатов гистологического и ОКЭ сегментирования; точками представлены абсолютные значения, диаграммы размаха – средние значения, стандартные отклонения и разброс значений; **б** – диаграммы взаимосвязи значений площадей гистологических структур, определённых сегментированием ОКЭ и гистологических изображений.

При морфометрической оценке гистологических срезов послеоперационных образцов пациентов с аденокарциномой молочной железы Grade II-III можно отметить преобладание площадей

жизнеспособных опухолевых клеток над стромой для опухолей пациентов без лечения и преобладание площадей стромы над жизнеспособными опухолевыми клетками для опухолей пациентов, которым проводились курсы НАХТ (Таб. 13 и Рис. 43а). Наблюдаемые тенденции изменения опухолевой структуры, где участки склероза (представленные стромой опухоли, заместившей некротические раковые клетки) граничат с областями сохранившихся жизнеспособных опухолевых клеток, согласуются с общепринятыми представлениями о неполном ответе опухоли на терапию [245, 246].

Для оценки ответа опухоли молочной железы на терапию была выбрана Кельнская классификация регрессии, как одна из используемых в клинической практике система, учитывающая количество сохранившихся жизнеспособных опухолевых клеток [8]. Аналогичная система была использована для оценки экспериментальных опухолей и позволяет выделить до 4 степеней опухолевого ответа (см. раздел 3.1.3). Так, проведенное гистологическое исследование 10 опухолей выявило 3 опухоли с I степенью ответа на терапию, 4 опухоли со II степенью и 3 опухоли с III степенью (Таб. 13 и Рис. 43а). В то время как методом ОКЭ на основе характерных значений модуля упругости тот же результат получен в 9 из 10 случаев. Допущенная ошибка связана с пограничным между I и II степенями значением показателя жизнеспособных опухолевых клеток у исследуемого образца. Таким образом, полученный результат подтверждает эффективность способа определения ответа опухоли на терапию по изучению модуля упругости методом ОКЭ.

3.2.3 Визуализация микроструктуры колоректального рака

Анализировались 17 послеоперационных образцов колоректального рака (КР) от пациентов с диагнозом выписных эпикризов – умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома без дополнительного уточнения (БДУ) (Grade II-III). После их повторного гистологического пересмотра

было выявлено 6 гетерогенных образцов, в которых на ряду с обширными безструктурными областями скоплений опухолевых клеток обнаружены: железистоподобные опухолевые структуры, соответствующие *высокодифференцированной (Grade I) аденокарциноме БДУ* (3 образца); крупные железы с широким просветом и некрозом внутри, соответствующие *крибриформной аденокарциноме* (1 образец); и широкие поля внеклеточного муцина, соответствующие *муцинозной аденокарциноме* (2 образца). В связи с различной морфологической картиной образцов задача «по определению значений модуля упругости микроструктур КР методом ОКЭ» была расширена до «определения возможностей метода ОКЭ в дифференцировке различных морфологических подтипов и степеней дифференцировки КР человека».

Первым этапом были рассмотрены 11 послеоперационных образцов КР, не имеющих признаков гетерогенности. Они составили группу исследования *умеренно- и низкодифференцированной (Grade II-III) аденокарциномы БДУ*. По результатам морфологического исследования обнаружены: 9 областей слизистой оболочки кишки и 15 областей опухолевых клеток, инфильтрированные лимфогистиоцитарными элементами (Рис. 44, гистологическое изображение).

На структурных ОКТ изображениях визуально наблюдалось небольшое снижение глубины и интенсивности сигнала от областей опухолевых клеток, в сравнении с сигналом от областей слизистой оболочки (Рис. 44, ОКТ изображение). На ОКЭ изображениях области, топографически соответствующие областям слизистой оболочки кишки, характеризовались низкими значениями модуля упругости – от 20 до 130 кПа, со средним значением модуля упругости 75 ± 6 кПа для 9 изучаемых областей (Рис. 44, ОКЭ изображение). Области ОКЭ изображений, топографически соответствующие областям опухолевых клеток, инфильтрированных лимфогистиоцитарными элементами, характеризовались высокими значениями модуля упругости – от 630 до

2000 кПа, со средним значением модуля упругости 907 ± 139 кПа для 15 изучаемых областей.

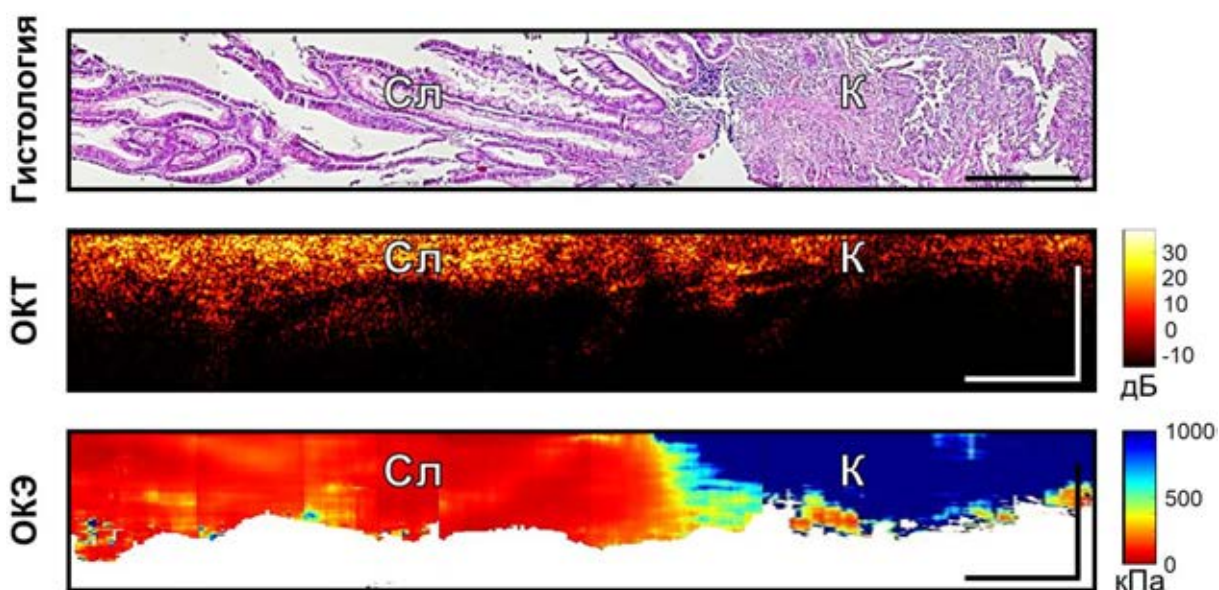


Рисунок 44. Результаты исследования послеоперационного *ex vivo* образца аденокарциномы БДУ Grade II-III толстой кишки, полученного от пациента К. 58 лет: гистологическое, структурное ОКТ и ОКЭ (без демонстрации калибровочного слоя силикона) изображения; представленные панорамные ОКТ и ОКЭ изображения сформировано из 3-5 (в зависимости от размеров образца) последовательных ОКТ или ОКЭ изображений; Сл – слизистая оболочка; К – опухолевые клетки, инфильтрированные лимфогистиоцитарными элементами. Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 0,5 мм.

При рассмотрении образцов, обладающих морфологической гетерогенностью, в исследование строго вовлекались только области, имеющие атипичную для умеренно- и низкодифференцированной аденокарциномы БДУ (Grade II-III) морфологическую картину. Были разделены на группы и исследованы: 3 образца аденокарциномы БДУ характеризующиеся высоко степенью дифференцировки (Grade I), а также 1 образец крибриформной аденокарциномы и 2 образец муцинозной аденокарциномы.

По результатам морфологического исследования трех послеоперационных образцов КР пациентов с диагнозами

высокодифференцированная аденокарцинома БДУ (Grade I) обнаружено неравномерное распределение областей железистоподобных опухолевых структур и областей инфильтрированной опухолевыми клетками стромы (Рис. 45, гистологическое изображение). Всего было проанализировано 7 областей, соответствующих железистоподобным опухолевым структурам, и 5 областей, соответствующих инфильтрированной опухолевыми клетками строме. На структурных ОКТ изображениях области обнаруженных микроструктур визуально неразличимы (Рис. 45, ОКТ изображение). Тогда как, на ОКЭ изображениях области, топографически соответствующие областям железистоподобных опухолевых структур, характеризовались высокими значениями модуля упругости – от 470 до 1420 кПа, со средним значением модуля упругости 631 ± 84 кПа для 7 изучаемых областей (Рис. 45, ОКЭ изображение). Области ОКЭ изображений, топографически соответствующие областям инфильтрированной опухолевыми клетками стромы, характеризовались средними по величине значениями модуля упругости – от 290 до 510 кПа, со средним значением модуля упругости 419 ± 21 кПа для 5 изучаемых областей.

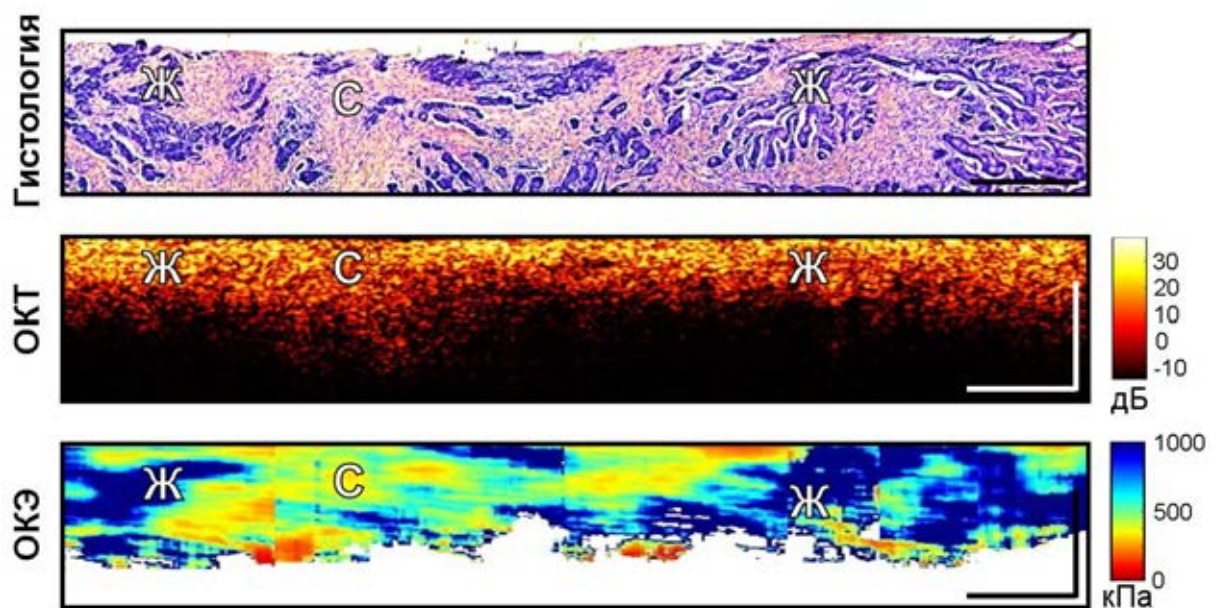


Рисунок 45. Результаты исследования послеоперационного образца аденокарциномы БДУ Grade I толстой кишки, полученного от пациента Н. 82 года: гистологическое, структурное ОКТ и ОКЭ (без демонстрации

калибровочного слоя силикона) изображения; представленные панорамные ОКТ и ОКЭ изображения сформировано из 3-5 (в зависимости от размеров образца) последовательных ОКТ или ОКЭ изображений; Ж – железистоподобные опухолевые структуры, С – опухолевая строма. Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 0,5 мм.

По результатам морфологического исследования послеоперационного образца КР пациента с диагнозом *крибриформная аденокарцинома* обнаружено преобладание областей умеренно инфильтрированной лимфогистиоцитарными элементами и опухолевыми клетками стромы с присутствием в ней крупных крибриформных желез с широким просветом и некрозом внутри (Рис. 46а, гистологическое изображение). Всего было проанализировано 7 областей, соответствующих железистоподобным опухолевым структурам, 3 области, соответствующие опухолевой строме. На структурных ОКТ изображениях области обнаруженных микроструктур визуально неразличимы (Рис. 46а, ОКТ изображение). Однако, небольшие области исчезновения полезного сигнала (или «теней») (Рис. 46а, ОКТ изображение – зелёные стрелки) предположительно могли были связаны с широким просветом крибриформных опухолевых желез. На ОКЭ изображении области, топографически соответствующие областями крибриформных опухолевых желез, характеризовались высокими значениями модуля упругости, аналогичными значениям железистоподобных опухолевых структур высокодифференцированной аденокарциномы Grade I – от 470 до 1420 кПа, со средним значением модуля упругости 631 ± 84 кПа для 7 изучаемых областей (Рис. 46а, ОКЭ изображение). Характерной чертой таких крибриформных желез на ОКЭ изображении являлось исчезновение полезного сигнала внутри областей высоких значений модуля упругости ввиду того, что некроз в просвете желез не лоцировался (Рис. 46б), вследствие свободного расположения некротических масс внутри просвета железы и невозможности получению положительного ОКТ-сигнала от постоянно перемещающихся в

пространстве структур. Области на ОКЭ изображении, топографически соответствующие областям опухолевой стромы, характеризовались низкими значениями модуля упругости – от 110 до 310 кПа, со средним значением модуля упругости 216 ± 24 кПа для 3 изучаемых областей.

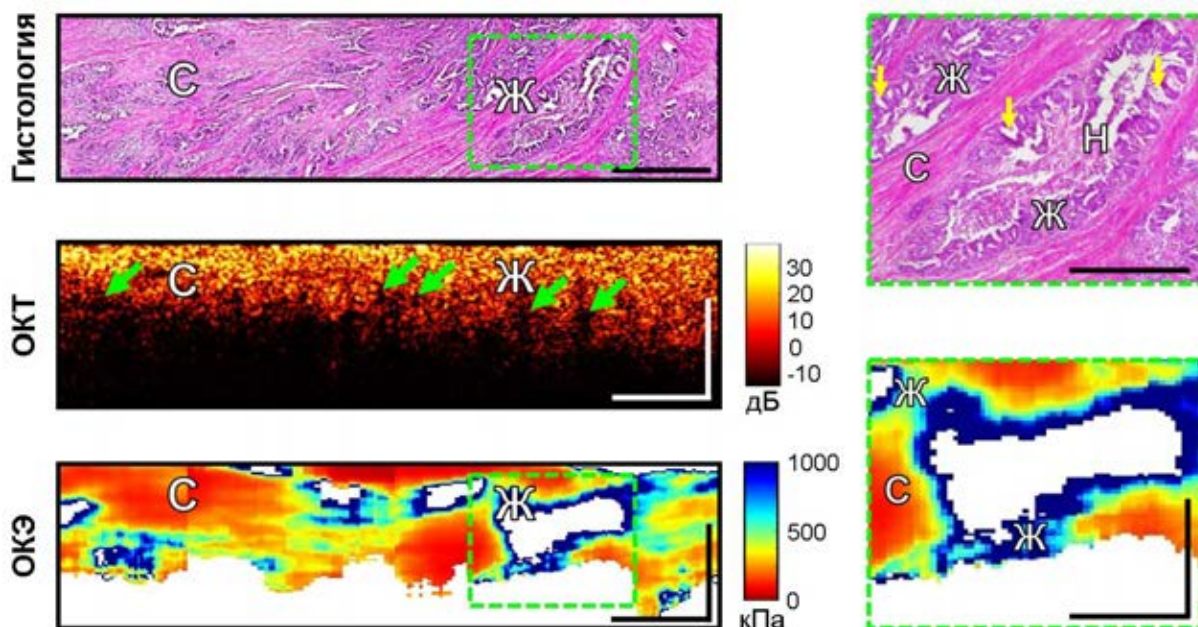


Рисунок 46. а – Результаты исследования послеоперационного образца крибриформной аденокарциномы толстой кишки, полученного от пациента Г. 60 лет: гистологическое, структурное ОКТ и ОКЭ (без демонстрации калибровочного слоя силикона) изображения; представленные панорамные ОКТ и ОКЭ изображения сформировано из 3-5 (в зависимости от размеров образца) последовательных ОКТ или ОКЭ изображений; зелёными стрелками обозначены области исчезновения полезного сигнала, предположительно связанные с широким просветом крибриформных опухолевых желез; Ж – крибриформные опухолевые железы, С – опухолевая строма; размер бара по вертикали и горизонтали на изображениях – 0,5 мм; **б** – Увеличенные гистологическое и ОКЭ изображения крибриформной опухолевой железы с широким просветом и исчезновением полезного сигнала внутри просвета; размер бара по вертикали и горизонтали на изображениях – 0,3 мм.

По результатам морфологического исследования двух послеоперационных образцов КР пациентов с диагнозом *муцинозная аденокарцинома* обнаружено неравномерное распределение областей опухолевой стромы и областей обильных внеклеточных полей муцина (Рис.

47, гистологическое изображение). Всего было проанализировано 14 областей, соответствующих опухолевой строме, и 11 областей, соответствующих полям муцина. На структурных ОКТ изображениях области, топографически соответствующие областям внеклеточных полей муцина, характеризовались исчезновением полезного сигнала (в силу отсутствия в муцинозной жидкости достаточного числа рассеивателей), тогда как области, топографически соответствующие областям опухолевой стромы, характеризовались интенсивным и глубоким сигналом (Рис. 47, ОКТ изображение).

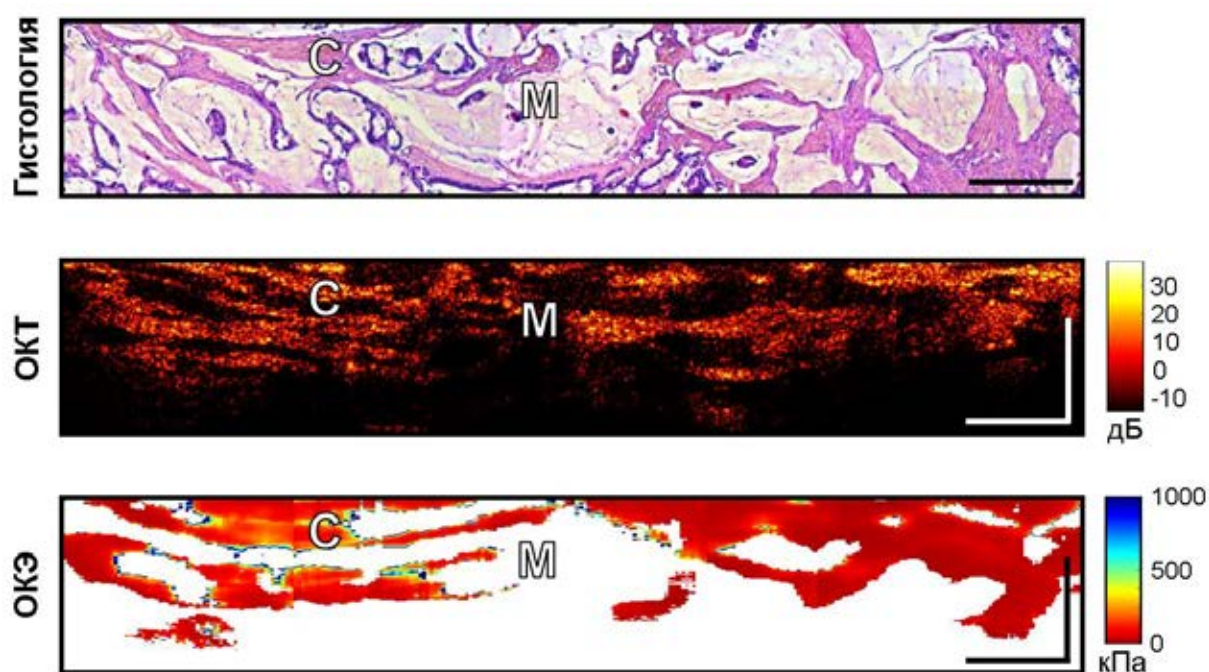


Рисунок 47. Результаты исследования послеоперационного образца муцинозной аденокарциномы толстой кишки, полученного от пациента Н. 59 лет: гистологическое, структурное ОКТ и ОКЭ (без демонстрации калибровочного слоя силикона) изображения; представленные панорамные ОКТ и ОКЭ изображения сформировано из 3-5 (в зависимости от размеров образца) последовательных ОКТ или ОКЭ изображений; М – внеклеточные поля муцина; С – опухолевая строма. Размер бара по вертикали и горизонтали на всех изображениях – 0,5 мм.

На ОКЭ изображении области, топографически соответствующие областями внеклеточных полей муцина, также характеризовались

исчезновением полезного сигнала (Рис. 47, ОКЭ изображение). Однако эти поля без сигнала отличались значительной площадью (более 50% площади изображения) и отсутствием «обрамления» с высокой упругостью, характерного для областей крибриформных опухолевых желез. Области на ОКЭ изображении, топографически соответствующие областям опухолевой стромы, характеризовались низкими значениями модуля упругости (для 14 изучаемых областей) – аналогичными значениям модуля упругости умеренно инфильтрированной стромы крибриформной аденокарциномы.

В результате можно сказать, что были получены ОКЭ изображения различных морфологических подтипов КР и степеней дифференцировки аденокарциномы БДУ, определены их характерные признаки (Таб. 14).

Таблица 14. Сводная таблица характерных ОКЭ признаков изученных морфологических подтипов и степеней дифференцировки КР

Характерные ОКЭ признаки	Морфологические подтипы КР			
	Аденокарцинома БДУ		Крибриформная аденокарцинома	Муцинозная аденокарцинома
	Grade I	Grade II-III		
Неоднородность распределения модуля упругости	+	-	+	+
Наблюдаемые структуры	+	-	+	-
Значения модуля упругости <630 кПа	+	-	+	+
Значения модуля упругости >1420 кПа	-	+	-	-
Исчезновение полезного сигнала (менее чем 50% изображения)	-	-	+	-
Исчезновение полезного сигнала (более чем 50% изображения)	-	-	-	+

«+» – признак обнаружен; «-» – признак не обнаружен

Были выявлены возможности метода ОКЭ в дифференцировке различных морфологических подтипов и степеней дифференцировки КР пациентов [247, 248]. Согласно результатам, представленным в таблице 14, неоднородное распределение упругости не наблюдалось только в образцах умеренно- и низкодифференцированной аденокарциномы БДУ, которые также отличались присутствием очень высоких значений модуля упругости выше 1420 кПа и отсутствием средних и низких значений модуля упругости ниже 630 кПа. Структуры наблюдались на ОКЭ изображениях высокодифференцированной и крибриформной аденокарцином. Исчезновение полезного сигнала наблюдалось в ткани образцов крибриформной и муцинозной аденокарцином, причём, для муцинозной аденокарциномы такие области занимали более 50 % изображения.

Глава 4. Обсуждение результатов

В данной работе проведено исследование упругих свойств тканей опухолевых моделей животных и послеоперационных образцов пациентов методом оптической когерентной эластографии (ОКЭ). Перед нами стояли задачи определения возможностей визуализации методом ОКЭ вышеуказанных объектов и изучения упругих свойств гистологических структур опухолевых тканей и патоморфологических изменений, наблюдаемых после воздействия терапевтических агентов.

Применение стандартных методов оценки противоопухолевого эффекта (сравнение объёмов опухолей и коэффициентов торможения роста опухоли (ТРО)) показало, что препараты Бевацизумаб и Цисплатин оказывают заметное противоопухолевое действие на модели рака молочной железы (РМЖ) 4T1 и колоректального рака (КР) СТ-26. Об этом свидетельствуют наблюдаемые уже на 5 день после начала терапии статистически значимые различия ($p < 0,05$) объёма опухолей опытных групп, по сравнению с группами контроля. Результаты этой части работы представлены в наших публикациях [228, 244]. Стоит отметить, что к 12 дню эксперимента как для модели 4T1, так и для СТ-26 более высокой эффективностью (по оценке коэффициента ТРО) обладал Цисплатин ($72 \pm 8,4 \%$; $79,5 \pm 9 \%$); однако статистически значимых различий между значениями коэффициента ТРО для Цисплатина и Бевацизумаба (на 12 день – $60,1 \pm 4,4 \%$; $65,6 \pm 7 \%$) не получено. Динамика скорости роста опухолей 4T1 и СТ-26 под воздействиями Бевацизумаба и Цисплатина (Рис. 24) хорошо согласуются с результатами лечения мышинной плоскоклеточной карциномы SCC-VII, полученными другими авторами [227] – увеличение размеров опухолей более, чем в 2,5 раза после 9 дней мониторинга лечения.

По сравнению с классическим гистологическим исследованием, предложенный в данной работе способ изучения компонентов ткани по их упругим свойствам методом ОКЭ демонстрирует ряд преимуществ:

1. используется в качестве зондирующего излучения неповреждающий свет инфракрасного диапазона, что позволяет выделить метод как не нарушающий целостность исследуемой биоткани;
2. возможно проведение прижизненного наблюдения;
3. не требуется использования эндогенных агентов, реагентов и красителей.

Однако в сравнении с «золотым стандартом» гистологического исследования *серьёзным ограничением метода ОКЭ* можно считать:

1. его *разрешающая способность* (40-50 мкм) позволяет изучать ткань *на уровне небольших скоплений клеток*;
2. на данный момент развития технологии гистологическое исследование *более универсально* – для изучения морфологической картины различных биотканей требуется квалифицированный врач-морфолог и гистологическая лаборатория (стандарт для структуры клиники), тогда как для осуществления ОКЭ исследования необходимо: предварительные углублённые исследования упругих свойств конкретной биоткани, изучение особенностей проведения ОКЭ исследования биоткани, включающих разработку алгоритма исследования и параметров ОКЭ-детекции биоткани. Детальное описание преимуществ и ограничений использованного метода приведено в нашей работе [228].

Безусловным достоинством метода ОКЭ является его быстроедействие, работа в реальном времени. ОКЭ позволяет получать информацию об упругих свойствах исследуемой ткани в течение нескольких (2-3) минут [229]. Напротив, в классическом гистологическом исследовании время от забора материала до получения окрашенных гистологических срезов и интерпретации их морфологом составляет в среднем от 3 до 7 дней [66]. При этом важно отметить, что существуют клинические случаи, требующие интраоперационной срочной морфологической диагностики [20, 21]. Например, определение границ

резекции опухоли, установление гистогенеза новообразований и т.п. В таких случаях проводится срочное гистологическое исследование материалов биопсий с подготовкой криостатных срезов, характеризующееся возможностью получения гистологических изображений через 25-30 минут после забора материала. В течении этого времени пациент находится на операционном столе. Такая методика характеризуется быстрым замораживанием ткани, минуя этапы фиксации, гистологической проводки через спирты и парафинирования. Однако некоторые исследования указывают на значительный процент ложных результатов при использовании в клинической практике морфологического экспресс-анализа криостатных срезов [67, 68]. Такое наблюдение подтверждает актуальность разработки и *адаптации высокоразрешающего малоинвазивного экспресс-метода ОКЭ для изучения структур биоткани по их упругим свойствам на уровне, близком к гистологическому.*

ОКЭ в сравнении с ультразвуковой эластографией – компрессионной эластографией (соноэластографией) или эластографией сдвиговой волны, очевидно демонстрирует *преимущество метода ОКЭ* в его высоком разрешении, способном выделять небольшие группы клеток – 40-50 мкм (ОКЭ) против 100-500 мкм для УЗИ-эластографии [13].

Ограничениями метода ОКЭ в сравнении с УЗИ-эластографией является малая глубина исследования – проникновение инфракрасного излучения в ткани организма ограничивается затуханием сигнала в поверхностных слоях, следовательно, визуализация ткани на основе технологии оптической когерентной томографии ограничена 1-2 мм по глубине [249]. Ультразвуковая диагностика в среднем имеет глубину визуализации до 10 см, а коммерческие установки, оснащённые эластографической модальностью, способны получать картину упругости ткани на глубине 4-5 см. Кроме того, максимальное поле зрения для ОКЭ установок ограничено 15 мм, тогда как поле зрения эластографической модальности в УЗИ установках достигает 10 см [13].

Ввиду практического отсутствия в настоящий момент развития технологии ОКЭ эндоскопических и инвазивных-игольчатых зондов для проведения ОКЭ исследования, метод может быть актуален в качестве клинического *in vivo* инструмента диагностики структуры ткани только для:

- дерматологических, стоматологических и офтальмологической нозологий;
- применяться интраоперационно в открытом поле, но не способен претендовать на место клинического инструмента для диагностики внутренних органов человека на уровне целого организма.

Вышеописанные ограничения ОКЭ метода экспресс-диагностики упругих свойств ткани скорее демонстрируют его принадлежность к *ex vivo* технологиям микроскопии, нежели к широко используемым методам визуализации для диагностики структуры и функции биоткани.

В нашей работе впервые были описаны абсолютные значения модуля упругости гистологических структур опухолевых моделей 4T1 и СТ-26, наблюдаемых как при естественном росте опухоли, так и после воздействия лекарственными препаратами. Результаты детально представлены в опубликованных нами работах [243, 244]. Использовали препараты разнонаправленного действия: антиангиогенный препарат Бевацизумаб – моноклональное антитело специфически связывающее VEGF фактор и препятствующее быстрому росту новых сосудов опухоли, приводящее к десквамации эндотелиоцитов сосудистой стенки и угнетению неоангиогенеза [226], что в свою очередь вызывает ишемию опухолевых клеток и их гибель; и алкилирующий препарат Цисплатин – химическое соединение, при внутриклеточном гидролизе молекулы которой происходит отщепление атомов хлора и образуется положительно заряженный ион, который реагирует с нуклеофильными участками в биомакромолекулах опухолевой клетки, алкилирует нити ДНК, нарушает её синтез, вызывает необратимые дистрофические изменения клетки и приводит её к гибели [225]. Возникновение патоморфологических изменений в опухолевой ткани

после применения препаратов Бевацизумаб и Цисплатин представлен нами в виде схемы на рисунке 48.

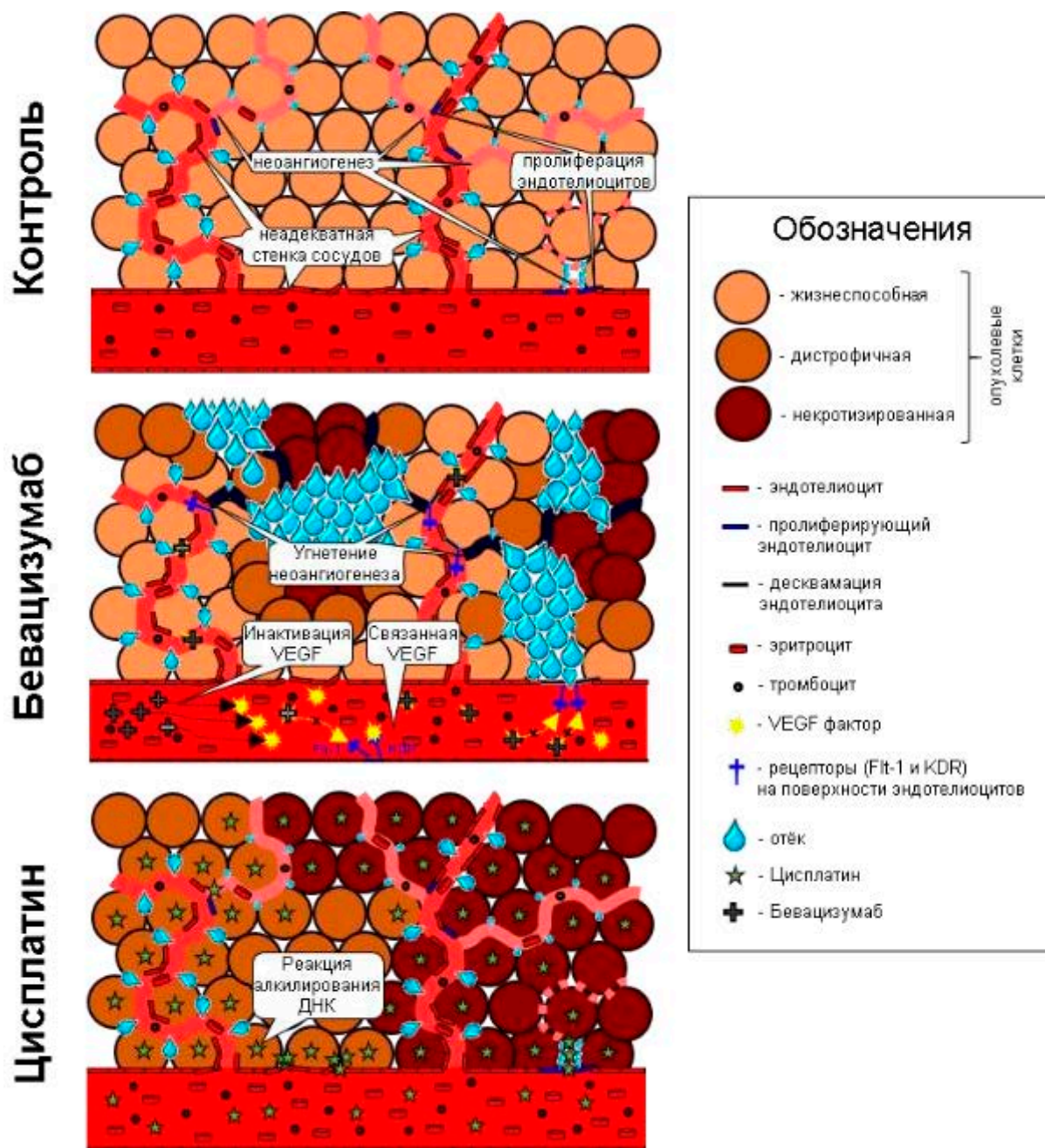


Рисунок 48. Схема возникновения патоморфологических изменений в опухолевой ткани после применения препаратов Бевацизумаб и Цисплатин.

В представленной работе показаны различные тенденции изменения гистологической картины опухолей после действия препаратов Бевацизумаб и Цисплатин от преобладания жизнеспособных опухолевых клеток (более выражено в контрольных группах) к преобладанию дистрофически

изменённых опухолевых клеток (более выражено в опытных группах терапии препаратом Цисплатин), отёка опухолевой ткани (более выражено в опытных группах терапии препаратом Бевацизумаб). На 7 и 9 дни наблюдения опухоли в опытных группах характеризовались появлением областей некроза опухолевой ткани. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в динамике роста, были установлены статистически значимые различия площадей некроза опухолевой ткани между опытными группами лечения препаратами Бевацизумаб и Цисплатин на 9 день:

- для модели 4Т1 – $18,3 \pm 6,2\%$ и $71,6 \pm 12,5\%$ ($p < 0,01$);
- для модели СТ-26 – $20,6 \pm 5,7\%$ и $58,3 \pm 12,7\%$ ($p < 0,01$).

Такое, впервые установленное наблюдение свидетельствует о способности метода ОКЭ производить высокочувствительное определение степени лечебного патоморфоза опухоли в эксперименте по упругим свойствам компонентов ткани.

Стоит отметить, что наши исследования демонстрируют высокую корреляцию ($r=0,93-0,99$) результатов ОКЭ и гистологического исследования в эксперименте, которые подробно описаны нами в работе [243]. Это свидетельствует об эффективности и возможности применения метода ОКЭ как инструмента определения степени лечебного патоморфоза согласно различным системам и градациям терапевтического ответа опухолей [8]. Также проведена работа по определению степени ответа опухоли на терапию согласно Кельнской системе классификации регрессии [7], где рассчитанные стандартные диагностические параметры продемонстрировали высокую чувствительность (до 95%), специфичность (до 96,3%) и диагностическую точность (до 94,4%) метода для определения степени лечебного патоморфоза согласно общепринятым классификациям [8]. Кроме того, установлена разрешающая способность, с которой метод ОКЭ дифференцирует небольшие скопления изменённых клеток (числом около 10) среди жизнеспособных опухолевых клеток (Рис. 29г). Такие наблюдения подчёркивают значительный потенциал применения метода на

этапах предварительных доклинических исследований эффективности новых противоопухолевых препаратов и терапевтических подходов.

Нами впервые в работе [190] продемонстрировано количественное определение методом ОКЭ абсолютных значений *модуля упругости гистологических структур РМЖ пациентов*, таких как – *опухолевые ткань* (849 ± 113 кПа), *опухолевая строма* (260 ± 47 кПа) и *жировая ткань* (52 ± 13 кПа). Такие данные позволяют сегментировать получаемые ОКЭ изображения на микроструктуры с высокой корреляцией полученного результата и гистологических данных ($r = 0,94-0,96$; $p < 0,001$), что в высокой степени облегчает их интерпретацию и повышает информативность метода для перспектив дальнейшего клинического применения.

Стоит отметить, что определённые методом ОКЭ средние значения модуля упругости разных гистологических структур были сопоставимы с результатами группы профессора *T.A. Krouskop (США)* 1998 года [162], полученные на гидравлической экспериментальной установке и тензометрическом датчике: для стромы были определены практически идентичные с нашими результатами значения (236 ± 60 кПа), тогда как для жировой (20 ± 6 кПа) и опухолевой (490 ± 112 кПа) тканей были определены значения, имеющие отличия от наших результатов в пределах одного порядка. Сопоставимость результатов подтверждает объективность метода ОКЭ в определении модуля упругости морфологических компонентов биотканей. Кроме того, сопоставимость результатов подтверждает тот факт, что упругие свойства биологических тканей обусловлены упругими свойствами ее компонентов и не зависят от способа измерения модуля упругости.

В работах группы профессора *B.F. Kennedy* из *Университета западной Австралии (г. Перт)* демонстрировались карты распределения модуля упругости репрезентативных примеров различных морфологических типов РМЖ, где также доказывалось, что различные гистологические структуры могут отличаться друг от друга степенью неоднородности или

различным распределением упругости [13, 18, 189]. Однако указанные результаты были качественными и не включали количественной оценки диапазонов модуля упругости наблюдаемых гистологических структур, что исключает возможность сегментации ОКЭ изображений и усложняет интерпретацию результатов для онколога.

В представленной работе впервые была предпринята попытка оценить *эффективность неoadъювантной химиотерапии* (проводимой согласно клиническим рекомендациям) *РМЖ пациентов методом ОКЭ*. В 3 из 10 изученных послеоперационных образцов обнаружены *участки некроза* опухолевой ткани, которые на ОКЭ изображениях характеризовались низкими значениями модуля упругости – 81 ± 19 кПа, статистически значимо отличающимися от более упругой *опухолевой стромы* – 260 ± 47 кПа ($p < 0,01$). Но статистически значимых различий в модуле упругости жировой ткани (52 ± 13 кПа) и некроза не обнаружено. Однако выявлены легко читаемые визуальные признаки, отличающие на структурных ОКТ изображениях эти два вида ткани – жировая ткань имеет отчетливую зернистую текстуру, в то время как очаги некротической ткани представлены однородным, лишенным структуры ОКТ-изображениями. При оценке ответа опухоли молочной железы на терапию согласно Кельнской классификация регрессии [8] методом ОКЭ на основе характерных значений модуля упругости в 90% случаев установлен верный результат, коррелирующий с гистологической оценкой. Это наблюдение позволяет говорить об эффективности метода ОКЭ для интраоперационной оценки опухолевого ответа на неoadъювантную терапию.

В работе, опубликованной в 2020 году [247], нами впервые была изучена и продемонстрирована способность ОКЭ детектировать гистологические структуры *колоректального рака пациентов*. Результаты наблюдения подтвердили гипотезу, что большинство злокачественных новообразований толстой кишки характеризуются более высокими значениями модуля упругости по сравнению с окружающей их

неизменённой тканью здоровой кишки [92, 97]. Низкодифференцированная опухолевая ткань имеет высокие значения модуля упругости – 907 ± 139 кПа, статистически значимо отличающиеся от менее упругой слизистой оболочки толстой кишки – 75 ± 6 кПа ($p < 0,001$). Полученный результата свидетельствует о возможности точного определения топографии и границ опухолевого узла в толстой кишке пациента, что может быть актуальным для прицельного забора биопсийного материала после проводимого лечения, однако является реализуемым лишь при условии разработки специализированного ОКЭ-эндоскопического зонда.

Гетерогенность исследуемых образцов кишки позволила впервые изучить характерные ОКЭ изображения для различных морфологических подтипов и степеней дифференцировки аденокарциномы толстой кишки пациентов [248]. В ряде работ доказано, что различные морфологические подтипы и степени дифференцировки аденокарциномы толстой кишки имеют характерные особенности протекания опухолевого процесса, локализации метастазирования и ответа на НАХТ [213]. Существуют убедительные статистические данные о прогнозе и лечении каждого морфологического подтипа и степени дифференцировки аденокарциномы толстой кишки [211]. Предоперационное нетравмирующее ткань эндоскопическое определение морфологического статуса КР, которое может быть проведено методом ОКЭ (при разработке специализированного зонда), позволит хирургу-онкологу определить прогноз, скорректировать хирургический и терапевтический подход, своевременно заподозрить и выявить очаги метастазирования. Дальнейшее изучение характерных особенностей различных морфологических подтипов и степеней дифференцировки аденокарциномы толстой кишки в будущем открывает методу ОКЭ широкие перспективы в эндоскопической высокоразрешающей диагностике опухолевых поражений толстой кишки человека, не повреждая ткань (по сравнению с биопсийным исследованием) и опережая послеоперационное гистологическое исследование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые изучены в сравнительном аспекте упругие свойства разных гистологических структур опухолевой ткани, в том числе после проведения противоопухолевой терапии. Исследование проводилось на животных опухолевых моделях рака молочной железы (РМЖ) 4Т1 (n=27) и колоректального рака (КР) СТ-26 (n=27). Для изучения особенностей патоморфологического ответа опухолей на разную по механизму действия терапию использовались антиангиогенный препарат Бевацизумаб и алкилирующий препарат Цисплатин. Также, было проведено исследование 37 послеоперационных образцов опухолевой ткани пациентов: 20 образцов РМЖ и 17 образцов КР. 10 образцов РМЖ были получены от пациентов, которым проводились курсы неoadъювантной химиотерапии. Механические свойства изучались путем анализа карт распределения абсолютных значений модуля упругости, полученных методом оптической когерентной эластографии (ОКЭ) с параллельным сопоставлением с соответствующими гистологическими препаратами.

Количественная обработка гистологических изображений в программе QuPath позволила объективно выделить границы обнаруженных гистологических структур и патоморфологических изменений и рассчитать площадь, занимаемую гистологическими структурами на изображении. Детальное сопоставление гистологических и ОКЭ изображений дало возможность определить диапазоны значений модуля упругости каждой гистологической структуры и патоморфологического изменения (жизнеспособных и дистрофически измененных опухолевых клеток, отёка и некроза опухолевой ткани), на основании которых были построены сегментированные ОКЭ изображения. По своей сути, сегментированные ОКЭ изображения являются, в некотором роде, аналогом гистологического изображения с тем лишь отличием, что в основе сегментированных ОКЭ изображений лежит разница в значениях модуля упругости между гистологическими структурами. Сопоставление площади гистологических

структур, выделенных на сегментированных ОКЭ и гистологических изображениях, показало высокую корреляцию между двумя методами.

По результатам предварительных исследований установлено, что терапевтическая эффективность применяемых препаратов по отношению к моделям 4T1 и СТ-26 является умеренной (ТРО = 60,1 – 79,5%); при этом эффективность препаратов была сопоставимой – статистически значимых различий в динамике роста опухолей, на которые оказывалось воздействие препаратами Бевацизумаб и Цисплатин, не обнаружено.

Впервые установлены диапазоны значений модуля упругости для следующих гистологических структур и патоморфологических изменений ткани опухолей 4T1:

- жизнеспособные опухолевые клетки – 621-2000 кПа (среднее значение модуля упругости 848 ± 164 кПа);
- дистрофически измененные опухолевые клетки – 411-620 кПа (среднее значение модуля упругости 524 ± 59 кПа);
- отёк опухолевой ткани – 231-410 кПа (среднее значение модуля упругости 335 ± 41 кПа);
- некроз опухолевой ткани – 101-230 кПа (среднее значение модуля упругости 161 ± 18 кПа).

Установлено, что средние значения модуля упругости каждой гистологической структуры статистически значимо отличались друг от друга ($p < 0,01$). Продемонстрирована высокая корреляция ($r = 0,93-0,99$; $p < 0,001$) результатов ОКЭ и гистологического исследования модели 4T1.

Впервые осуществлён прижизненный мониторинг изменения гистологической структуры опухолей под влиянием химиопрепаратов с различным механизмом действия. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в динамике роста опухолей под влиянием препаратов Бевацизумаб и Цисплатин, не повреждая ткань удалось проследить различные патоморфологические изменения, главным образом отражающие основные механизмы действия каждого противоопухолевого

терапевтического агента: для антиангиогенного Бевацизумаба – преобладание отёка, которое свидетельствовало о нарушении неоангиогенеза опухоли, что в свою очередь приводило к опосредованной ишемии и гибели опухолевых клеток; для алкилирующего Цисплатина – преобладание необратимых дистрофических изменений опухолевых клеток, которое свидетельствовало о непосредственном действии на них алкилирующего цитотоксического агента, что в последствии приводило к гибели этих клеток и образованию обширных областей некроза опухоли. Установлена высокая диагностическая точность (83–94%) определения степени ответа опухоли на лечение по значениям модуля упругости опухолевых клеток согласно Кёльнской системе классификации регрессии.

Определённые для модели 4T1 диапазоны значений модуля упругости гистологических структур были применены для сегментирования ОКЭ изображений опухолей модели СТ-26, по результатам чего также установлена высокая корреляционная связь ($r = 0,93–0,99$; $p < 0,001$) между площадями гистологических структур на ОКЭ и гистологических изображениях. Данное наблюдение свидетельствует об универсальности установленных диапазонов модуля упругости гистологических структур и патоморфологических изменений между различными опухолевыми моделями гистиоидного строения.

В нашей работе впервые были изучены абсолютные значения модуля упругости следующих гистологических структур ткани послеоперационных образцов РМЖ пациентов (с диагнозом – умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома *Grade II-III* молочной железы):

- самими низкими значениями характеризовалась жировая ткань – среднее значение модуля упругости 52 ± 13 кПа;
- наибольшие значения модуля упругости наблюдались для опухолевых клеток – среднее значение модуля упругости 849 ± 113 кПа;
- промежуточными значениями характеризовалась опухолевая строма – среднее значение модуля упругости 260 ± 47 кПа.

Средние значения модуля упругости каждой микроструктуры статистически значимо отличались друг от друга ($p < 0,001$).

Нами впервые осуществлено ОКЭ исследование послеоперационных образцов РМЖ пациентов (с диагнозом – *умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома Grade II-III молочной железы*), которым проводились курсы неoadъювантной химиотерапии согласно клиническим рекомендациям (4 цикла АС → 12 введений Р [210]), где на 3 из 10 образцах определялись области некроза опухолевой ткани. Установлены характерные значения модуля упругости *некроза опухолевой ткани РМЖ пациентов* – среднее значений модуля упругости 81 ± 19 кПа. На ОКЭ изображениях были сегментированы жизнеспособные опухолевые клетки (421-2000 кПа) и опухолевая строма (130-420 кПа). Определена взаимосвязь между значениями занимаемой площади каждой гистологической структуры опухолевой ткани, зафиксированными на гистологических и ОКЭ изображениях, где получена сильная прямая корреляция ($r = 0,94-0,96$; $p < 0,001$). Затем, на примере рака молочной железы также продемонстрирована возможность оценки степени ответа опухоли пациента на НАХТ с точностью 90% по процентному содержанию жизнеспособных опухолевых клеток, обнаруженных по характерным значениям модуля упругости.

Нами впервые проведены ОКЭ исследования послеоперационных образцов опухоли пациентов КР с диагнозом *больничной карты умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома без дополнительного уточнения (БДУ) Grade II-III*, где были выявлены характерные особенности ОКЭ изображений – однородное распределением очень высоких значений модуля упругости (среднее значений модуля упругости 907 ± 139 кПа) за счёт наблюдаемых плотно расположенных друг к другу опухолевых клеток. Кроме того, морфологом при проведении гистологического исследования была выявлена выраженная гетерогенность 6 из 17 исследуемых образцов, отдельные участки которых позволили выявить характерные особенности

других степеней дифференцировки и морфологических подтипов аденокарциномы толстой кишки:

- *высокодифференцированной аденокарциномы БДУ Grade I* – отличающейся неоднородным распределением областей высоких (631 ± 84 кПа) и средних (419 ± 21 кПа) значений модуля упругости, ввиду наблюдаемых железистоподобных опухолевых структур, расположенных среди инфильтрированной лимфогистиоцитарными элементами опухолевой стромы;
- *крибриформной аденокарциномы* – отличающейся неоднородным распределением областей высоких (631 ± 84 кПа) значений модуля упругости с потерей полезного сигнала, внутри и областей низких (216 ± 24 кПа) значений модуля упругости за счёт обнаруженных крибриформных опухолевых желез с широким просветом и некрозом внутри (не лоцирующимся при ОКЭ исследовании), наблюдаемых среди опухолевой стромы;
- *муцинозной аденокарциномы* – отличающейся неоднородным распределением областей низких (216 ± 24 кПа) значений модуля упругости и областей с потерей полезного сигнала за счёт наблюдаемых внеклеточных полей муцина, разделённых участками опухолевой стромы.

Таким образом, на основе полученных экспериментальных данных нами показана высокая эффективность и чувствительность метода ОКЭ в прижизненном малоинвазивном изучении упругих свойств гистологических структур ткани опухолевых моделей и патоморфологических изменений, возникающих в результате противоопухолевого терапевтического воздействия. Исходя из чего, ОКЭ в дальнейшем может зарекомендовать себя как высоко чувствительный и информативный метод оценки эффективности противоопухолевой терапии по упругим свойствам компонентов ткани.

Результаты изучения послеоперационных образцов подтверждают чувствительность метода ОКЭ в высокоразрешающем исследовании упругих свойств поверхностных гистологических структур тканей человека. Дальнейшее развитие технологии и разработка эндоскопических и игольчатых зондов для проведения оптической когерентной эластографии в труднодоступных локализациях позволят внедрить метод в клиническую практику для предоперационного изучения гистологической структуры ткани, а также для оценки эффективности производимой терапии опухоли.

Предложенная новая технология прижизненной оценки микроструктуры опухолевой ткани в эксперименте (патент [250]), может быть применена для нетравмирующего ткань экспресс-контроля эффективности новых лекарственных препаратов и методов терапии.

Основные результаты работы могут быть включены в соответствующие разделы спецкурсов и лекций курса по биомедицине и биофизике.

Полученные в нашей работе результаты могут стать основой для проведения дальнейших исследований по изучению диапазонов модуля упругости различных гистологических структур тканей организма человека, что в свою очередь позволит методу ОКЭ расширить спектр возможностей визуализации различных тканей организма человека и найти актуальные «точки» применения новой высокоразрешающей малоинвазивной технологии.

ВЫВОДЫ

1. На основе метода ОКЭ на экспериментальных моделях опухолей гистиоидного типа установлены диапазоны значений модуля упругости гистологических структур, возникающих при лечении противоопухолевыми препаратами с различным механизмом действия (Бевацизумаб и Цисплатин): жизнеспособные опухолевые клетки – 621-2000 кПа, дистрофически измененные опухолевые клетки – 411-620 кПа, отёк опухолевой ткани – 231-410 кПа, некроз опухолевой ткани – 101-230 кПа. Средние значения модулей упругости этих структур различаются достоверно ($p < 0,05$).
2. Сегментация ОКЭ изображений на основе диапазонов значений модуля упругости показала высокий уровень корреляции с гистологическим сегментированием ($r = 0,93-0,99$; $p < 0,001$).
3. По значениям модуля упругости жизнеспособных опухолевых клеток, выявленных методом ОКЭ, установлена высокая диагностическая точность (83-94%) определения степени ответа экспериментальной опухоли на лекарственную терапию.
4. На основе метода ОКЭ по характерным значениям модуля упругости продемонстрирована возможность дифференцировать гистологические структуры аденокарциномы Grade II-III молочной железы пациентов (жизнеспособные клетки опухоли, строму и некроз опухолевой ткани), в том числе, после НАХТ, и определять степени ответа опухоли на лечение.
5. Установлена возможность метода ОКЭ на основании характерных значений модуля упругости гистологических структур определять морфологический статус колоректального рака пациентов: различать степени дифференцировки (аденокарциномы Grade I от Grade II-III) и морфологические подтипы (аденокарциному без дополнительного уточнения, крибриформную и муцинозную аденокарциномы).

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schirrmacher, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review) / V. Schirrmacher // International journal of oncology. – 2019. – Vol. 54, N. 2. – P. 407-419.
2. Chabner, B.A. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer / B.A. Chabner, T.G. Roberts, Jr. // Nature reviews. Cancer. – 2005. – Vol. 5, N. 1. – P. 65-72.
3. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal // Cancer journal for clinicians. – 2018. – Vol. 68, N. 6. – P. 394-424.
4. Eisenhauer, E.A. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1) / E.A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, J. Verweij // European journal of cancer. – 2009. – Vol. 45, N. 2. – P. 228-47.
5. Herter-Sprie, G.S. New cast for a new era: preclinical cancer drug development revisited / G.S. Herter-Sprie, A.L. Kung, K.K. Wong // The Journal of clinical investigation. – 2013. – Vol. 123, N. 9. – P. 3639-45.
6. Lee, Y.Y. The effect of high-intensity focused ultrasound in combination with cisplatin using a Xenograft model of cervical cancer / Y.Y. Lee, Y.J. Cho, J.J. Choi, C.H. Choi, T.J. Kim, B.G. Kim, D.S. Bae, Y.S. Kim, J.W. Lee // Anticancer research. – 2012. – Vol. 32, N. 12. – P. 5285-9.
7. Guo, S. The design, analysis and application of mouse clinical trials in oncology drug development / S. Guo, X. Jiang, B. Mao, Q.X. Li // BMC Cancer. – 2019. – Vol. 19, N. 1. – P. 019-5907.

8. Грабовой, А.Н. Гистологическая оценка ответа опухоли на химио-
/лучевую терапию / А.Н. Грабовой, Т.О. Тарасова, М.В. Кошубарова // *Клиническая онкология*. – 2012. – Vol. 6, N. 2. – P. 138-143.
9. Кобелев, А.В. Нелинейные вязкоупругие свойства биологических тканей / А.В. Кобелев, Л.Т. Смолюк, Р.М. Кобелева, Ю.Л. Проценко. – Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2012. – 244 p.
10. Аглямков, С.Р. О механических свойствах мягких биологических тканей / С.Р. Аглямков, А.Р. Сковорода // *Биофизика*. – 2000. – Vol. 45, N. 6. – P. 1137-1145.
11. Осипов, Л.В. Технологии эластографии в ультразвуковой диагностике. Обзор / Л.В. Осипов // *Медицинский алфавит. Диагностическая радиология и онкотерапия*. – 2013. – Vol. 3, N. 4. – P. 5-21.
12. Зыкин, Б.И. Ультразвуковая эластография (обзор) / Б.И. Зыкин, Н.А. Постнова, В.Е. Медведев // *Диагностическая радиология и онкотерапия*. – 2013. – Vol. 1, N. 2. – P. 14-19.
13. Kennedy, B.F. The emergence of optical elastography in biomedicine / B.F. Kennedy, P. Wijesinghe, D.D. Sampson // *Nature Photonics*. – 2017. – Vol. 11. – P. 215.
14. Kennedy, B.F. In vivo dynamic optical coherence elastography using a ring actuator / B.F. Kennedy, T.R. Hillman, R.A. McLaughlin, B.C. Quirk, D.D. Sampson // *Optics Express*. – 2009. – Vol. 17, N. 24. – P. 21762-72.
15. Zaitsev, V.Y. Deformation-induced speckle-pattern evolution and feasibility of correlational speckle tracking in optical coherence elastography / V.Y. Zaitsev, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, G.V. Gelikonov, V.M. Gelikonov, A. Vitkin // *Journal of biomedical optics*. – 2015. – Vol. 20, N. 7. – P. 75006.
16. Zaitsev, V.Y. Hybrid method of strain estimation in optical coherence elastography using combined sub-wavelength phase measurements and supra-pixel displacement tracking / V.Y. Zaitsev, A.L. Matveyev, L.A.

- Matveev, G.V. Gelikonov, E.V. Gubarkova, N.D. Gladkova, A. Vitkin // *Journal of Biophotonics*. – 2016. – Vol. 9, N. 5. – P. 499-509.
17. Kennedy, B.F. Strain estimation in phase-sensitive optical coherence elastography / B.F. Kennedy, S.H. Koh, R.A. McLaughlin, K.M. Kennedy, P.R. Munro, D.D. Sampson // *Biomedical Optics Express*. – 2012. – Vol. 3, N. 8. – P. 1865-79.
 18. Kennedy, B.F. Investigation of Optical Coherence Microelastography as a Method to Visualize Cancers in Human Breast Tissue / B.F. Kennedy, R.A. McLaughlin, K.M. Kennedy, L. Chin, P. Wijesinghe, A. Curatolo, A. Tien, M. Ronald, B. Latham, C.M. Saunders, D.D. Sampson // *Cancer Reseach*. – 2015. – Vol. 75, N. 16. – P. 3236-45.
 19. Andreeva, Y.Y. Procedure for intraoperative material examination in breast cancer after neoadjuvant therapy to estimate residual cancer burden using the RCB system / Y.Y. Andreeva, L.V. Moskvina, T.A. Berezina, Y.L. Podberezina, S.S. Loktev, G.A. Frank // *Arkhiv patologii*. – 2016. – Vol. 78, N. 2. – P. 41-46.
 20. Grabenstetter, A. Accuracy of Intraoperative Frozen Section of Sentinel Lymph Nodes After Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Carcinoma / A. Grabenstetter, T.A. Moo, S. Hajiyevea, P.J. Schuffler, P. Khattar, M.A. Friedlander, M.A. McCormack, M. Raiss, E.C. Zabor, A. Barrio, M. Morrow, M. Edelweiss // *The American journal of surgical pathology*. – 2019. – Vol. 43, N. 10. – P. 1377-1383.
 21. Berberoglu, K. Role of gamma probe-assisted intraoperative sentinel lymph node evaluation in predicting axillary breast cancer metastasis after neoadjuvant chemotherapy / K. Berberoglu, A. Erdemir, K. Rasa, H. Baloglu, M. Cakmakci // *Nuclear medicine communications*. – 2020. – Vol. 41, N. 2. – P. 120-125.
 22. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.

- Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray // International journal of cancer. – 2015. – Vol. 136, N. 5. – P. E359-86.
23. Torre, L.A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update / L.A. Torre, R.L. Siegel, E.M. Ward, A. Jemal // Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. – 2016. – Vol. 25, N. 1. – P. 16-27.
 24. Morgan, G. The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies / G. Morgan, R. Ward, M. Barton // Clinical oncology – 2004. – Vol. 16, N. 8. – P. 549-60.
 25. Huang, C.Y. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer / C.Y. Huang, D.T. Ju, C.F. Chang, P. Muralidhar Reddy, B.K. Velmurugan // Biomedicine (Taipei). – 2017. – Vol. 7, N. 4. – P. 23.
 26. Martens, M.H. Tumor Response to Treatment: Prediction and Assessment / M.H. Martens, D.M.J. Lambregts, E. Kluza, R.G.H. Beets-Tan // Current Radiology Reports. – 2014. – Vol. 2, N. 9. – P. 62.
 27. Alam, S.R. Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay / S.R. Alam, H. Wallrabe, Z. Svindrych, A.K. Chaudhary, K.G. Christopher, D. Chandra, A. Periasamy // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7, N. 1. – P. 10451.
 28. Gore, L. Targeting developmental pathways in children with cancer: what price success? / L. Gore, J. DeGregori, C.C. Porter // The Lancet. Oncology. – 2013. – Vol. 14, N. 2. – P. e70-8.
 29. Lang, D.S. Safety of rapid rituximab infusion in adult cancer patients: a systematic review / D.S. Lang, C. Hagger, A. Pearson // International journal of nursing practice. – 2011. – Vol. 17, N. 4. – P. 357-69.
 30. Wu, D. Efficacy analysis of trastuzumab, carboplatin and docetaxel in HER-2-positive breast cancer patients / D. Wu, L. Xiong // Oncology letters. – 2020. – Vol. 19, N. 3. – P. 2539-2546.

31. Cai, J. Correlation of bevacizumab-induced hypertension and outcomes of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab: a systematic review and meta-analysis / J. Cai, H. Ma, F. Huang, D. Zhu, J. Bi, Y. Ke, T. Zhang // *World journal of surgical oncology*. – 2013. – Vol. 11. – P. 306.
32. Клинические рекомендации по диагностике и лечению опухолей // Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», 2018.
33. Гольдберг, В.Е. Современные достижения лекарственной терапии злокачественных новообразований / В.Е. Гольдберг, М.Г. Матяш // *Бюллетень СО РАМН*. – 2004. – Vol. 2.
34. Rydelius, A. Longitudinal study of cognitive function in glioma patients treated with modern radiotherapy techniques and standard chemotherapy / A. Rydelius, J. Lätt, S. Kinhult, S. Engelholm, D. Van Westen, M. Pihlsgård, J. Bengzon, P.C. Sundgren, Å. Lilja // *Acta Oncologica*. – 2020. – Vol. 59, N. 9. – P. 1091-1097.
35. Seward, S.M. Primary debulking surgery and neoadjuvant chemotherapy in the treatment of advanced epithelial ovarian carcinoma / S.M. Seward, I. Winer // *Cancer Metastasis Reviews*. – 2015. – Vol. 34, N. 1. – P. 5-10.
36. Bian, X. Pathological complete response following neoadjuvant radiotherapy and intraperitoneal perfusion chemotherapy for recurrent colon carcinoma: A case report and literature review / X. Bian, B. Liu, Y. Yang // *Oncology Letters*. – 2016. – Vol. 11, N. 4. – P. 2747-2750.
37. Miller, A.B. Reporting results of cancer treatment / A.B. Miller, B. Hoogstraten, M. Staquet, A. Winkler // *Cancer*. – 1981. – Vol. 47, N. 1. – P. 207-14.
38. James, K. Measuring response in solid tumors: unidimensional versus bidimensional measurement / K. James, E. Eisenhauer, M. Christian, M. Terenziani, D. Vena, A. Muldal, P. Therasse // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1999. – Vol. 91, N. 6. – P. 523-8.

39. Therasse, P. Measuring the clinical response. What does it mean? / P. Therasse // *European journal of cancer*. – 2002. – Vol. 38, N. 14. – P. 1817-23.
40. Therasse, P. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment / P. Therasse, E.A. Eisenhauer, J. Verweij // *European journal of cancer*. – 2006. – Vol. 42, N. 8. – P. 1031-9.
41. Prasad, S.R. Radiological measurement of breast cancer metastases to lung and liver: comparison between WHO (bidimensional) and RECIST (unidimensional) guidelines / S.R. Prasad, S. Saini, J.E. Sumner, P.F. Hahn, D. Sahani, G.W. Boland // *Journal of computer assisted tomography*. – 2003. – Vol. 27, N. 3. – P. 380-4.
42. Benjamin, R.S. We should desist using RECIST, at least in GIST / R.S. Benjamin, H. Choi, H.A. Macapinlac, M.A. Burgess, S.R. Patel, L.L. Chen, D.A. Podoloff, C. Charnsangavej // *Journal of clinical oncology*. – 2007. – Vol. 25, N. 13. – P. 1760-4.
43. Lee, H.Y. New CT response criteria in non-small cell lung cancer: proposal and application in EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy / H.Y. Lee, K.S. Lee, M.J. Ahn, H.S. Hwang, J.W. Lee, K. Park, J.S. Ahn, T.S. Kim, C.A. Yi, M.J. Chung // *Lung Cancer*. – 2011. – Vol. 73, N. 1. – P. 63-9.
44. Bogaerts, J. Individual patient data analysis to assess modifications to the RECIST criteria / J. Bogaerts, R. Ford, D. Sargent, L.H. Schwartz, L. Rubinstein, D. Lacombe, E. Eisenhauer, J. Verweij, P. Therasse // *European journal of cancer* – 2009. – Vol. 45, N. 2. – P. 248-60.
45. Hwang, K.E. Response Evaluation of Chemotherapy for Lung Cancer / K.E. Hwang, H.R. Kim // *Tuberculosis and respiratory diseases*. – 2017. – Vol. 80, N. 2. – P. 136-142.
46. Trillet-Lenoir, V. Assessment of tumour response to chemotherapy for metastatic colorectal cancer: accuracy of the RECIST criteria / V. Trillet-Lenoir, G. Freyer, P. Kaemmerlen, A. Fond, O. Pellet, C. Lombard-Bohas, J.L. Gaudin, G. Lledo, R. Mackiewicz, M.C. Gouttebel, H. Moindrot, J.D.

- Boyer, L. Chassignol, N. Stremsdoerfer, F. Desseigne, J.M. Moreau, F. Hedelius, A. Morailon, F. Chapuis, J.P. Bleuse, Y. Barbier, M.O. Heilmann, P.J. Valette // *The British journal of radiology*. – 2002. – Vol. 75, N. 899. – P. 903-8.
47. Kang, H. Imaging-based tumor treatment response evaluation: review of conventional, new, and emerging concepts / H. Kang, H.Y. Lee, K.S. Lee, J.H. Kim // *Korean Journal of Radiology*. – 2012. – Vol. 13, N. 4. – P. 371-90.
 48. Takao, M. Endoscopic evaluation of primary tumor response in patients with metastatic colorectal cancer treated by systemic chemotherapy / M. Takao, K. Yamazaki, N. Boku, H. Ikehara, S. Hamauchi, T. Tsushima, H. Taniguchi, A. Todaka, N. Machida, A. Fukutomi, Y. Onozawa, H. Yasui // *International journal of clinical oncology*. – 2013. – Vol. 18, N. 5. – P. 864-8.
 49. Dobruch-Sobczak, K. Ultrasound echogenicity reveals the response of breast cancer to chemotherapy / K. Dobruch-Sobczak, H. Piotrkowska-Wroblewska, Z. Klimonda, K. Roszkowska-Purska, J. Litniewski // *Clinical imaging*. – 2019. – Vol. 55. – P. 41-46.
 50. Theobaldy, S. Chemotherapy of metastatic gastric cancer - x-ray follow-up / S. Theobaldy, K. Hofmann-Preiss, M. Walter // *Der Radiologe*. – 1987. – Vol. 27, N. 5. – P. 235-6.
 51. Yim, H. Change in microcalcifications on mammography after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: correlation with tumor response grade and comparison with lesion extent / H. Yim, T. Ha, D.K. Kang, S.Y. Park, Y. Jung, T.H. Kim // *Acta radiologica*. – 2019. – Vol. 60, N. 2. – P. 131-139.
 52. Al-Hattali, S. Breast MRI and tumour biology predict axillary lymph node response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer / S. Al-Hattali, S.J. Vinnicombe, N.M. Gowdh, A. Evans, S. Armstrong, D. Adamson, C.A. Purdie, E.J. Macaskill // *Cancer Imaging*. – 2019. – Vol. 19, N. 1. – P. 91.

53. Choi, S.J. Urothelial phase CT for assessment of pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer / S.J. Choi, K.J. Park, G. Lee, M.H. Kim, J.K. Kim // *European journal of radiology*. – 2020. – Vol. 126. – P. 108902.
54. Li, J. Multi-slice spiral CT evaluation of breast cancer chemotherapy and correlation between CT results and breast cancerspecific gene 1 / J. Li, W. Gao, B. Yu, F. Wang, L. Wang // *Journal of B.U.ON.* . – 2018. – Vol. 23, N. 2. – P. 378-383.
55. Li, H. MRI and PET/CT for evaluation of the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: A systematic review and meta-analysis / H. Li, L. Yao, P. Jin, L. Hu, X. Li, T. Guo, K. Yang // *Breast*. – 2018. – Vol. 40. – P. 106-115.
56. Symmans, W.F. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy / W.F. Symmans, F. Peintinger, C. Hatzis, R. Rajan, H. Kuerer, V. Valero, L. Assad, A. Poniecka, B. Hennessey, M. Green, A.U. Buzdar, S.E. Singletary, G.N. Hortobagyi, L. Pusztai // *Journal of Clinical Oncology*. – 2007. – Vol. 25, N. 28. – P. 4414-22.
57. Holscher, A.H. Prognostic classification of histopathologic response to neoadjuvant therapy in esophageal adenocarcinoma / A.H. Holscher, U. Drebbler, H. Schmidt, E. Bollschweiler // *Annals of surgery*. – 2014. – Vol. 260, N. 5. – P. 779-84; discussion 784-5.
58. Mandard, A.M. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations / A.M. Mandard, F. Dalibard, J.C. Mandard, J. Marnay, M. Henry-Amar, J.F. Petiot, A. Roussel, J.H. Jacob, P. Segol, G. Samama, et al. // *Cancer*. – 1994. – Vol. 73, N. 11. – P. 2680-6.
59. Hermann, R.M. Histomorphological tumor regression grading of esophageal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: which score to use? / R.M. Hermann, O. Horstmann, F. Haller, C. Perske, H. Christiansen, A. Hille, H.

- Schmidberger, L. Fuzesi // Diseases of the esophagus. – 2006. – Vol. 19, N. 5. – P. 329-34.
60. Karamitopoulou, E. Assessment of tumor regression of esophageal adenocarcinomas after neoadjuvant chemotherapy: comparison of 2 commonly used scoring approaches / E. Karamitopoulou, S. Thies, I. Zlobec, K. Ott, M. Feith, J. Slotta-Huspenina, F. Lordick, K. Becker, R. Langer // The American journal of surgical pathology. – 2014. – Vol. 38, N. 11. – P. 1551-6.
 61. Langer, R. Tumor regression grading of gastrointestinal cancers after neoadjuvant therapy / R. Langer, K. Becker // Virchows Archiv : an international journal of pathology. – 2018. – Vol. 472, N. 2. – P. 175-186.
 62. Ogston, K.N. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival / K.N. Ogston, I.D. Miller, S. Payne, A.W. Hutcheon, T.K. Sarkar, I. Smith, A. Schofield, S.D. Heys // Breast. – 2003. – Vol. 12, N. 5. – P. 320-7.
 63. Baldus, S.E. Regression of oesophageal carcinomas after neoadjuvant radiochemotherapy: criteria of the histopathological evaluation / S.E. Baldus, S.P. Monig, W. Schroder, R. Metzger, S. Lang, T.K. Zirbes, J. Thiele, R.P. Muller, H.P. Dienes, A.H. Holscher, P.M. Schneider // Der Pathologe. – 2004. – Vol. 25, N. 6. – P. 421-7.
 64. Rubbia-Brandt, L. Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery / L. Rubbia-Brandt, E. Giostra, C. Brezault, A.D. Roth, A. Andres, V. Audard, P. Sartoretto, B. Dousset, P.E. Majno, O. Soubrane, S. Chaussade, G. Mentha, B. Terris // Annals of oncology. – 2007. – Vol. 18, N. 2. – P. 299-304.
 65. Junker, K. Apoptosis and tumor regression in locally advanced non-small cell lung cancer with neoadjuvant therapy / K. Junker, K.M. Muller, U. Bosse, F. Klinke, A. Heinecke, M. Thomas // Der Pathologe. – 2003. – Vol. 24, N. 3. – P. 214-9.

66. Cox, B. Pathology laboratory management / B. Cox, E. Colgan // In: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Eighth Edition) / Edited by S.K. Suvarna, C. Layton, and J.D. Bancroft. – 2019. – P. 1-11.
67. Puigdemivol-Sanchez, A. Cryostat Slice Irregularities May Introduce Bias in Tissue Thickness Estimation: Relevance for Cell Counting Methods / A. Puigdemivol-Sanchez, A. Giralt, A. Casanovas, J. Alberch, A. Prats-Galino // Microscopy and microanalysis. – 2015. – Vol. 21, N. 4. – P. 893-901.
68. Taqi, S.A. A review of artifacts in histopathology / S.A. Taqi, S.A. Sami, L.B. Sami, S.A. Zaki // Journal of oral and maxillofacial pathology. – 2018. – Vol. 22, N. 2. – P. 279.
69. Rivenson, Y. Virtual histological staining of unlabelled tissue-autofluorescence images via deep learning / Y. Rivenson, H. Wang, Z. Wei, K. de Haan, Y. Zhang, Y. Wu, H. Günaydin, J.E. Zuckerman, T. Chong, A.E. Sisk, L.M. Westbrook, W.D. Wallace, A. Ozcan // Nature Biomedical Engineering. – 2019. – Vol. 3, N. 6. – P. 466-477.
70. Sun, C.K. Slide-free imaging of hematoxylin-eosin stained whole-mount tissues using combined third-harmonic generation and three-photon fluorescence microscopy / C.K. Sun, C.T. Kao, M.L. Wei, S.H. Chia, F.X. Kartner, A. Ivanov, Y.H. Liao // Journal of biophotonics. – 2019. – Vol. 12, N. 5. – P. e201800341.
71. Bratchenko, I.A. Combined Raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions / I.A. Bratchenko, D.N. Artemyev, O.O. Myakinin, Y.A. Khristoforova, A.A. Moryatov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // Journal of biomedical optics. – 2017. – Vol. 22, N. 2. – P. 27005.
72. Pierangelo, A. Ex-vivo characterization of human colon cancer by Mueller polarimetric imaging / A. Pierangelo, A. Benali, M.R. Antonelli, T. Novikova, P. Validire, B. Gayet, A. De Martino // Optics express. – 2011. – Vol. 19, N. 2. – P. 1582-93.

73. Beyer, T. What scans we will read: imaging instrumentation trends in clinical oncology / T. Beyer, L. Bidaut, J. Dickson, M. Kachelriess, F. Kiessling, R. Leitgeb, J. Ma, L.K. Shiyam Sundar, B. Theek, O. Mawlawi // *Cancer Imaging*. – 2020. – Vol. 20, N. 1. – P. 38.
74. Townsend, D.W. Multimodality imaging of structure and function / D.W. Townsend // *Physics in medicine and biology*. – 2008. – Vol. 53, N. 4. – P. R1-r39.
75. Handorf, A.M. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression / A.M. Handorf, Y. Zhou, M.A. Halanski, W.J. Li // *Organogenesis*. – 2015. – Vol. 11, N. 1. – P. 1-15.
76. Garra, B.S. Clinical elasticity estimation and imaging: applications and standards / B.S. Garra // In: *Tissue Elasticity Imaging* / Edited by S.K. Alam and B.S. Garra. – Amsterdam: Elsevier, 2020. – P. 1-19.
77. Алгоритмы выявления онкологических заболеваний у населения российской федерации // Методические рекомендации для организаторов здравоохранения, врачей первичного звена, врачей-специалистов, Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва, 2009.
78. Ohba, S. A novel procedure for transtracheal resection for recurrent thyroid cancer involving a trachea and esophagus / S. Ohba, J. Yokoyama, M. Fujimaki, M. Kojima, K. Ikeda // *World journal of surgical oncology*. – 2014. – Vol. 12. – P. 303.
79. Lee, J.W. Palpation device for the identification of kidney and bladder cancer: a pilot study / J.W. Lee, E.I. Lorenzo, B. Ahn, C.K. Oh, H.J. Kim, W.K. Han, J. Kim, K.H. Rha // *Yonsei medical journal*. – 2011. – Vol. 52, N. 5. – P. 768-72.
80. Streng, M. A comparison of tumour size measurements with palpation, ultrasound and mammography in male breast cancer: first results of the prospective register study / M. Streng, A. Ignatov, M. Reinisch, S.D. Costa,

- H. Eggemann // *Journal of cancer research and clinical oncology*. – 2018. – Vol. 144, N. 2. – P. 381-387.
81. Cho, Y.Y. Trends in Thyroid Cancer Incidence in Korean Children (1999-2012) Based on Palpation and Nonpalpation Detection Methods / Y.Y. Cho, H.W. Jang, J.Y. Joung, S.M. Park, D.J. Jeong, S.W. Kim, J.H. Chung // *European thyroid journal*. – 2015. – Vol. 4, N. 4. – P. 252-9.
 82. Перцов, С.С. Конспекты лекций по медицинской и биологической физике / С.С. Перцов, С.А. Муслов, А.А. Корнеев, А.А. Сеницын, Г.М. Стюрева, Н.В. Зайцева. – МГМСУ, 2017. – 175 p.
 83. Aglyamov, S.R. The governing theory of elasticity imaging / S.R. Aglyamov // In: *Tissue Elasticity Imaging* / Edited by S.K. Alam and B.S. Garra. – Amsterdam: Elsevier, 2020. – P. 17-43.
 84. Ophir, J. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues / J. Ophir, I. Cespedes, H. Ponnekanti, Y. Yazdi, X. Li // *Ultrason Imaging*. – 1991. – Vol. 13, N. 2. – P. 111-34.
 85. Wirtz, D. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis / D. Wirtz, K. Konstantopoulos, P.C. Searson // *Nature reviews. Cancer*. – 2011. – Vol. 11, N. 7. – P. 512-22.
 86. Paszek, M.J. Tensional homeostasis and the malignant phenotype / M.J. Paszek, N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer, V.M. Weaver // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 8, N. 3. – P. 241-54.
 87. Bissell, M.J. Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes / M.J. Bissell, P.A. Kenny, D.C. Radisky // *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. – 2005. – Vol. 70. – P. 343-56.
 88. Stanisavljevic, J. Snail1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis / J. Stanisavljevic, J. Loubat-Casanovas, M. Herrera, T. Luque, R. Pena, A.

- Lluch, J. Albanell, F. Bonilla, A. Rovira, C. Pena, D. Navajas, F. Rojo, A. Garcia de Herreros, J. Baulida // *Cancer research*. – 2015. – Vol. 75, N. 2. – P. 284-95.
89. Stylianopoulos, T. The Solid Mechanics of Cancer and Strategies for Improved Therapy / T. Stylianopoulos // *Journal of biomechanical engineering*. – 2017. – Vol. 139, N. 2.
 90. Stylianopoulos, T. Coevolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression: implications for vascular collapse / T. Stylianopoulos, J.D. Martin, M. Snuderl, F. Mpekris, S.R. Jain, R.K. Jain // *Cancer research*. – 2013. – Vol. 73, N. 13. – P. 3833-41.
 91. Huang, Q. Fluid shear stress and tumor metastasis / Q. Huang, X. Hu, W. He, Y. Zhao, S. Hao, Q. Wu, S. Li, S. Zhang, M. Shi // *American journal of cancer research*. – 2018. – Vol. 8, N. 5. – P. 763-777.
 92. Parker, K.J. Imaging the elastic properties of tissue: the 20 year perspective / K.J. Parker, M.M. Doyley, D.J. Rubens // *Physics in medicine and biology*. – 2011. – Vol. 56, N. 1. – P. R1-r29.
 93. Song, E.J. Tumor stiffness measured by quantitative and qualitative shear wave elastography of breast cancer / E.J. Song, Y.M. Sohn, M. Seo // *The British journal of radiology*. – 2018. – Vol. 91, N. 1086. – P. 20170830.
 94. Singh, S. Liver stiffness is associated with risk of decompensation, liver cancer, and death in patients with chronic liver diseases: a systematic review and meta-analysis / S. Singh, L.L. Fujii, M.H. Murad, Z. Wang, S.K. Asrani, R.L. Ehman, P.S. Kamath, J.A. Talwalkar // *Clinical gastroenterology and hepatology*. – 2013. – Vol. 11, N. 12. – P. 1573-84.e1-2; quiz e88-9.
 95. Dietrich, C.F. Elastography of the Pancreas, Current View / C.F. Dietrich, M. Hocke // *Clinical endoscopy*. – 2019. – Vol. 52, N. 6. – P. 533-540.
 96. Ji, Y. Stiffness of prostate gland measured by transrectal real-time shear wave elastography for detection of prostate cancer: a feasibility study / Y. Ji, L. Ruan, W. Ren, G. Dun, J. Liu, Y. Zhang, Q. Wan // *The British journal of radiology*. – 2019. – Vol. 92, N. 1097. – P. 20180970.

97. Alabi, B.R. Decellularized mice colons as models to study the contribution of the extracellular matrix to cell behavior and colon cancer progression / B.R. Alabi, R. LaRanger, J.W. Shay // *Acta biomaterialia*. – 2019. – Vol. 100. – P. 213-222.
98. Evans, A. Pre-operative stromal stiffness measured by shear wave elastography is independently associated with breast cancer-specific survival / A. Evans, Y.T. Sim, C. Pourreyron, A. Thompson, L. Jordan, D. Fleming, C. Purdie, J. Macaskill, S. Vinnicombe, P. Pharoah // *Breast cancer research and treatment*. – 2018. – Vol. 171, N. 2. – P. 383-389.
99. Wu, D. Predicting the risk of postoperative liver failure and overall survival using liver and spleen stiffness measurements in patients with hepatocellular carcinoma / D. Wu, E. Chen, T. Liang, M. Wang, B. Chen, B. Lang, H. Tang // *Medicine (Baltimore)*. – 2017. – Vol. 96, N. 34. – P. e7864.
100. Pogoda, K. Compression stiffening of brain and its effect on mechanosensing by glioma cells / K. Pogoda, L. Chin, P.C. Georges, F.J. Byfield, R. Bucki, R. Kim, M. Weaver, R.G. Wells, C. Marcinkiewicz, P.A. Janmey // *New journal of physics*. – 2014. – Vol. 16. – P. 075002.
101. Hepburn, M.S. Three-dimensional imaging of cell and extracellular matrix elasticity using quantitative micro-elastography / M.S. Hepburn, P. Wijesinghe, L.G. Major, J. Li, A. Mowla, C. Astell, H.W. Park, Y. Hwang, Y.S. Choi, B.F. Kennedy // *Biomedical Optics Express*. – 2020. – Vol. 11, N. 2. – P. 867-884.
102. Lal, R. Biological applications of atomic force microscopy / R. Lal, S.A. John // *The American journal of physiology*. – 1994. – Vol. 266, N. 1 Pt 1. – P. C1-21.
103. Alibert, C. Are cancer cells really softer than normal cells? / C. Alibert, B. Goud, J.-B. Manneville // *Biology of the Cell*. – 2017. – Vol. 109, N. 5. – P. 167-189.
104. Plodinec, M. The nanomechanical signature of breast cancer / M. Plodinec, M. Loparic, C.A. Monnier, E.C. Obermann, R. Zanetti-Dallenbach, P.

- Oertle, J.T. Hyotyla, U. Aebi, M. Bentires-Alj, R.Y.H. Lim, C.-A. Schoenenberger // *Nature Nanotechnology*. – 2012. – Vol. 7, N. 11. – P. 757-765.
105. Youk, J.H. Shear-wave elastography for breast masses: local shear wave speed (m/sec) versus Young modulus (kPa) / J.H. Youk, E.J. Son, A.Y. Park, J.A. Kim // *Ultrasonography*. – 2014. – Vol. 33, N. 1. – P. 34-9.
 106. Тамкович, С.Н. Современные методы диагностики рака молочной железы / С.Н. Тамкович, В.Е. Войцицкий, П.П. Лактионов // *Биомедицинская химия*. – 2014. – Vol. 2, N. 60. – P. 141-160.
 107. Maloney, B.W. Review of methods for intraoperative margin detection for breast conserving surgery / B.W. Maloney, D.M. McClatchy, B.W. Pogue, K.D. Paulsen, W.A. Wells, R.J. Barth // *Journal of biomedical optics*. – 2018. – Vol. 23, N. 10. – P. 1-19.
 108. Керимов, Р.А. Возможности диагностики мультицентрического рака молочной железы / Р.А. Керимов // *Опухоли женской репродуктивной системы*. – 2006. – №4.
 109. Беспалов, В.Г. Маммографическая плотность как критерий эффективности лечения мастопатии и снижения риска рака молочной железы / В.Г. Беспалов, Ю.Ф. Негусторов // *Опухоли женской репродуктивной системы*. – 2017. – Vol. 13, N. 2. – P. 33-41.
 110. Fernandez-Nogueira, P. Breast Mammographic Density: Stromal Implications on Breast Cancer Detection and Therapy / P. Fernandez-Nogueira, M. Mancino, G. Fuster, P. Bragado, M.P. Puig, P. Gascon, F.J. Casado, N. Carbo // *Journal of clinical medicine*. – 2020. – Vol. 9, N. 3.
 111. Nazari, S.S. An overview of mammographic density and its association with breast cancer / S.S. Nazari, P. Mukherjee // *Breast Cancer*. – 2018. – Vol. 25, N. 3. – P. 259-267.
 112. Antoni, S. Is mammographic density differentially associated with breast cancer according to receptor status? A meta-analysis / S. Antoni, A.J. Sasco,

- I. dos Santos Silva, V. McCormack // Breast cancer research and treatment. – 2013. – Vol. 137, N. 2. – P. 337-47.
113. Bae, J.M. Breast Density and Risk of Breast Cancer in Asian Women: A Meta-analysis of Observational Studies / J.M. Bae, E.H. Kim // Journal of preventive medicine and public health. – 2016. – Vol. 49, N. 6. – P. 367-375.
 114. Bertrand, K.A. Mammographic density and risk of breast cancer by age and tumor characteristics / K.A. Bertrand, R.M. Tamimi, C.G. Scott, M.R. Jensen, V. Pankratz, D. Visscher, A. Norman, F. Couch, J. Shepherd, B. Fan, Y.Y. Chen, L. Ma, A.H. Beck, S.R. Cummings, K. Kerlikowske, C.M. Vachon // Breast cancer research. – 2013. – Vol. 15, N. 6. – P. R104.
 115. Friedewald, S.M. Breast Tomosynthesis: Practical Considerations / S.M. Friedewald // Radiologic clinics of North America. – 2017. – Vol. 55, N. 3. – P. 493-502.
 116. Phi, X.A. Digital breast tomosynthesis for breast cancer screening and diagnosis in women with dense breasts - a systematic review and meta-analysis / X.A. Phi, A. Tagliafico, N. Houssami, M.J.W. Greuter, G.H. de Bock // BMC Cancer. – 2018. – Vol. 18, N. 1. – P. 380.
 117. Boyd, N.F. Evidence that breast tissue stiffness is associated with risk of breast cancer / N.F. Boyd, Q. Li, O. Melnichouk, E. Huszti, L.J. Martin, A. Gunasekara, G. Mawdsley, M.J. Yaffe, S. Minkin // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N. 7. – P. e100937.
 118. Choi, W.J. Predicting prognostic factors of breast cancer using shear wave elastography / W.J. Choi, H.H. Kim, J.H. Cha, H.J. Shin, H. Kim, E.Y. Chae, M.J. Hong // Ultrasound in medicine & biology. – 2014. – Vol. 40, N. 2. – P. 269-74.
 119. Evans, A. Invasive breast cancer: relationship between shear-wave elastographic findings and histologic prognostic factors / A. Evans, P. Whelehan, K. Thomson, D. McLean, K. Brauer, C. Purdie, L. Baker, L.

- Jordan, P. Rauchhaus, A. Thompson // *Radiology*. – 2012. – Vol. 263, N. 3. – P. 673-7.
120. Denis, M. Correlating Tumor Stiffness with Immunohistochemical Subtypes of Breast Cancers: Prognostic Value of Comb-Push Ultrasound Shear Elastography for Differentiating Luminal Subtypes / M. Denis, A. Gregory, M. Bayat, R.T. Fazzio, D.H. Whaley, K. Ghosh, S. Shah, M. Fatemi, A. Alizad // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, N. 10. – P. e0165003.
 121. Berg, W.A. Quantitative Maximum Shear-Wave Stiffness of Breast Masses as a Predictor of Histopathologic Severity / W.A. Berg, E.B. Mendelson, D.O. Cosgrove, C.J. Dore, J. Gay, J.P. Henry, C. Cohen-Bacrie // *American journal of roentgenology*. – 2015. – Vol. 205, N. 2. – P. 448-55.
 122. Cha, Y.J. Lymphangiogenesis in Breast Cancer Correlates with Matrix Stiffness on Shear-Wave Elastography / Y.J. Cha, J.H. Youk, B.G. Kim, W.H. Jung, N.H. Cho // *Yonsei medical journal*. – 2016. – Vol. 57, N. 3. – P. 599-605.
 123. Evans, A. Does shear wave ultrasound independently predict axillary lymph node metastasis in women with invasive breast cancer? / A. Evans, P. Rauchhaus, P. Whelehan, K. Thomson, C.A. Purdie, L.B. Jordan, C.O. Michie, A. Thompson, S. Vinnicombe // *Breast cancer research and treatment*. – 2014. – Vol. 143, N. 1. – P. 153-7.
 124. Evans, A. Can shear-wave elastography predict response to neoadjuvant chemotherapy in women with invasive breast cancer? / A. Evans, S. Armstrong, P. Whelehan, K. Thomson, P. Rauchhaus, C. Purdie, L. Jordan, L. Jones, A. Thompson, S. Vinnicombe // *British journal of cancer*. – 2013. – Vol. 109, N. 11. – P. 2798-802.
 125. Evans, A. Identification of pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: comparison of greyscale ultrasound, shear wave elastography, and MRI / A. Evans, P. Whelehan, A. Thompson, C. Purdie, L. Jordan, J. Macaskill, S. Henderson, S. Vinnicombe // *Clinical radiology*. – 2018. – Vol. 73, N. 10. – P. 910.e1-910.e6.

126. Guo, R. Ultrasound Imaging Technologies for Breast Cancer Detection and Management: A Review / R. Guo, G. Lu, B. Qin, B. Fei // *Ultrasound in medicine & biology*. – 2018. – Vol. 44, N. 1. – P. 37-70.
127. Niell, B.L. Screening for Breast Cancer / B.L. Niell, P.E. Freer, R.J. Weinfurter, E.K. Arleo, J.S. Drukteinis // *Radiologic clinics of North America*. – 2017. – Vol. 55, N. 6. – P. 1145-1162.
128. Çebi Olgun, D. Use of shear wave elastography to differentiate benign and malignant breast lesions / D. Çebi Olgun, B. Korkmazer, F. Kılıç, A.S. Dikici, M. Velidedeoğlu, F. Aydoğan, F. Kantarcı, M.H. Yılmaz // *Diagnostic and interventional radiology*. – 2014. – Vol. 20, N. 3. – P. 239-44.
129. Митьков, В.В. Информативность ультразвуковой эластографии сдвиговой волны в диагностике рака молочной железы / В.В. Митьков, К.А. Чубарова, Н.В. Заболотская, М.Д. Митькова, Н.В. Яурова // *Ультразвуковая и функциональная диагностика*. – 2014. – Vol. 3, N. 1. – P. 11-24.
130. Ianculescu, V. Added value of Virtual Touch IQ shear wave elastography in the ultrasound assessment of breast lesions / V. Ianculescu, L.M. Ciolovan, A. Dunant, P. Vielh, C. Mazouni, S. Delalogue, C. Dromain, A. Blidaru, C. Balleyguier // *European journal of radiology*. – 2014. – Vol. 83, N. 5. – P. 773-7.
131. Barr, R.G. The Role of Sonoelastography in Breast Lesions / R.G. Barr // *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. – 2018. – Vol. 39, N. 1. – P. 98-105.
132. Barr, R.G. WFUMB Guidelines and Recommendations for Clinical Use of Ultrasound Elastography: Part 2: Breast / R.G. Barr, K. Nakashima, D. Amy, D. Cosgrove, A. Farrokh, F. Schafer, J.C. Bamber, L. Castera, B.I. Choi, Y.-H. Chou, C.F. Dietrich, H. Ding, G. Ferraioli, C. Filice, M. Friedrich-Rust, T.J. Hall, K.R. Nightingale, M.L. Palmeri, T. Shiina, S. Suzuki, I. Sporea, S. Wilson, M. Kudo // *Ultrasound in Medicine and Biology*. – 2015. – Vol. 41, N. 5. – P. 1148-1160.

133. Сафронова, М.А. Опыт применения компрессионной соноэластографии для диагностики метастатически пораженных лимфатических узлов при раке молочной железы / М.А. Сафронова, В.И. Соловьев, А.В. Борсуков // Российский онкологический журнал. – 2014. – Vol. 6.
134. Cosgrove, D. WFUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography: Part 4. Thyroid / D. Cosgrove, R. Barr, J. Bojunga, V. Cantisani, M.C. Chammas, M. Dighe, S. Vinayak, J.M. Xu, C.F. Dietrich // Ultrasound in Medicine & Biology. – 2017. – Vol. 43, N. 1. – P. 4-26.
135. Ferraioli, G. WFUMB guidelines and recommendations for clinical use of ultrasound elastography: Part 3: liver / G. Ferraioli, C. Filice, L. Castera, B.I. Choi, I. Sporea, S.R. Wilson, D. Cosgrove, C.F. Dietrich, D. Amy, J.C. Bamber, R. Barr, Y.H. Chou, H. Ding, A. Farrokh, M. Friedrich-Rust, T.J. Hall, K. Nakashima, K.R. Nightingale, M.L. Palmeri, F. Schafer, T. Shiina, S. Suzuki, M. Kudo // Ultrasound in Medicine & Biology. – 2015. – Vol. 41, N. 5. – P. 1161-79.
136. Бекезин, В.В. Современные возможности ультразвуковой диагностики состояния почек у детей / В.В. Бекезин, Е.Ю. Козлова, Т.А. Плескачевская, А.В. Борсуков // Современные технологии в медицине. – 2017. – Vol. 9, N. 2. – P. 170-177.
137. Barr, R.G. WFUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography: Part 5. Prostate / R.G. Barr, D. Cosgrove, M. Brock, V. Cantisani, J.M. Correas, A.W. Postema, G. Salomon, M. Tsutsumi, H.X. Xu, C.F. Dietrich // Ultrasound in Medicine & Biology. – 2017. – Vol. 43, N. 1. – P. 27-48.
138. Cosgrove, D. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 2: Clinical applications / D. Cosgrove, F. Piscaglia, J. Bamber, J. Bojunga, J.M. Correas, O.H. Gilja, A.S. Klauser, I. Sporea, F. Calliada, V. Cantisani, M. D'Onofrio, E.E. Drakonaki, M. Fink, M. Friedrich-Rust, J. Fromageau, R.F. Havre, C. Jenssen, R. Ohlinger, A.

- Săftoiu, F. Schaefer, C.F. Dietrich // *European Journal of Ultrasound*. – 2013. – Vol. 34, N. 3. – P. 238-53.
139. Seicean, A. Maximizing the endosonography: The role of contrast harmonics, elastography and confocal endomicroscopy / A. Seicean, O. Mosteanu, R. Seicean // *World Journal of Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 23, N. 1. – P. 25-41.
 140. Морозова, Т.Г. Клиническое значение компрессионной эластографии в дифференциальной диагностике кистозных образований поджелудочной железы / Т.Г. Морозова, А.В. Борсуков // *Современные технологии в медицине*. – 2014. – Vol. 6, N. 2. – P. 103-109.
 141. Okasha, H.H. Role of high resolution ultrasound/endosonography and elastography in predicting lymph node malignancy / H.H. Okasha, M. Mansour, K.A. Attia, H.M. Khattab, A.Y. Sakr, M. Naguib, W. Aref, A.A. Al-Naggar, R. Ezzat // *Endoscopic Ultrasound*. – 2014. – Vol. 3, N. 1. – P. 58-62.
 142. Морозова, Т.Г. Компрессионная эластография при эндосонографии как метод ранней дифференциальной диагностики стадий фиброзного процесса печени / Т.Г. Морозова, А.В. Борсуков // *Современные технологии в медицине*. – 2014. – Vol. 6, N. 3. – P. 79-84.
 143. Thomas, A. Real-time sonoelastography performed in addition to B-mode ultrasound and mammography: improved differentiation of breast lesions? / A. Thomas, S. Kümmel, F. Fritzsche, M. Warm, B. Ebert, B. Hamm, T. Fischer // *Academic radiology*. – 2006. – Vol. 13, N. 12. – P. 1496-504.
 144. Barr, R.G. Breast elastography / R.G. Barr // In: *Tissue Elasticity Imaging* / Edited by S.K. Alam and B.S. Garra. – Amsterdam: Elsevier, 2020. – P. 21-46.
 145. Itoh, A. Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis / A. Itoh, E. Ueno, E. Tohno, H. Kamma, H. Takahashi, T. Shiina, M. Yamakawa, T. Matsumura // *Radiology*. – 2006. – Vol. 239, N. 2. – P. 341-50.

146. Magny, S.J. Breast, Imaging, Reporting and Data System (BI RADS) / S.J. Magny, R. Shikhman, A.L. Keppke // In: StatPearls / Edited by Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC., 2020.
147. Ma, Y. Comparison of strain and shear-wave ultrasonic elastography in predicting the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancers / Y. Ma, S. Zhang, J. Li, J. Li, Y. Kang, W. Ren // European radiology. – 2017. – Vol. 27, N. 6. – P. 2282-2291.
148. Бусько, Е.А. Дифференциальная ультразвуковая и соноэластографическая диагностика долькового рака молочной железы / Е.А. Бусько, Т.Т. Табагуа, А.В. Мищенко, В.В. Семиглазов // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. - 2013. - №2. -19 с.
149. Berg W.A. Shear-wave Elastography Improves the Specificity of Breast US: The BE1 Multinational Study of 939 Masses / W.A. Berg, D.O. Cosgrove, C.J. Doré, F.K.W. Schäfer, W.E. Svensson, R.J. Hooley, R. Ohlinger, E.B. Mendelson, C. Balu-Maestro, M. Locatelli, C. Tourasse, B.C. Cavanaugh, V. Juhan, A.T. Stavros, A. Tardivon, J. Gay, J.-P. Henry, C. Cohen-Bacrie, F.t.B. Investigators // Radiology. – 2012. – Vol. 262, N. 2. – P. 435-449.
150. Youk, J.H. Shear-wave elastography in breast ultrasonography: the state of the art / J.H. Youk, H.M. Gweon, E.J. Son // Ultrasonography. – 2017. – Vol. 36, N. 4. – P. 300-309.
151. Chang, J.M. Clinical application of shear wave elastography (SWE) in the diagnosis of benign and malignant breast diseases / J.M. Chang, W.K. Moon, N. Cho, A. Yi, H.R. Koo, W. Han, D.Y. Noh, H.G. Moon, S.J. Kim // Breast cancer research and treatment. – 2011. – Vol. 129, N. 1. – P. 89-97.
152. Barr, R.G. Effects of precompression on elasticity imaging of the breast: development of a clinically useful semiquantitative method of precompression assessment / R.G. Barr, Z. Zhang // Journal of Ultrasound in Medicine. – 2012. – Vol. 31, N. 6. – P. 895-902.

153. Evans, A. Quantitative shear wave ultrasound elastography: initial experience in solid breast masses / A. Evans, P. Whelehan, K. Thomson, D. McLean, K. Brauer, C. Purdie, L. Jordan, L. Baker, A. Thompson // *Breast Cancer Research*. – 2010. – Vol. 12, N. 6. – P. R104.
154. Wojcinski, S. Acoustic radiation force impulse imaging with Virtual Touch™ tissue quantification: mean shear wave velocity of malignant and benign breast masses / S. Wojcinski, K. Brandhorst, G. Sadigh, P. Hillemanns, F. Degenhardt // *International Journal of Women's Health*. – 2013. – Vol. 5. – P. 619-27.
155. Han, J. Reducing Unnecessary Biopsy of Breast Lesions: Preliminary Results with Combination of Strain and Shear-Wave Elastography / J. Han, F. Li, C. Peng, Y. Huang, Q. Lin, Y. Liu, L. Cao, J. Zhou // *Ultrasound in Medicine & Biology*. – 2019. – Vol. 45, N. 9. – P. 2317-2327.
156. Li, D.D. Combination of two-dimensional shear wave elastography with ultrasound breast imaging reporting and data system in the diagnosis of breast lesions: a new method to increase the diagnostic performance / D.D. Li, H.X. Xu, L.H. Guo, X.W. Bo, X.L. Li, R. Wu, J.M. Xu, Y.F. Zhang, K. Zhang // *European Radiology*. – 2016. – Vol. 26, N. 9. – P. 3290-300.
157. Chamming's, F. Supersonic Shear Wave Elastography of Response to Anti-cancer Therapy in a Xenograft Tumor Model / F. Chamming's, M.A. Le-Frere-Belda, H. Latorre-Ossa, V. Fitoussi, A. Redheuil, F. Assayag, L. Pidial, J.L. Gennisson, M. Tanter, C.A. Cuenod, L.S. Fournier // *Ultrasound in medicine & biology*. – 2016. – Vol. 42, N. 4. – P. 924-30.
158. Evans, A. Prediction of Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy for Primary Breast Cancer Comparing Interim Ultrasound, Shear Wave Elastography and MRI / A. Evans, P. Whelehan, A. Thompson, C. Purdie, L. Jordan, J. Macaskill, S. Waugh, F. Fuller-Pace, K. Brauer, S. Vinnicombe // *European Journal of Ultrasound*. – 2018. – Vol. 39, N. 4. – P. 422-431.

159. Lee, S.H. Shear-Wave Elastography for the Detection of Residual Breast Cancer After Neoadjuvant Chemotherapy / S.H. Lee, J.M. Chang, W. Han, H.G. Moon, H.R. Koo, H.M. Gweon, W.H. Kim, D.Y. Noh, W.K. Moon // *Annals of surgical oncology*. – 2015. – Vol. 22 Suppl 3. – P. S376-84.
160. Jing, H. Early Evaluation of Relative Changes in Tumor Stiffness by Shear Wave Elastography Predicts the Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Breast Cancer / H. Jing, W. Cheng, Z.Y. Li, L. Ying, Q.C. Wang, T. Wu, J.W. Tian // *Journal of ultrasound in medicine*. – 2016. – Vol. 35, N. 8. – P. 1619-27.
161. Athanasiou, A. Feasibility of Imaging and Treatment Monitoring of Breast Lesions with Three-Dimensional Shear Wave Elastography / A. Athanasiou, H. Latorre-Ossa, A. Criton, A. Tardivon, J.L. Gennisson, M. Tanter // *European Journal of Ultrasound*. – 2017. – Vol. 38, N. 1. – P. 51-59.
162. Krouskop, T.A. Elastic moduli of breast and prostate tissues under compression / T.A. Krouskop, T.M. Wheeler, F. Kallel, B.S. Garra, T. Hall // *Ultrasonic Imaging*. – 1998. – Vol. 20, N. 4. – P. 260-74.
163. Kuipers, E. J. Colorectal cancer / E.J. Kuipers, W.M. Grady, D. Lieberman, T. Seufferlein, J.J. Sung, P.G. Boelens, C.J. van de Velde, T. Watanabe // *Nature reviews. Disease primers*. – 2015. – Vol. 1. – P. 15065.
164. Федянин, М.Ю. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения / М.Ю. Федянин, С.И. Ачкасов, Л.В. Болотина, О.А. Гладков, В.В. Глебовская, С.С. Гордеев, А.М. Карачун, Н.А. Козлов, Л.Н. Любченко, О.А. Малихова, З.З. Мамедли, А.С. Петров, Д.В. Подлужный, С.А. Проценко, И.В. Рыков, Д.В. Сидоров, А.А. Трякин, А.С. Цуканов, Ю.А. Шельгин // *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO*. – 2019. – Vol. 9, N. 3s2. – P. 324-364.
165. Romero-Lopez, M. Recapitulating the human tumor microenvironment: Colon tumor-derived extracellular matrix promotes angiogenesis and tumor cell growth / M. Romero-Lopez, A.L. Trinh, A. Sobrino, M.M. Hatch, M.T.

- Keating, C. Fimbres, D.E. Lewis, P.D. Gershon, E.L. Botvinick, M. Digman, J.S. Lowengrub, C.C. Hughes // *Biomaterials*. – 2017. – Vol. 116. – P. 118-129.
166. Tang, X. Mechanical force affects expression of an in vitro metastasis-like phenotype in HCT-8 cells / X. Tang, T.B. Kuhlenschmidt, J. Zhou, P. Bell, F. Wang, M.S. Kuhlenschmidt, T.A. Saif // *Biophysical journal*. – 2010. – Vol. 99, N. 8. – P. 2460-9.
 167. Ali, M.Y. Reprogramming cellular phenotype by soft collagen gels / M.Y. Ali, C.Y. Chuang, M.T. Saif // *Soft Matter*. – 2014. – Vol. 10, N. 44. – P. 8829-37.
 168. Wei, B. Human colorectal cancer progression correlates with LOX-induced ECM stiffening / B. Wei, X. Zhou, C. Liang, X. Zheng, P. Lei, J. Fang, X. Han, L. Wang, C. Qi, H. Wei // *International journal of biological sciences*. – 2017. – Vol. 13, N. 11. – P. 1450-1457.
 169. Wijesinghe, P. Optical elastography on the microscale / P. Wijesinghe, B.F. Kennedy, D.D. Sampson // In: *Tissue Elasticity Imaging* / Edited by S.K. Alam and B.S. Garra. – Amsterdam: Elsevier, 2020. – P. 185-229.
 170. Schmitt, J. OCT elastography: imaging microscopic deformation and strain of tissue / J. Schmitt // *Optics express*. – 1998. – Vol. 3, N. 6. – P. 199-211.
 171. Sampson, D. Optical coherence tomography / D. Sampson, T.R. Hillman // In: *Lasers and Current Optical Techniques in Biology* / Edited by G. Palumbo, R. Pratesi, D.-P. Häder, and G. Jori. – The Royal Society of Chemistry, 2004. – P. 481-572.
 172. Wojtkowski, M. Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation / M. Wojtkowski, V.J. Srinivasan, T.H. Ko, J.G. Fujimoto, A. Kowalczyk, J.S. Duker // *Optics Express*. – 2004. – Vol. 12, N. 11. – P. 2404-2422.
 173. Mrejen, S. Optical coherence tomography: imaging of the choroid and beyond / S. Mrejen, R.F. Spaide // *Survey of ophthalmology*. – 2013. – Vol. 58, N. 5. – P. 387-429.

174. Tsai, T.H. Endoscopic Optical Coherence Tomography for Clinical Gastroenterology / T.H. Tsai, J.G. Fujimoto, H. Mashimo // *Diagnostics* (Basel). – 2014. – Vol. 4, N. 2. – P. 57-93.
175. Ferrante, G. Current applications of optical coherence tomography for coronary intervention / G. Ferrante, P. Presbitero, R. Whitbourn, P. Barlis // *International journal of cardiology*. – 2013. – Vol. 165, N. 1. – P. 7-16.
176. Sattler, E. Optical coherence tomography in dermatology / E. Sattler, R. Kastle, J. Welzel // *Journal of biomedical optics*. – 2013. – Vol. 18, N. 6. – P. 061224.
177. Vakoc, B.J. Cancer imaging by optical coherence tomography: preclinical progress and clinical potential / B.J. Vakoc, D. Fukumura, R.K. Jain, B.E. Bouma // *Nature reviews. Cancer*. – 2012. – Vol. 12, N. 5. – P. 363-8.
178. Kennedy, B.F. Improved measurement of vibration amplitude in dynamic optical coherence elastography / B.F. Kennedy, M. Wojtkowski, M. Szkulmowski, K.M. Kennedy, K. Karnowski, D.D. Sampson // *Biomedical Optics Express*. – 2012. – Vol. 3, N. 12. – P. 3138-52.
179. Kennedy, K.M. Quantitative micro-elastography: imaging of tissue elasticity using compression optical coherence elastography / K.M. Kennedy, L. Chin, R.A. McLaughlin, B. Latham, C.M. Saunders, D.D. Sampson, B.F. Kennedy // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5, N. 15538.
180. Kennedy, K.M. Analysis of mechanical contrast in optical coherence elastography / K.M. Kennedy, C. Ford, B.F. Kennedy, M.B. Bush, D.D. Sampson // *Journal of biomedical optics*. – 2013. – Vol. 18, N. 12. – P. 121508.
181. Dong, L. Volumetric quantitative optical coherence elastography with an iterative inversion method / L. Dong, P. Wijesinghe, D.D. Sampson, B.F. Kennedy, P.R.T. Munro, A.A. Oberai // *Biomedical optics express*. – 2019. – Vol. 10, N. 2. – P. 384-398.
182. Kennedy, K.M. Optical palpation: optical coherence tomography-based tactile imaging using a compliant sensor / K.M. Kennedy, S. Es'haghian, L.

- Chin, R.A. McLaughlin, D.D. Sampson, B.F. Kennedy // Optics letters. – 2014. – Vol. 39, N. 10. – P. 3014-7.
183. Zaitsev, V.Y. Practical obstacles and their mitigation strategies in compressional optical coherence elastography of biological tissues / V.Y. Zaitsev, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, E.V. Gubarkova, A.A. Sovetsky, M.A. Sirotkina, G.V. Gelikonov, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova, A. Vitkin // Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2017. – Vol. 10, N. 06. – P. 1742006.
 184. Zaitsev, V.Y. Optimized phase gradient measurements and phase-amplitude interplay in optical coherence elastography / V.Y. Zaitsev, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, G.V. Gelikonov, A.A. Sovetsky, A. Vitkin // Journal of biomedical optics. – 2016. – Vol. 21, N. 11. – P. 116005.
 185. Nahas, A. 3D static elastography at the micrometer scale using Full Field OCT / A. Nahas, M. Bauer, S. Roux, A.C. Boccara // Biomedical Optics Express. – 2013. – Vol. 4, N. 10. – P. 2138-49.
 186. Friedl, P. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity / P. Friedl, S. Alexander // Cell. – 2011. – Vol. 147, N. 5. – P. 992-1009.
 187. Larin, K.V. Optical coherence elastography - OCT at work in tissue biomechanics [Invited] / K.V. Larin, D.D. Sampson // Biomedical Optics Express. – 2017. – Vol. 8, N. 2. – P. 1172-1202.
 188. Li, C. Detection and characterisation of biopsy tissue using quantitative optical coherence elastography (OCE) in men with suspected prostate cancer / C. Li, G. Guan, Y. Ling, Y.T. Hsu, S. Song, J.T. Huang, S. Lang, R.K. Wang, Z. Huang, G. Nabi // Cancer letters. – 2015. – Vol. 357, N. 1. – P. 121-128.
 189. Allen, W.M. Wide-field quantitative micro-elastography of human breast tissue / W.M. Allen, K.M. Kennedy, Q. Fang, L. Chin, A. Curatolo, L. Watts, R. Zilkens, S.L. Chin, B.F. Dessauvage, B. Latham, C.M. Saunders,

- B.F. Kennedy // Biomedical optics express. – 2018. – Vol. 9, N. 3. – P. 1082-1096.
190. Gubarkova, E.V. OCT-elastography-based optical biopsy for breast cancer delineation and express assessment of morphological/molecular subtypes / E.V. Gubarkova, A.A. Sovetsky, V.Y. Zaitsev, A.L. Matveyev, D.A. Vorontsov, M.A. Sirotkina, L.A. Matveev, A.A. Plekhanov, N.P. Pavlova, S.S. Kuznetsov, A.Y. Vorontsov, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova // Biomedical optics express. – 2019. – Vol. 10, N. 5. – P. 2244-2263.
 191. Hadden, W.J. Stem cell migration and mechanotransduction on linear stiffness gradient hydrogels / W.J. Hadden, J.L. Young, A.W. Holle, M.L. McFetridge, D.Y. Kim, P. Wijesinghe, H. Taylor-Weiner, J.H. Wen, A.R. Lee, K. Bieback, B.N. Vo, D.D. Sampson, B.F. Kennedy, J.P. Spatz, A.J. Engler, Y.S. Choi // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – Vol. 114, N. 22. – P. 5647-5652.
 192. Pokharel, D. Deciphering Cell-to-Cell Communication in Acquisition of Cancer Traits: Extracellular Membrane Vesicles Are Regulators of Tissue Biomechanics / D. Pokharel, P. Wijesinghe, V. Oenarto, J.F. Lu, D.D. Sampson, B.F. Kennedy, V.P. Wallace, M. Bebawy // Omics: a journal of integrative biology. – 2016. – Vol. 20, N. 8. – P. 462-9.
 193. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных // Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 N 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».
 194. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 N 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики".
 195. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // «Этический кодекс», разработан и опубликован в 1985 году Советом международных научных организаций.

196. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов. — М.: Гриф и К. - 2012. — 944 с. — Р. 944 с.
197. Garcia, C.M.S. Morphological and immunophenotypical characterization of murine mammary carcinoma 4t1 / C.M.S. Garcia, M. De Araújo, M. Paz Lopes, M. Ferreira, G. Cassali // *Brazilian journal of veterinary pathology*. — 2014. — Vol. 7. — P. 158-165.
198. Pulaski, B.A. Mouse 4T1 breast tumor model / B.A. Pulaski, S. Ostrand-Rosenberg // *Current protocols in immunology*. — 2001. — Vol. Chapter 20. — P. Unit 20.2.
199. Zhao, X. Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer / X. Zhao, L. Li, T.K. Starr, S. Subramanian // *Oncotarget*. — 2017. — Vol. 8, N. 33. — P. 54775-54787.
200. Кузнецов, С.С. Закономерности морфологических изменений экспериментальных опухолей СТ-26 в ходе естественного роста / С.С. Кузнецов, Л.Б. Снопова, М.М. Карабут, М.А. Сироткина, Н.Л. Буянова, Т.И. Калганова, В.В. Елагин, И.В. Сенина-Волжская, Л.Н. Барбашова, Е.В. Загайнова, А. Vitkin, Н.Д. Гладкова // *Современные технологии в медицине*. — 2015. — Vol. 7. — P. 32-39.
201. Zhu, P. Catalpol suppressed proliferation, growth and invasion of CT26 colon cancer by inhibiting inflammation and tumor angiogenesis / P. Zhu, Y. Wu, A. Yang, X. Fu, M. Mao, Z. Liu // *Biomedicine & pharmacotherapy*. — 2017. — Vol. 95. — P. 68-76.
202. Orlova, A. Raster-scan optoacoustic angiography of blood vessel development in colon cancer models / A. Orlova, M. Sirotkina, E. Smolina, V. Elagin, A. Kovalchuk, I. Turchin, P. Subochev // *Photoacoustics*. — 2019. — Vol. 13. — P. 25-32.
203. Sirotkina, M.A. Photodynamic therapy monitoring with optical coherence angiography / M.A. Sirotkina, L.A. Matveev, M.V. Shirmanova, V.Y. Zaitsev, N.L. Buyanova, V.V. Elagin, G.V. Gelikonov, S.S. Kuznetsov, E.B.

- Kiseleva, A.A. Moiseev, S.V. Gamayunov, E.V. Zagaynova, F.I. Feldchtein, A. Vitkin, N.D. Gladkova // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 41506.
204. Sirotkina, M.A. Accurate early prediction of tumour response to PDT using optical coherence angiography / M.A. Sirotkina, A.A. Moiseev, L.A. Matveev, V.Y. Zaitsev, V.V. Elagin, S.S. Kuznetsov, G.V. Gelikonov, S.Y. Ksenofontov, E.V. Zagaynova, F.I. Feldchtein, N.D. Gladkova, A. Vitkin // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9, N. 1. – P. 6492.
205. Seo, I.S. Cross detection for odor of metabolic waste between breast and colorectal cancer using canine olfaction / I.S. Seo, H.G. Lee, B. Koo, C.S. Koh, H.Y. Park, C. Im, H.C. Shin // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, N. 2. – P. e0192629.
206. Elleuch, F. Deciphering the Biological Activities of *Dunaliella* sp. Aqueous Extract from Stressed Conditions on Breast Cancer: from in Vitro to in Vivo Investigations / F. Elleuch, P. Baril, M. Barkallah, F. Perche, S. Abdelkafi, I. Fendri, C. Pichon // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, N. 5. – P. 1719.
207. Сироткина, М.А. Разработка методики наблюдения экспериментальных опухолей с помощью многофункциональной оптической когерентной томографии: выбор оптимальной модели опухоли / М.А. Сироткина, Н.Л. Буянова, Т.И. Калганова, М.М. Карабут, В.В. Елагин, С.С. Кузнецов, Л.Б. Снопова, Г.В. Геликонов, В.Ю. Зайцев, Л.А. Матвеев, Е.В. Загайнова, А. Vitkin, Н.Д. Гладкова // *Современные технологии в медицине*. – 2015. – Vol. 7, N. 2. – P. 7.
208. Хельсинкская Декларация Всемирной Ассоциации Врачей Рекомендации для врачей, осуществляющих биомедицинские исследования // *Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра)*. – 1997. – Vol. 10. – P. 16-18.
209. Beck, A.H. Systematic analysis of breast cancer morphology uncovers stromal features associated with survival / A.H. Beck, A.R. Sangoi, S.

- Leung, R.J. Marinelli, T.O. Nielsen, M.J. van de Vijver, R.B. West, M. van de Rijn, D. Koller // *Science translational medicine*. – 2011. – Vol. 3, N. 108. – P. 108ra113.
210. Стенина, М.Б. Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы / М.Б. Стенина, Л.Г. Жукова, И.А. Королева, А.А. Пароконная, Т.Ю. Семиглазова, С.А. Тюляндин, М.А. Фролова // *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO*. – 2019. – Vol. 8, N. #3s2. – P. 113-144.
211. Remo, A. Morphology and Molecular Features of Rare Colorectal Carcinoma Histotypes / A. Remo, M. Fassan, A. Vanoli, L.R. Bonetti, V. Barresi, F. Tatangelo, R. Gafa, G. Giordano, M. Pancione, F. Grillo, L. Mastracci // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11, N. 7.
212. Bloom, H.J.G. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer / H.J.G. Bloom, W.W. Richardson // *British Journal of Cancer*. – 1957. – Vol. 11, N. 3. – P. 359-377.
213. Shia, J. Morphological characterization of colorectal cancers in The Cancer Genome Atlas reveals distinct morphology-molecular associations: clinical and biological implications / J. Shia, N. Schultz, D. Kuk, E. Vakiani, S. Middha, N.H. Segal, J.F. Hechtman, M.F. Berger, Z.K. Stadler, M.R. Weiser, J.D. Wolchok, C.R. Boland, M. Gönen, D.S. Klimstra // *Modern pathology*. – 2017. – Vol. 30, N. 4. – P. 599-609.
214. Gelikonov, V.M. Cross-polarization optical coherence tomography with active maintenance of the circular polarization of a sounding wave in a common path system / V.M. Gelikonov, V.N. Romashov, D.V. Shabanov, S.Y. Ksenofontov, D.A. Terpelov, P.A. Shilyagin, G.V. Gelikonov, I.A. Vitkin // *Radiophysics and Quantum Electronics*. – 2018. – Vol. 60, N. 11. – P. 897-911.
215. Shilyagin, P.A. Equidistant Recording of the Spectral Components in Ultra-Wideband Spectral-Domain Optical Coherence Tomography / P.A. Shilyagin, S.Y. Ksenofontov, A.A. Moiseev, D.A. Terpelov, V.A.

- Matkivsky, I.V. Kasatkina, Y.A. Mamaev, G.V. Gelikonov, V.M. Gelikonov // Radiophysics and Quantum Electronics. – 2018. – Vol. 60, N. 10. – P. 769-778.
216. Gelikonov, V.M. Electronic interface systems for goals of spectral domain optical coherence tomography / V.M. Gelikonov, G.V. Gelikonov, D.A. Terpelov, P.A. Shilyagin // Instruments and Experimental Techniques. – 2012. – Vol. 55, N. 3. – P. 392-398.
217. Ksenofontov, S.Yu. Application of Phase Correction for Compensation of Motion Artifacts in Spectral-Domain Optical Coherence Tomography / S.Y. Ksenofontov, P.A. Shilyagin, D.A. Terpelov, A.A. Novozhilov, V.M. Gelikonov, G.V. Gelikonov // Instruments and Experimental Techniques. – 2020. – Vol. 63, N. 1. – P. 126-132.
218. Ksenofontov, S.Yu. Application of the Method of Multiple Mutual Synchronization of Parallel Computational Threads in Spectral-Domain Optical Coherent Tomography Systems / S.Y. Ksenofontov // Instruments and Experimental Techniques. – 2019. – Vol. 62, N. 3. – P. 317-323.
219. Gelikonov, V.M. Optimization of Fizeau-based optical coherence tomography with a reference Michelson interferometer / V.M. Gelikonov, G.V. Gelikonov, P.A. Shilyagin // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2008. – Vol. 72, N. 1. – P. 93-97.
220. Sovetsky, A.A. Manually-operated compressional optical coherence elastography with effective aperiodic averaging: demonstrations for corneal and cartilaginous tissues / A.A. Sovetsky, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, D.V. Shabanov, V.Y. Zaitsev // Laser Physics Letters. – 2018. – Vol. 15. – P. 085602
221. Sovetsky A.A. OCT-based characterization of the nonlinear properties of biological tissues in various states / A.A. Sovetsky, E.V. Gubarkova, L.A. Matveev, A.L. Matveyev, M.A. Sirotkina, N.D. Gladkova, V.Y. Zaitsev // SPIE proceedings. – 2018. – Vol. 10685.

222. Matveyev, A.L. Vector method for strain estimation in phase-sensitive optical coherence elastography / A.L. Matveyev, L.A. Matveev, A.A. Sovetsky, G.V. Gelikonov, A.A. Moiseev, V.Y. Zaitsev // *Laser Physics Letters*. – 2018. – Vol. 15, N. 6. – P. 065603.
223. Zaitsev, V.Y. Manifestations of nonlinear elasticity of biological tissues in compressional optical coherence elastography / V.Y. Zaitsev, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, E.V. Gubarkova, A.A. Sovetsky, M.A. Sirotkina, G.V. Gelikonov, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova, A. Vitkin // *SPIE proceedings*. – 2017. – Vol. 10413.
224. Zaitsev, V.Y. Revealing structural modifications in thermomechanical reshaping of collagenous tissues using optical coherence elastography / V.Y. Zaitsev, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, G.V. Gelikonov, O.I. Baum, A.I. Omelchenko, D.V. Shabanov, A.A. Sovetsky, A.V. Yuzhakov, A.A. Fedorov, V.I. Siplivy, A.V. Bolshunov, E.N. Sobol // *Journal of Biophotonics*. – 2019. – Vol. 12, N. 3. – P. e201800250.
225. Wang, D. Cellular processing of platinum anticancer drugs / D. Wang, S.J. Lippard // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2005. – Vol. 4, N. 4. – P. 307-20.
226. Heskamp, S. Bevacizumab reduces tumor targeting of antiepidermal growth factor and anti-insulin-like growth factor 1 receptor antibodies / S. Heskamp, O.C. Boerman, J.D. Molkenboer-Kuenen, W.J. Oyen, W.T. van der Graaf, H.W. van Laarhoven // *International journal of cancer*. – 2013. – Vol. 133, N. 2. – P. 307-14.
227. Wang, Y. Investigation of the efficacy of a bevacizumab-cetuximab-cisplatin regimen in treating head and neck squamous cell carcinoma in mice / Y. Wang, L. Dong, Q. Bi, X. Li, D. Wu, X. Ge, X. Zhang, J. Fu, C. Zhang, C. Wang, S. Li // *Targeted oncology*. – 2010. – Vol. 5, N. 4. – P. 237-43.
228. Плеханов, А.А. Оптическая когерентная эластография в оценке биомеханических свойств опухоли в ходе химиотерапии: пилотное исследование / А.А. Плеханов, Е.В. Губарькова, А.А. Советский, В.Ю.

- Зайцев, Л.А. Матвеев, А.Л. Матвеев, Л.Б. Тимофеева, С.С. Кузнецов, Е.В. Загайнова, Н.Д. Гладкова, М.А. Сироткина // Современные технологии в медицине. – 2018. – Vol. 10, N. 3. – P. 9.
229. Plekhanov, A.A. Optical coherence elastography as a new method for estimation of chemotherapy efficacy on triple-negative breast cancer in the experiment / A.A. Plekhanov, M.A. Sirotkina, A.A. Sovetsky, E.V. Gubarkova, E.B. Kiseleva, V.Y. Zaitsev, L.A. Matveev, A.L. Matveyev, S.S. Kuznetsov, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova // SPIE proceedings. – 2019. – Vol. 11065. – P. 1106506.
230. Li, D. Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 potentiates the therapeutic effect of doxorubicin in a mouse 4T1 breast cancer model / D. Li, Q. Qin, X.Y. Wang, H.S. Shi, M. Luo, F.C. Guo, W. Wang, Y.S. Wang // Oncology reports. – 2014. – Vol. 31, N. 3. – P. 1287-95.
231. Yu, H. Triple-Layered pH-Responsive Micelleplexes Loaded with siRNA and Cisplatin Prodrug for NF-Kappa B Targeted Treatment of Metastatic Breast Cancer / H. Yu, C. Guo, B. Feng, J. Liu, X. Chen, D. Wang, L. Teng, Y. Li, Q. Yin, Z. Zhang, Y. Li // Theranostics. – 2016. – Vol. 6, N. 1. – P. 14-27.
232. Du, J. Establishment of an Experimental Breast Cancer ZHENG Model and Curative Effect Evaluation of Zuo-Jin Wan / J. Du, Y. Sun, X.F. Wang, Y.Y. Lu, Q.M. Zhou, S.B. Su // Evidence-based complementary and alternative medicine. – 2013. – Vol. 2013. – P. 324732.
233. Sengupta, P. Cholesterol-tethered platinum II-based supramolecular nanoparticle increases antitumor efficacy and reduces nephrotoxicity / P. Sengupta, S. Basu, S. Soni, A. Pandey, B. Roy, M.S. Oh, K.T. Chin, A.S. Paraskar, S. Sarangi, Y. Connor, V.S. Sabbiseti, J. Koppam, A. Kulkarni, K. Muto, C. Amarasiriwardena, I. Jayawardene, N. Lupoli, D.M. Dinulescu, J.V. Bonventre, R.A. Mashelkar, S. Sengupta // Proceedings of the National

- Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – Vol. 109, N. 28. – P. 11294-11299.
234. Paraskar, A. Rationally engineered polymeric cisplatin nanoparticles for improved antitumor efficacy / A. Paraskar, S. Soni, S. Basu, C.J. Amarasiriwardena, N. Lupoli, S. Srivats, R.S. Roy, S. Sengupta // *Nanotechnology*. – 2011. – Vol. 22, N. 26. – P. 265101-265101.
 235. Zhao, J. rNAPc2 Inhibits Colorectal Cancer in Mice through Tissue Factor / J. Zhao, G. Aguilar, S. Palencia, E. Newton, A. Abo // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – Vol. 15, N. 1. – P. 208-216.
 236. Zibara, K. Anti-angiogenesis therapy and gap junction inhibition reduce MDA-MB-231 breast cancer cell invasion and metastasis in vitro and in vivo / K. Zibara, Z. Awada, L. Dib, J. El-Saghir, S. Al-Ghadban, A. Ibrik, N. El-Zein, M. El-Sabban // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 12598.
 237. Dings, R.P.M. Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and Avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization / R.P.M. Dings, M. Loren, H. Heun, E. McNiel, A.W. Griffioen, K.H. Mayo, R.J. Griffin // *Clinical cancer research*. – 2007. – Vol. 13, N. 11. – P. 3395-3402.
 238. Mollard, S. Model driven optimization of antiangiogenics + cytotoxics combination: application to breast cancer mice treated with bevacizumab + paclitaxel doublet leads to reduced tumor growth and fewer metastasis / S. Mollard, J. Ciccolini, D.-C. Imbs, R. El Cheikh, D. Barbolosi, S. Benzekry // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, N. 14. – P. 23087-23098.
 239. Lv, Y. Effect of bevacizumab combined with chemotherapy at different sequences in the gastric-cancer-bearing nude mice / Y. Lv, L. Song, L. Chang, X. Zhang, Y. Liu, W. Liu // *Journal of cancer research and therapeutics*. – 2018. – Vol. 14, N. Supplement. – P. S190-s196.
 240. Tomayko, M.M. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice / M.M. Tomayko, C.P. Reynolds // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 1989. – Vol. 24, N. 3. – P. 148-54.

241. Friess, T. Combination treatment with erlotinib and pertuzumab against human tumor xenografts is superior to monotherapy / T. Friess, W. Scheuer, M. Hasmann // *Clinical cancer research*. – 2005. – Vol. 11, N. 14. – P. 5300-9.
242. Bankhead, P. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis / P. Bankhead, M.B. Loughrey, J.A. Fernández, Y. Dombrowski, D.G. McArt, P.D. Dunne, S. McQuaid, R.T. Gray, L.J. Murray, H.G. Coleman, J.A. James, M. Salto-Tellez, P.W. Hamilton // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7, N. 1. – P. 16878.
243. Plekhanov, A.A. Histological validation of in vivo assessment of cancer tissue inhomogeneity and automated morphological segmentation enabled by optical coherence elastography / A.A. Plekhanov, M.A. Sirotkina, A.A. Sovetsky, E.V. Gubarkova, S.S. Kuznetsov, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova, V.Y. Zaitsev // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, N. 11781. – P. 1-16.
244. Sirotkina, M.A. In vivo assessment of functional and morphological alterations in tumors under treatment using OCT-angiography combined with OCT-elastography / M.A. Sirotkina, E.V. Gubarkova, A.A. Plekhanov, A.A. Sovetsky, V.V. Elagin, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, S.S. Kuznetsov, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova, V.Y. Zaitsev // *Biomedical Optics Express*. – 2020. – Vol. 11, N. 3. – P. 1365-1382.
245. Resende, U. Prognostic assessment of breast carcinoma submitted to neoadjuvant chemotherapy with pathological non-complete response / U. Resende, C. Cabello, S.O.B. Ramalho, L.C. Zeferino // *BMC Cancer*. – 2019. – Vol. 19, N. 1. – P. 601.
246. Sutton, T.L. Surgical timing following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer affects postoperative complication rates / T.L. Sutton, N. Johnson, A. Schlitt, S.K. Gardiner, J.R. Garreau // *American Journal of Surgery*. – 2020. – Vol. 219, N. 5. – P. 741-745.

247. Plekhanov, A.A. Determining morphological structures' stiffness values of tumor tissue by optical coherence elastography / A.A. Plekhanov, M.A. Sirotkina, V.Y. Zaitsev, E.V. Gubarkova, S.S. Kuznetsov, E.N. Grigoreva, A.A. Sovetsky, L.A. Matveev, A.L. Matveyev, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova // SPIE proceedings. – 2020. – Vol. 11457. – P. 1145707.
248. Plekhanov, A.A. Optical coherence elastography to determine the high- and low-grade colon adenocarcinoma / A.A. Plekhanov, M.A. Sirotkina, A.A. Sovetsky, S.S. Kuznetsov, L.A. Matveev, V.E. Zagainov, E.V. Gubarkova, A.L. Matveyev, E.V. Zagaynova, V.Y. Zaitsev, N.D. Gladkova // SPIE proceedings. – 2021. – Vol. 11645, N. 116450X. – P. 1-6.
249. Huang, D. Optical coherence tomography / D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Chang, M.R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C.A. Puliafito, J.G. Fujimoto // Science. – 1991. – Vol. 254, N. 5035. – P. 1178-81.
250. Плеханов, А.А. Способ прижизненной оценки микроструктуры опухолевой ткани в эксперименте / А.А. Плеханов, М.А. Сироткина, Е.В. Губарькова, В.Ю. Зайцев, А.А. Советский, С.С. Кузнецов, Л.А. Матвеев, А.Л. Матвеев, Е.В. Загайнова, Н.Д. Гладкова // Патент на изобретение № 2732823; приоритет от 22.04.2020, регистрация от 22.09.2020. – 2020.