

Авраамова София Таризловна

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

14.03.02 – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, доцент

Кириллов Юрий Александрович

Официальные оппоненты:

Волченко Надежда Николаевна - доктор медицинских наук, профессор, Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел онкоморфологии, заведующая отделом

Поминальная Виктория Михайловна – кандидат медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени Д.Д. Плетнёва Департамента здравоохранения города Москвы», патологоанатомическое отделение, заведующая отделением

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «17» «мая» 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991 Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2.

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

Автореферат диссертации разослан «____» «_____» 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук,

доцент



Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы: Разработка новых и усовершенствование существующих методов и технологий диагностики злокачественных новообразований предстательной железы является одним из приоритетных направлений современной онкоурологии. Повышенный интерес к данной проблеме обусловлен ежегодным увеличением показателя заболеваемости раком предстательной железы (РПЖ) (свыше 600 тыс. новых случаев) во всем мире, а также увеличением его частоты среди мужчин работоспособного возраста (Кельн А.А., и соавт., 2019) . Сложность ранней диагностики РПЖ объясняется преимущественной локализацией очагов карциномы в периферических отделах железы, что при небольших размерах образования не приводит к сдавлению уретры и появлению первичной симптоматики в виде затруднения мочеиспускания (Каприн А.Д., и соавт., 2014). Кроме того, применение стандартных методов диагностики, включающих пальцевое ректальное исследование ПЖ, определение в сыворотке крови больного простатспецифического антигена (ПСА) и проведение трансректального ультразвукового исследования ПЖ, часто бывает недостаточным для распознавания РПЖ, и единственным методом, с помощью которого представляется возможность поставить диагноз РПЖ, остается традиционное гистологическое исследование биоптата. Другие методы дооперационной диагностики, в частности, магнитно-резонансная томография, компьютерная томография органов малого таза, не обладают высокими показателями специфичности, что связано с низкой интенсивностью сигнала при сочетании РПЖ с дистрофическими и воспалительными заболеваниями (Тучин В.В., 2005). В связи с этим проблема разработки новых технологий ранней до- и интраоперационной диагностики РПЖ продолжает оставаться актуальной.

Цель исследования: разработать алгоритм дооперационной и интраоперационной морфоспектроскопической диагностики рака предстательной железы с использованием технологии раман-люминесцентной спектроскопии.

Задачи исследования:

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

доброкачественной гиперплазии и рака предстательной железы и показателями, полученными при их спектральном исследовании.

Научная новизна исследования:

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

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

Основные положения, выносимые на защиту:

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

участков железы для оптимизации диагностики опухоли.

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

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

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

Внедрение результатов исследования в практику: Результаты исследований используются в практической работе при анализе биопсийного материала, чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре патологической анатомии имени академика А.И. Струкова

Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова ФГАОУ ВО Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

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

Публикации результатов работы: По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, и 1 в международной базе данных Scopus.

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

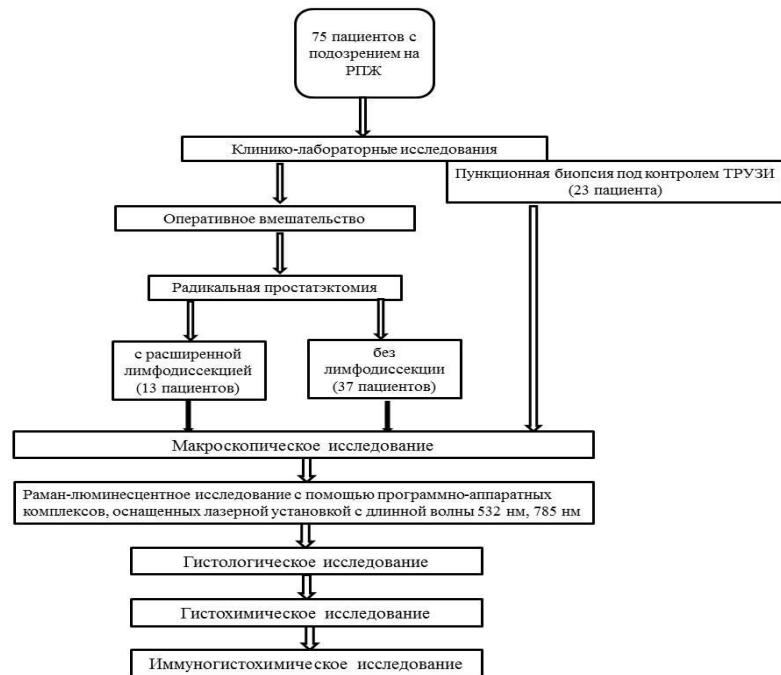
Материалы и методы исследования

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

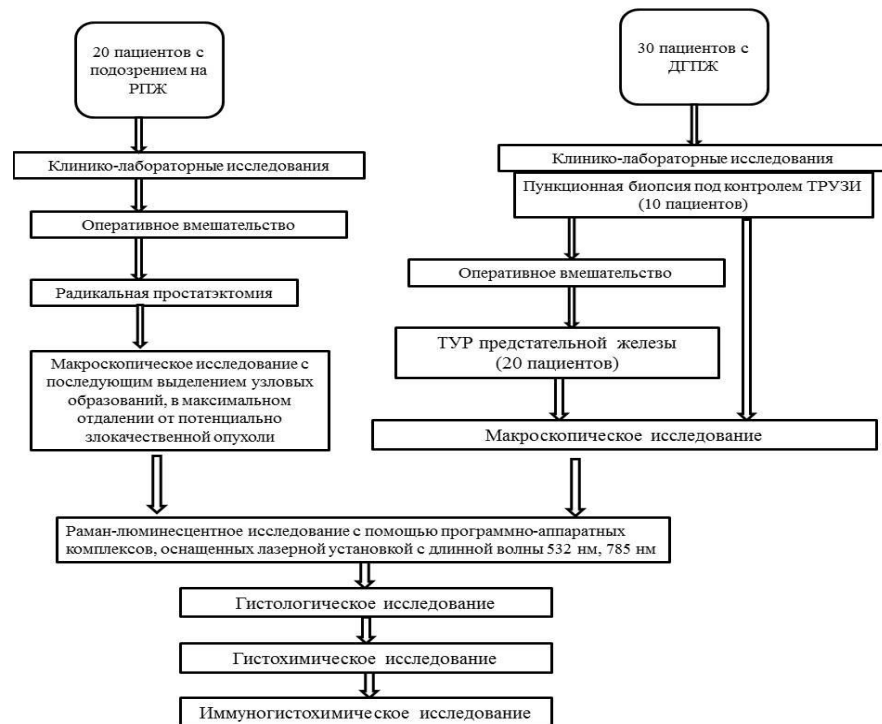
Группу сравнения составили 50 образований, полученных от больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ), которым в связи с затрудненным мочеиспусканием была выполнена трансуретральная резекция (20 образцов) или пункционная биопсия железы (10 образцов), кроме того исследованию подверглись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

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

умерших составил 36 лет.



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



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

Морфологические методы исследования. Морфологическое исследование проводилось на

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

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

Гистологическое исследование проводилось на операционном материале предстательных желез с подозрением на рак после радикальной простатэктомии (n=375 блоков) и биоптатах ПЖ (n=300 блоков), полученных при мультифокальной пункционной биопсии. При стандартном гистологическом исследовании с окрашиванием гематоксилином и эозином во всех наблюдениях устанавливали тип опухоли, степень дифференцировки согласно шкале Глисона в модификации J.Epstein et al (2016), при возможности (в образцах, полученных в ходе радикальной простатэктомии) - наличие положительных хирургических краев и экстрапростатическое распространение. Положительными хирургические края резекции считали в случаях, при которых комплексы аденокарциномы контактировали с краем простаты, при этом измеряли число положительных блоков, линейный размер края в миллиметрах. Экстрапростатическое распространение включало в себя наличие опухолевых клеток в перипростатической жировой клетчатке, перинеуральных пространствах сосудисто-нервного пучка, регионарных лимфатических узлах. Стадия опухолевого процесса оценивалась в соответствии с классификацией TNM UICC 8-го пересмотра (2017 г.).

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

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

Иммуногистохимическое исследование материала проводили на парафиновых срезах с использованием авидин-биотиновым методом с докрасиванием гематоксилином. Использованы моноклональные антитела (разведение 1:100) к высокомолекулярному цитокератину (HMWCK, клон 34βE12), α-метилацил-CoA-рацемазе – AMACR (p504s). Интенсивность экспрессии оценивали визуально (0, 1+, 2+, 3+). Каждое

иммуногистохимическое исследование проводилось с постановкой положительного и отрицательного контроля для исключения вероятности получения ложнонегативных и ложнопозитивных результатов.

Окончательный результат определяли по следующим критериям:

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

Раман-люминесцентная спектроскопия. При выборе раман-люминесцентного анализатора одним из основных параметров является длина волны излучения лазера, встроенного в спектрометр. И хотя рамановский сдвиг любого материала зависит только от его химических свойств и не зависит от длины волны возбуждения, различные длины волн лазеров все же имеют свои сильные и слабые стороны. Несомненным плюсом применения лазера длины волны 532 является простота «визуальной» интерпретации результатов исследования, в частности за счет преобладания люминесцентной составляющей в спектральной картине. Данный прибор оказался единственным лазером, имеющим рабочий диапазон 175 – 4000 см⁻¹, что позволило использовать его для анализа веществ, содержащих –NH и –ОН функциональные группы. Вместе с тем, глубина проникновения лазерного луча составила лишь 1-3 мм, что ограничило вероятность эффективной диагностики образований с помощью данного лазера лишь поверхностно расположенными, либо на их ступенчатых срезах. Лазерная установка с длиной волны 785 нм характеризуется большей специфичностью полученных результатов, обусловленной идентификацией индивидуального набора специфических рамановских пиков, характерных для определенной ткани. Кроме того, лазер с длиной волны 785 нм характеризуется значительно большей глубиной проникновения в ткани (1 см), что способствует улучшению интраоперационной диагностики новообразований, выявлению метастазов даже при локализации их в лимфатических узлах, заключенных в жировую клетчатку. Учитывая, что каждый вариант лазерной установки позволяет получить различную информацию об исследуемой ткани, спектроскопическое исследование в настоящей работе проводили с помощью двух программно-аппаратных комплексов:

1. ИнСпектр R532, состоящего из микроскопа Olympus и спектрометра, разработанного ООО «ИнСпектр» (РУ №РЗН 2015/2419 от 18.05.2015). Длина волны лазерного излучения - 532 нм, размер лазерного пятна в фокусе - 10 мкм в диаметре, мощность лазера 10 мВт. Управление прибором, регистрацию и запись спектров производили с помощью специальной компьютерной

программы ИнСпектр, также разработанной сотрудниками ООО «ИнСпектр» (г. Черноголовка). Программа осуществляла идентификацию химических веществ, соединений и отдельных молекул, регистрировала изменения их количественного и качественного состава в изучаемых группах по спектрам, сочетающим явления рамановского рассеяния и флуоресценции.

2. Измерительная система, состоящая из узкополосного источника возбуждения – лазера LML-785.0RB-04 (мощность излучения на выходе из пробника 200 мВт, длина волны излучения 785 нм), оптический модуль фильтрации RPB785 (InPhotonics) и регистрирующий приемник – спектрограф Sharmrock SR-500i с интегрированной камерой ANDOR DV-420A-OE.

Алгоритм применения раман-люминесцентной спектроскопии в настоящем исследовании состоял из нескольких этапов:

1. Исследуемый операционный образец ткани предстательной железы, полученный в ходе операции радикальной простатэктомии или ТУР, предварительно фиксированный в 10% растворе формалина, подвергали стандартной методики обработки макропрепарата (Пушкарь Д.Ю., и соавт., 2015), но без маркировки поверхности красителями для исключения артефактов спектроскопического исследования.

2. Перед проведением морфологических методов исследования объект исследования (операционный или биопсийный материал ПЖ) поочередно располагали на предметном стекле, локализованном на движущейся подложке раман-люминесцентного спектрометра с длиной волны 532 нм, затем рамановского спектрометра с длиной волны 785 нм со всей площади образца.

3. Спектры рамановского рассеяния света и сигнала флуоресценции с исследуемого объекта записывали на компьютер с помощью специального программного обеспечения, благодаря чему не только регистрировали спектр, но и автоматически сравнивали полученный спектральный сигнал с эталонными спектрами веществ, хранящимися в базе данных. Результаты регистрации спектра представляли в виде графика, на оси ординат которого фиксировали интенсивность рамановского излучения, и на оси абсцисс – сдвиг рамановского излучения, выражающийся в волновых числах (см^{-1}). При необходимости перевода « см^{-1} » рамановского сдвига в «нм» применяли онлайн-конвертер электронного ресурса <http://photonetc.com/>.

4. В последующем исследуемый объект в неизменном виде направляли на последующее морфологическое исследование.

Статистические методы исследования. Статистическую обработку данных выполняли на персональном компьютере с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ StatisticaforWindows 10,0 (Stat.Softinc.США). Все полученные

количественные, анамнестические, клинические, лабораторные и инструментальные данные обрабатывали с помощью метода вариационной статистики.

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

Полученные данные, будучи по своей сути многомерными и многопараметрическими (длина волны рассеянного излучения, интенсивность флуоресценции и рамановского рассеяния) анализировали с использованием метода дискриминантного анализа с помощью проекции на латентные структуры (PLS-DA). Перед применением метода PLS-DA регистрируемые данные были избавлены от шума методом Савицкого-Голея (SavitzkyA., 1964) и фонового излучения методом коррекции опорной линии с использованием ассиметричных наименьших квадратов (BaekS.-J., 2015). Все методы предобработки и многомерный анализ были реализованы в онлайн программном обеспечении TPrcloudbeta.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты морфологического и спектроскопического исследований образцов рака предстательной железы

При макроскопическом исследовании образцов с РПЖ в 74,7% опухолевые узлы выявлены в периферической области железы, 21,3 % - в периуретральной, и в 4% установлено диффузное прорастание. При исследовании гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, во всех случаях была диагностирована ацинарная аденокарцинома, образованная железистыми структурами различными по размерам и конфигурации, с наличием признаков ядерной атипии. Распределение наблюдений по степени дифференцировки согласно шкале Глисона в модификации 2016 года представлено в таблице 3. В некоторых случаях встречались редкие варианты ацинарной аденокарциномы: атрофический – 4 случая (5,3%), пенистоклеточный – 3 случая (4%), псевдогиперпластический – 2 случая (2,7%). При оценке суммы Глисона в операционном материале периневральная инвазия выявлена в 7 наблюдениях (14%), инвазия в капсулу без её прорастания выявлена в 5 случаях (10%), поражение семенных пузырьков – 4 случая (8%). Ни в одном случае не было выявлено распространения опухоли на соседние структуры, а также метастазирования в регионарные лимфоузлы. Таким образом,

распределение случаев по стадиям согласно классификации TNM сложилось следующим образом: pT2a - 10 (20%), pT2b - 12 (24%), pT2c – 17 (34%), pT3a -0 (0%), pT3b - 4 (8%).

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

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

На светооптическом уровне опухоль во всех случаях имела неоднородную структуру, и помимо тяжей из атипичных клеток, выявлялись гиперпластические или пренеопластические процессы. С целью подтверждения наличия или отсутствия опухолевой трансформации в подозрительных участках, было проведено ИГХ-исследование, по результатам которого во всех 75 образцах были идентифицированы участки, характеризующиеся отсутствием маркера базальных клеток – HMWCK, и выраженной экспрессией AMACR, что подтвердило диагноз ацинарной аденокарциномы (Рисунок 3), а также позволило исключить в 8% случаев очаговую простатическую атрофию от атрофической формы аденокарциномы.

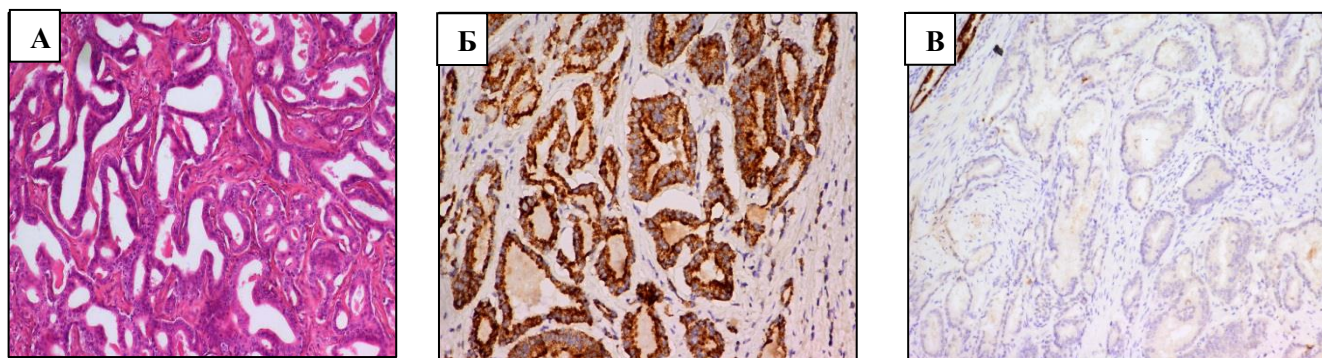


Рисунок 3. Образец ацинарной аденокарциномы, 7 баллов по Глисону (4+3). А.

Вариабельность форм и размеров желез. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х20. Б.

Выраженная реакция ИГХ окрашивания опухолевых клеток к AMACR. Ув.х20. В.

Отрицательная реакция опухолевых клеток к HMWCK. Ув.х10.

Раман-люминесцентные спектры образцов ацинарной аденокарциномы разных градаций Глисона, зарегистрированные с помощью спектрометра длиной волны 532 нм в 96,7% имели одинаковую конфигурацию в виде параболы, значительно растянутой по оси абсцисс. При этом в подавляющем большинстве наблюдений рамановские пики отсутствовали. Вместе с тем,

набор остальных параметров во всех случаях был достаточен для отнесения исследуемого образца к той или иной градации Глисона. Так, несмотря на то, что значения интенсивности начальной (инициальной) люминесценции варьировали в диапазоне от 1 до 12 тыс. отн. ед., удалось выявить определенную закономерность: образцам с высокой степенью дифференцировки соответствовали умеренные показатели люминесценции, как правило, не превышающие 1000 ± 100 относительных единиц и, наоборот, для образцов опухолей с низкой степенью дифференцировки были характерны показатели значительно большей интенсивности – 9000-12000 относительных единиц. Хотя локальный максимум люминесценции для образцов всех градаций Глисона был зарегистрирован на одной и той же частоте Рамановского сдвига соответствующей 2000 ± 47 см^{-1} и был обусловлен люминесценцией эндогенных порфиринов, значения максимальной его интенсивности зависели от степени атипии опухолевого узла. В частности, для высокодифференцированной ацинарной аденокарциномы (<5 баллов по Глисон) были характерны умеренные значения интенсивности люминесценции локального максимума (<12 тыс. отн.ед.) в отличие от менее дифференцированных образцов, которым соответствовали вдвое-втрое большие значения интенсивности (>30 тыс. отн.ед.) (Рисунок 4).

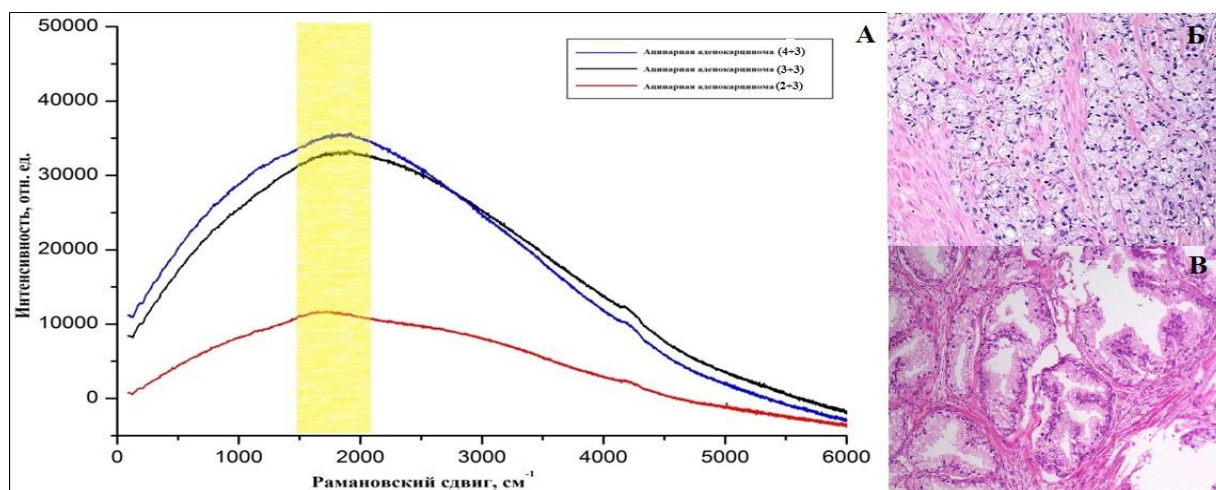


Рисунок 4. А. Корреляция интенсивности Рамановского рассеяния в зависимости от дифференцировки ацинарной аденокарциномы согласно шкале Глисона. Область локального максимума выделена желтым.. Б. Образец ацинарной аденокарциномы (4+3), соответствующий зарегистрированному спектру. Окраска гематоксилином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

Особенностью пенистоклеточного варианта аденокарциномы являются отчетливо выраженные единичные Рамановские пики в точках 1057 см^{-1} и 1465 см^{-1} оси абсцисс, соответствующие молекулярным вибрациям липидов (Рисунок 5). Вероятней всего, в формирование свободных рамановских пиков липидов вносят вклад «дефектные» лизосомы новообразованных опухолевых клеток ацинарной карциномы, неспособные должным образом

«утилизировать» продукты окисления белков и липидов, что способствуют увеличению количества липофусцина.

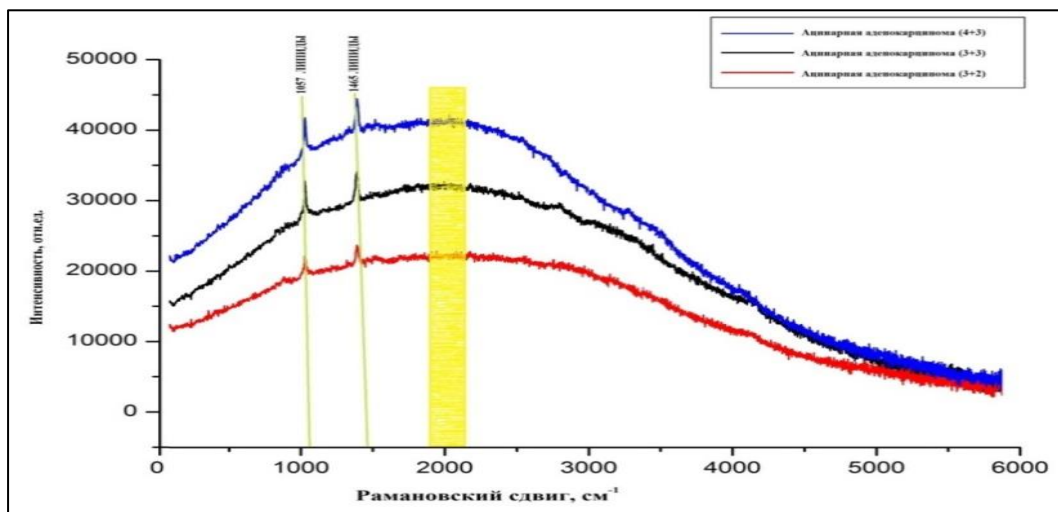


Рисунок 5. Раман-люминесцентные спектры образцов ацинарной аденокарциномы со светлой цитоплазмой различных степеней дифференцировки. Область локального максимума выделена желтым. Рамановские пики обозначены числовыми значениями, соответствующие рассеянию молекул липидов

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

Использование Раман-спектроскопа с длиной волны 785 нм позволило более детально распознать молекулярный состав опухолевых клеток ацинарно йаденокарциномы. Рамановские спектры паренхиматозной составляющей ацинарной аденокарциномы, представленной преимущественно атипичными железистыми структурами, характеризуются бесчисленным количеством пиков в диапазоне $300\text{-}1900\text{ см}^{-1}$: 762 см^{-1} (ДНК), 820 см^{-1} (коллаген 1 типа), 840 см^{-1} (полисахариды), 989 см^{-1} (β -глюкоза), 1032 см^{-1} (фенилаланин), 1104 см^{-1} (сахаридная связь), 1131 см^{-1} (пальмитиновая кислота), 1176 см^{-1} (гуанин, цитозин), 1240 см^{-1} (РНК), 1298 см^{-1} (жирные кислоты), 1323 см^{-1} (гуанин), 1400 см^{-1} (глутаминовая кислота), 1441 см^{-1} (холестерин и его эфиры), 1482 см^{-1} (амид II), 1546 см^{-1} (свободный и связанный НАДН), $1480, 1600, 1629, 1650\text{ см}^{-1}$ (амид I) (Рисунок 6). Кроме того, отмеченная ранее зависимость

между степенью атипичности опухоли и интенсивностью рассеяния в спектрах, зарегистрированных с помощью лазерной установки с длиной волны 532 нм, прослеживалась и при фиксации спектров, лазерной установки длиной волны 785 нм. Так, наибольшая интенсивность пиков Рамановского рассеяния отмечалась в низкодифференцированных образцах, что согласно шкале градации Глисона соответствовала показателям 8 и 9 баллам, соответственно случаи с высоко и умереннодифференцированными (≤ 7 баллов), напротив, на спектре имели более низкие показатели интенсивности пиков ($p < 0,05$).



Рисунок 6. А. Рамановский спектр паренхиматозного компонента ацинарной аденокарциномы 7 (4+3) баллов по Глисона в диапазоне 330-1950 см^{-1} . Б. Рамановский спектр паренхиматозного компонента ацинарной аденокарциномы 7 (4+3) баллов по Глисона в диапазоне 600-1800 см^{-1} .

Рамановский спектр стромального компонента опухоли отличался от паренхиматозного, прежде всего, преобладанием пиков рамановского рассеяния молекул коллагена (933 см^{-1} , 1035 см^{-1} , 1401 см^{-1} , 1488 см^{-1}), гликогена (484-490 см^{-1}), $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ -связи молекул коллагена, эластина и фосфолипидов, по-видимому, входящих в состав гладкомышечных и эластических волокон (Рисунок 7).

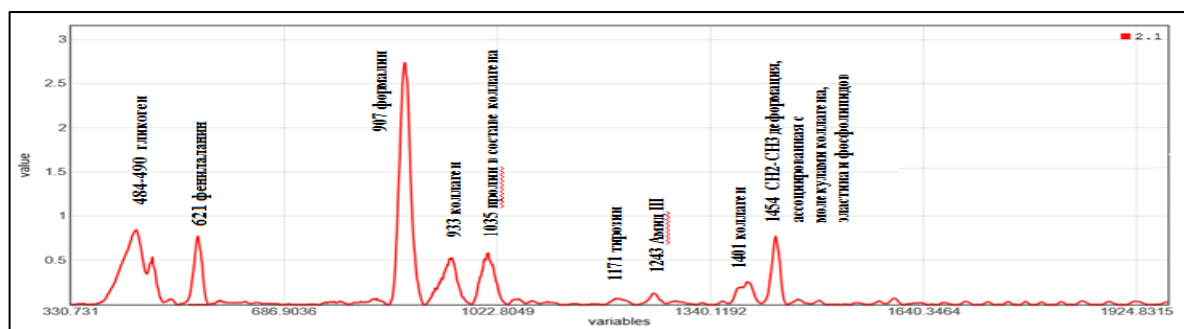


Рисунок 7. Рамановский спектр стромального компонента ацинарной аденокарциномы 7 (4+3) баллов по Глисона.

В 12 случаях (16%) помимо «типичных» спектров аденокарциномы также удалось зарегистрировать спектры очагов простатической интраэпителиальной неоплазии высокой степени, которые визуально практически полностью повторяли конфигурацию опухолевых спектров как по частоте рамановского сдвига, так и по их интенсивности рассеяния. Исключение составили 3 области Рамановского сдвига – 956 см^{-1} , 1528 см^{-1} (отражающие

вибрации молекул каротиноидов), и 1685 (Амид I), характерные для всех исследуемых случаев с ПИН ВС, и отсутствующие в случаях с аденокарциномой ($p > 0,05$) (Рисунок 8).

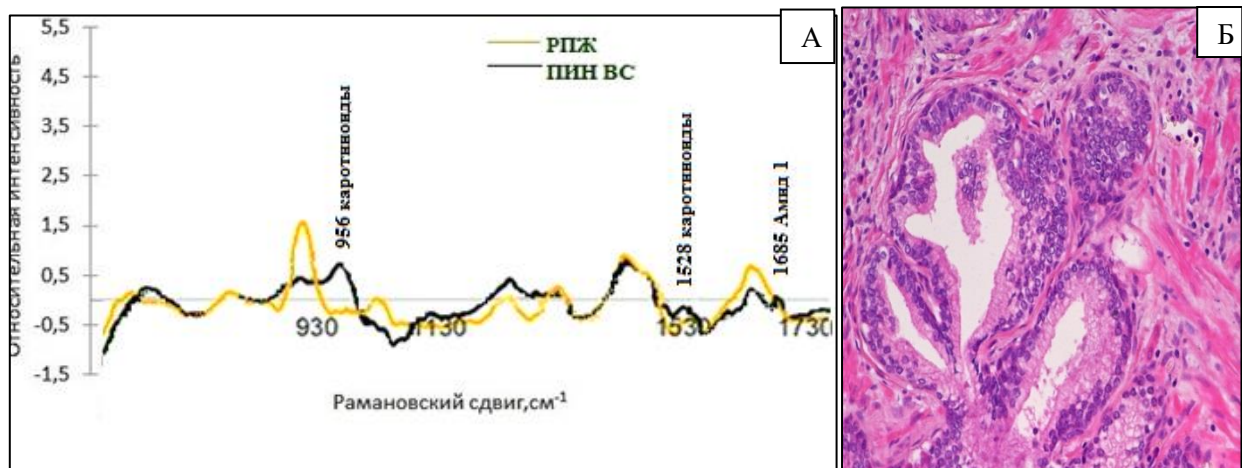


Рисунок 8. Результаты морфологического и спектроскопического исследования участка ПИН ВС в образце ацинарной карциномы 6 баллов по Глисона. А.

Сопоставление спектров аденокарциномы и ПИН ВС. «Специфические» для ПИН ВС Рамановские пики обозначены числовыми значениями. Б. Область регистрации спектра – участок ПИН ВС. Окр. ГиЭ. ув.40.

Результаты морфологического и спектроскопического исследований образцов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы

При гистологическом исследовании образцов группы сравнения были выявлены типичные узловатые образования из хаотично расположенных желез с выраженным стромальным компонентом. Ацинусы неравномерно увеличены во всех направлениях, вариабельны по форме и размерам, характеризуются внутриацинарной пролиферацией эпителия в виде сосочков или криброзных структур. При иммуногистохимическом исследовании преобладала высокая (92%) и умеренная (8%) интенсивность окрашивания для НМWSK в участках гиперплазированной ткани. В 99,2% наблюдений при использовании антител к АМАСР участки гиперплазии не меняли окраску.

Раман-люминесцентные спектры образцов узловой гиперплазии аденоматозной формы, зарегистрированные с помощью спектрометра длиной волны 532 нм, характеризовались «подавлением» люминесценцией пиков рамановского рассеяния. При этом спектры имели вид одnogорбого спектра с максимальным пиком в области $300 \pm 27 \text{ см}^{-1}$, образованным люминесценцией ароматической аминокислотой триптофаном. Спектры фиброаденоматозной формы узловой гиперплазии с выраженным фиброзно-мышечным компонентом по своей конфигурации были идентичны спектрам железистой формы, однако в 21,33% случаях железистого варианта регистрировался пик рамановского рассеяния в точке 299 см^{-1} ,

характеризующий вибрации молекулы коллагена (Рисунок 9).

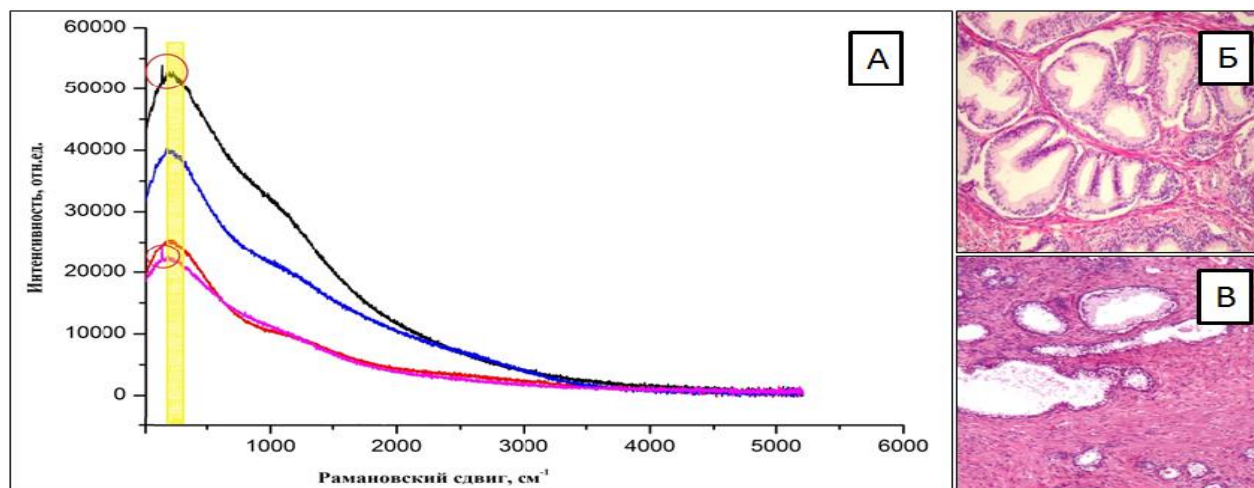


Рисунок 9. Результаты морфологического и спектроскопического исследований. А. Раман-люминесцентные спектры различных вариантов ДГПЖ. Б. Железистый вариант ДГПЖ. В. Фиброаденоматозная форма ДГПЖ.

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

Спектры образцов ДГПЖ, зарегистрированные с помощью лазерной установки длинной волны 785, имели множество рамановских пиков, большее число которых совпадало с определяемыми рамановскими пиками образцов с аденокарциномой: 762 см^{-1} (ДНК), $820, 937\text{ см}^{-1}$ (коллаген 1 типа), 840 см^{-1} (полисахариды), 989 см^{-1} (β -глюкоза), 1104 см^{-1} (сахаридная связь), 1131 см^{-1} (пальмитиновая кислота), 1176 см^{-1} (гуанин, цитозин), 1240 см^{-1} (РНК), 1298 см^{-1} (жирные кислоты), 1323 см^{-1} (гуанин), 1400 см^{-1} (глутаминовая кислота), 1441 см^{-1} (холестерин и его эфиры), 1482 см^{-1} (амидII), 1546 см^{-1} (свободный и связанный НАДН), $1480, 1600, 1629, 1650\text{ см}^{-1}$ (амидI) (Рисунок 10). При этом значительная часть веществ отличалась по интенсивности рамановского сдвига, что характеризует различия их количественного состава в изучаемых группах.

Результаты спектроскопического исследования убедительно свидетельствуют, что концентрация холестерина и его эфиров (1441 см^{-1}), а также жирных кислот (1298 см^{-1}) в опухолевых клетках аденокарциномы в несколько раз выше по сравнению с клетками при узловой гиперплазии железы. Моно- и полисахариды превалировали в группе с гиперпластическими изменениями за исключением β -глюкозы, содержание которой в образцах аденокарциномы было в пять раз выше по сравнению с образцами ДГПЖ, что, видимо, связано с её замедленной утилизацией опухолевыми клетками. Выявление спектроскопически

повышенного содержания глутаминовой кислоты (1400 см^{-1}) в образцах с аденокарциномой по сравнению с ДГПЖ подтвердило предположение об эффекторной роли глутамин в образовании липидов *denovo*, и, как следствие, стимуляции роста опухоли. К числу отличительных особенностей следует также отнести обнаруживаемые на спектрах Рамановские пики аминокислот: пролина, входящего в состав коллагена 1 типа (937 см^{-1}) и определяемого в группе с узловой гиперплазией, и фенилаланина (1031 см^{-1}), напротив, идентифицируемого в образцах с аденокарциномой.



Рисунок 10. Сопоставление спектров образцов аденокарциномы и ДГПЖ.

Рамановские пики обозначены числовыми значениями.

Рамановский спектр мезенхимальной составляющей узловой гиперплазии характеризовался набором специфических «пигов» на 75% схожим по компонентному составу с аналогичным спектром аденокарциномы, исключение составили области рамановского сдвига - 573 см^{-1} (триптофан/цитозин), 669 см^{-1} (цистин, в составе коллагена 1 типа), 1122 см^{-1} (порфирины) (Рисунок 11).

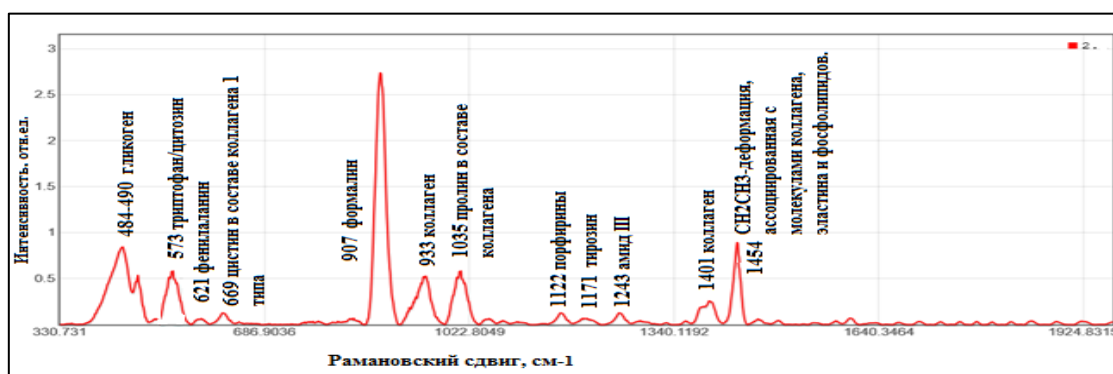


Рисунок 11. Рамановский спектр стромального компонента образца ДГПЖ.

Рамановские пики обозначены числовыми значениями.

Результаты морфологического и спектроскопического исследований образцов группы контроля

Как уже было отмечено в разделе, касающемся описания материала и методов исследования, образцы ткани предстательной железы были получены у лиц, причина смерти которых была не

связана с её патологией. Отсутствие изменений было подтверждено при жизни как клиническими данными, так и лабораторными исследованиями, предусмотренными Стандартами обследования и лечения больных с той или иной патологией. При макроскопическом исследовании ПЖ соответствовали нормальным размерам (3,0х4,0х2,0 см) и характеризовались конусовидной формой. На разрезе ПЖ доли были симметричны, однородного вида, серовато-красного цвета. Гистологически во всех исследованных случаях признаки патологии на светооптическом уровне отмечены не были.

Спектроскопически образцы ПЖ контрольной группы характеризовались выраженной «двугорбой» формой спектра, свойственной нормальным неповрежденным тканям. Показатели начальной флуоресценции соответствовали высоким значениям интенсивности и располагались в области 45000 по оси относительных единиц. Локальные максимумы отмеченные в точке 1030 см^{-1} (обусловленный суммарной люминесценцией липопигментов и флавинов), и в точке 2000 см^{-1} (обусловленный люминесценцией эндогенных порфиринов) характеризовались высокими значениями интенсивности превышающие 60 тыс. отн. ед. (Рисунок 12).

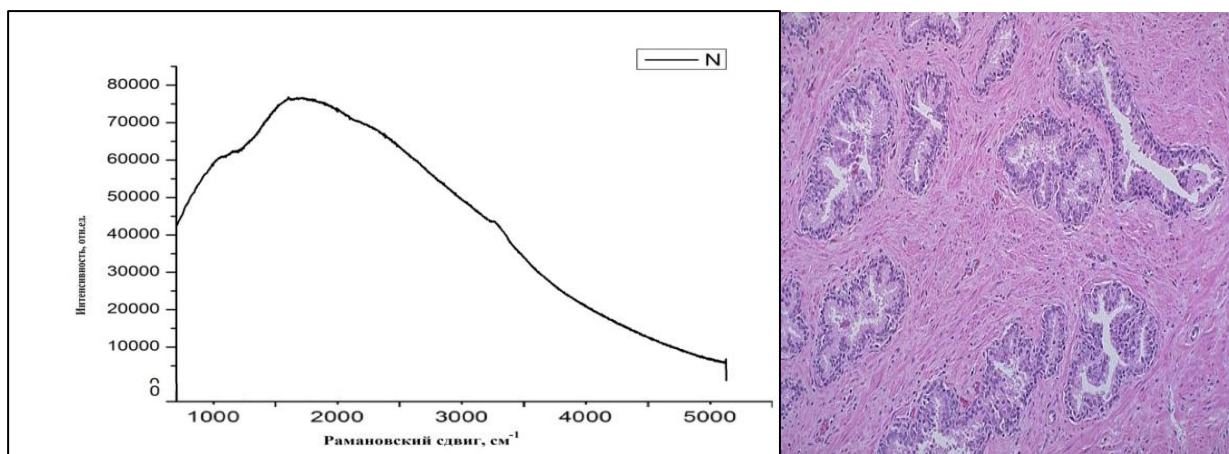


Рисунок 12. Раман-люминесцентный спектр образца из группы контроля.

Локальный максимум флуоресценции обозначен желтой вертикальной линией.

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

Спектры образцов группы контроля, зарегистрированные с помощью лазерной установки длинной волны 785, характеризовались набором Рамановских пиков, большее число которых совпадало с определяемыми Рамановскими пиками образцов с аденокарциномой: 762 см^{-1} (ДНК), $820, 937\text{ см}^{-1}$ (коллаген I типа), 840 см^{-1} (полисахариды), 1240 см^{-1} (РНК), 1298 см^{-1} (жирные кислоты), 1323 см^{-1} (гуанин), 1400 см^{-1} (глутаминовая кислота), 1480 см^{-1} (амид II), 1650 см^{-1} (амид I) (Рисунок 13), однако значения интенсивности их рассеяния не совпадали.

Колебания молекул нуклеиновых кислот (1082 см^{-1} , 1200 см^{-1}), и коллагена 1 типа (937 см^{-1}) были отнесены к числу «диагностических» для образцов группы контроля в виду их полного отсутствия в спектрах образцов с РПЖ и ДГПЖ.



Рисунок 13. Сопоставление спектров образцов группы контроля и ацинарной аденокарциномы. Рамановские пики обозначены числовыми значениями.

При спектроскопическом анализе стромального компонента образцов из группы контроля, отмечено, что преобладающим компонентом изученных тканей является коллаген, вибрации молекул которого соответствовали значениям 669 см^{-1} , 933 см^{-1} , 1035 см^{-1} , 1401 см^{-1} , 1454 см^{-1} , 1655 см^{-1} и 1666 см^{-1} рамановского сдвига (Рисунок 14). Кроме того, в 3 образцах, полученных от самых старших в этой группе мужчин (39 и 40 лет), было отмечено появление рамановского пика фенилаланина (621 см^{-1}) с значением интенсивности не превышающем 0,1 (100) отн.ед. При сопоставлении аналогичных спектров образцов РПЖ и ДГПЖ, выявлено совпадение набора Рамановских пиков на 43,75% и 85,7%, соответственно.

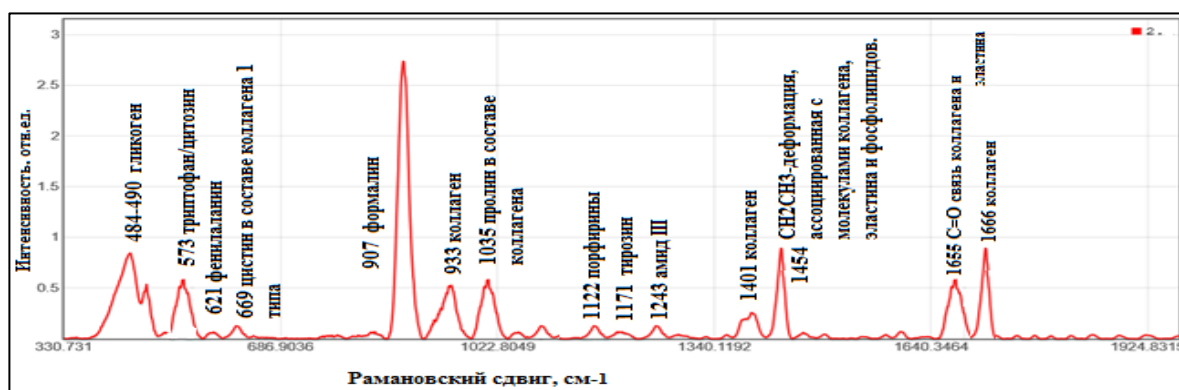


Рисунок 14. Рамановский спектр стромального компонента образца группы контроля. Рамановские пики обозначены числовыми значениями.

Анализ эффективности метода раман-люминесцентной спектроскопии в диагностике рака предстательной железы

Анализ эффективности раман-люминесцентной спектроскопии в диагностике рака предстательной железы оценивали с помощью метода проекций на латентные структуры с

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

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

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

В результате проведенного исследования и анализа литературных данных об использовании метода раман-люминесцентной спектроскопии для диагностики заболеваний

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

Выводы

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Авраамова С. Т.**, Александров Н. С., Кириллов Ю. А., Кукушкин В. И., Пауков В. С. Состояние и перспективы разработки технологий до- и интраоперационной диагностики рака предстательной железы (обзор литературы)// **Медицинская наука и образование Урала.** – № 1/2016. – С. – 117-122.
2. **Avraamova S.**, Aleksandrov N., Kirillov U. Raman-fluorescence spectroscopy: Applications in diagnostics of prostate cancer/Virchows Archive European Journal of Pathology. – Vol. 469. – S.1. 2016. P. – S223.
3. **Авраамова С.Т.**, Александров Н.С., Кириллов Ю.А. Опыт использования раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике рака предстательной железы // Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». – М. – 2016. – С.4-5
4. Н.С. Александров, **С.Т. Авраамова**, Ю.А. Кириллов, Т.О. Бабичева, В.И. Кукушкин, Д.Н. Артемьев. Использование метода раман-флуоресцентной спектроскопии для диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака. **Клиническая и экспериментальная морфология.** – 2017. – № 4 (24) . – С. 59-65.
5. **Авраамова С.Т.**, Александров Н.С., Кириллов Ю.А. Применение раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике рака простаты // Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов/М. – 2017. – С.20.
6. **Авраамова С. Т.**, Александров Н. С., Бабичева Т.О., Кириллов Ю. А., Кукушкин В. И. Возможности применения рамановской спектроскопии в онкоурологии//Пространство и время. – №1. – 2017. – С. 247-251.
7. Александров Н.С., **Авраамова С.Т.**, Кириллов Ю.А., Безруков Е.А., Кондрашина А.В., Кукушкин В.И. Перспективы использования раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике почечно-клеточного рака// Вопросы андрологии и урологии.2018. №4(6). С.43-49.
- 8.А.А. Lykina, D. N. Artemyev, V.I. Kukushkin, I.A. Bratchenko, **S.T. Avraamova**, N.S. Aleksandrov. Multivariate analysis of tissues Raman spectra using regression methods. **Journal of Physics: Conf. Series.** – 1368 (2019). doi:10.1088/1742-6596/1368/2/022042.
9. **Авраамова С.Т.**, Александров Н.С., Кириллов Ю.А., Кукушкин В.И. Артемьев Д.Н. Опыт применения раман-флуоресцентной спектроскопии в диагностике рака простаты. **Морфология.** – 2019. – №2. – Т.155. – С.8.
10. Лыкина А.А., Артемьев Д.Н., Кукушкин В.И., Братченко И.А., **Авраамова С.Т.**, Александров Н.С. Многомерный анализ рамановских спектров биологических тканей с помощью регрессионного анализа. В сборнике: Сборник трудов ИТНТ-2019. – 2019. – С. 298-302.

11. **Avraamova S.**, Aleksandrov N., Timofeev S., Kirillov Y. Application of Raman-fluorescence spectroscopy for diagnosis of prostate cancer. Virchows Archive European Journal of Pathology. Vol. 475. – S.1. – 2019. – P. 199-200.

12. **С.Т. Авраамова**, Н.С. Александров, Ю.А. Кириллов. Возможности применения рамановской спектроскопии в диагностике рака простаты. Научная конференция с международным участием, посвященная 170-летию кафедры патологической анатомии им. академика А.И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, 20 марта 2019 года): сборник тезисов. – С. 8.

13. **Авраамова С.Т.**, Александров Н.С., Кириллов Ю.А., Кукушкин В.И., Артемьев Д.Н. Морфологическая и спектроскопическая характеристика рака предстательной железы. Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». – 2020. – М. – С.3.

Список сокращений:

ПЖ – предстательная железа

РПЖ – рак предстательной железы

ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия предстательной железы

ПИН ВС – простатическая интраэпителиальная неоплазия

Отн.ед. – относительные единицы

См⁻¹ – обратный сантиметр

TNM - аббревиатура от Tumor, Nodus и Metastasis

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

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

PLS-DA - Partialleastsquares- DiscriminantAnalysis (метод дискриминантного анализа с помощью проекции на латентные структуры)