

**М. В. Кручинина^{1,3}, В. Н. Кручинин², В. А. Володин²
Я. И. Прудникова¹, А. А. Громов¹**

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» ул. Б. Богаткова, 175/1, Новосибирск, 630089, Россия

² Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН пр. Акад. Лаврентьева, 13, Новосибирск, 630090, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский институт Минздрава России Красный пр., 52, Новосибирск, 630091, Россия

kruchmargo@yandex.ru

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА СЫВОРОТКИ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ С РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ МЕТАСТАЗОВ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Исследованы спектры комбинационного рассеяния света (КРС) образцов жидкой сыворотки крови у 68-ми человек: 19-ти условно здоровых лиц без онкологической патологии и 49-ти человек с колоректальным раком (разделенных на 3 группы в зависимости от локализации метастазов) с целью определить возможности использования КРС жидкой сыворотки крови в дифференцировании пациентов с колоректальным раком (КРР) с различной локализацией метастазов. Интенсивности пиков при 1005, 1157 и 1520 см⁻¹ в КРС-спектрах у больных КРР по сравнению со здоровыми лицами оказались достоверно ниже, коррелируя со стадией заболевания и наличием метастазов, что позволяет рассматривать КРС сыворотки крови как перспективный диагностический подход при колоректальном раке, в том числе на ранних стадиях развития болезни. Диагностическая точность данного метода при проведении ROC-анализа в дифференцировании местно-регионарного КРР от метастатического составила AUC = 0,91 (0,82; 0,95) (95 % доверительный интервал), в различении пациентов с метастазами в печень от таковых внепеченочных – AUC = 0,73.

Ключевые слова: комбинационное рассеяние света, сыворотка крови, колоректальный рак.

Введение

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований и по смертности занимает второе место в мире среди онкологических заболеваний [1; 2]. Определение стадии заболевания остается наиболее значимым фактором в прогнозе общей выживаемости. У больных с I стадией заболевания после хирургического лечения 5-летняя выживаемость составляет более 90 %, в

то время как в метастатической форме заболевания (IV стадия) она не превышает 5 %. При этом раннее выявление отдаленных метастазов (МТС) даже в продвинутых стадиях КРР предполагает резекцию отдельных метастатических узлов с последующим улучшением прогноза. Вместе с тем весьма актуальна оценка эффективности проведенной терапии в отдаленные сроки [3; 4].

Поэтому наряду с использованием традиционных подходов в скрининге КРР и мониторинговании пациентов поиск новых

Кручинина М. В., Кручинин В. Н., Володин В. А., Прудникова Я. И., Громов А. А. Спектроскопия комбинационного рассеяния света сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком с различной локализацией метастазов (пилотное исследование) // Сибирский физический журнал. 2018. Т. 13, № 2. С. 95–100.

чувствительных методов и высокоспецифичных маркеров заболевания с акцентом на ранние стадии, а также раннее выявление прогрессирования (в том числе с выявлением локализации отдаленных МТС) остаются важными клиническими задачами [5].

Среди современных подходов, используемых в диагностике онкологических заболеваний, спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС, Raman-спектроскопия) в настоящее время занимает особое место как чувствительный, неразрушающий, малоинвазивный аналитический метод [6; 7]. Кроме того, КРС не требует сложной пробоподготовки; для исследования можно использовать различные ткани и жидкости организма в неизменном виде, что особенно важно для биологии и медицины [8; 9]. Метод КРС с успехом использовался для медицинской диагностики (в том числе диагностики онкологических заболеваний) в последние десятилетия [6–9]. Цель данного исследования – определить возможности использования КРС сыворотки крови в дифференцировании пациентов с колоректальным раком с различной локализацией МТС.

Материалы и методы

Обследованы 68 человек: 19 условно здоровых лиц (средний возраст 53 ± 8 лет) без онкологической патологии, патологии внутренних органов и 49 пациентов (средний возраст 52 ± 9 лет, 22 женщины, 27 мужчин) с КРР различных локализаций. Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от локализации метастазов: в 1 группу вошли 15 пациентов с местно-регионарным КРР (7 из них имели вторую, 8 – третью стадию заболевания), 2 группу составили 18 больных с МТС только в печень (12 из них имели одиночные МТС, остальные – множественные, размеры узлов варьировали от 16 до 92 мм в диаметре). Третья группа включала 16 пациентов с внепеченочными МТС (в том числе в надключичные лимфоузлы, легкие, кости, головной мозг).

Исследование выполнено с одобрения Комитета биомедицинской этики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (29.11.2016, протокол № 123). Все

пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Использовалась сыворотка крови обследуемых, полученная центрифугированием цельной крови, взятой натощак, со скоростью 2 000 об./мин в течение 20 мин.

Спектры КРС жидкой сыворотки крови пациентов записывались в диапазоне $500–2000 \text{ см}^{-1}$ с помощью спектрометра с тройным монохроматором T64000 (Horiba Jobin Yvon, France) при комнатной температуре. Для возбуждения использовалась линия Ag^+ лазера с длиной волны 514,5 нм, спектральное разрешение составляло $1,5 \text{ см}^{-1}$. В качестве детектора использовалась кремниевая матрица фотоприемников, охлаждаемая жидким азотом. Применялась приставка для микроскопических исследований КРС. Мощность лазерного пучка, доходящего до образца, составляла 2–3 мВт (размер пятна 5–6 мкм). При анализе спектров КРС оценивали интенсивность пиков в условных единицах. В качестве эталонного сигнала при записи спектров КРС от каждой серии образцов использовался сигнал от монокристаллического кремния; этот сигнал был стабилен с точностью до 1–2%. Условия для записи всех спектров КРС были абсолютно одинаковыми: мощность лазера стабилизирована, размер пятна и глубина резкости контролировались с помощью микроскопа с точностью в несколько процентов, сигнал собирался с приповерхностного слоя сывороток. Так как все сыворотки были визуально прозрачны в видимом свете, глубина этого слоя определялась не поглощением и диффузным рассеянием света в сыворотке, а глубиной резкости используемого объектива, которая составляла несколько микрометров. Стабильные условия экспериментов позволяют сравнивать интенсивность пиков КРС с высокой степенью достоверности.

Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона в случае, когда распределение подчинялось нормальному закону; в случаях отклонения распределения от нормального закона использовались непараметрические критерии (U -критерий Манна – Уитни, Колмогорова – Смирнова). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Для оценки значимости интенсивности пиков Raman-спектров с точки зрения дифференцирования пациентов с КРР

с метастазами различных локализаций был использован ROC-анализ.

Результаты и обсуждение

Площади пиков в диапазоне 1 005–1 520 см⁻¹ Raman-спектров оказались достоверно ниже у больных КРР по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,0001-0,05$) (рис. 1), коррелируя со стадией процесса ($r = -0,68, p < 0,001$) и наличием метастазов ($r = -0,57, p < 0,003$). При этом соотношение интенсивности пиков 1157/1520 см⁻¹ было наибольшим в группе сравнения с последующим достоверным снижением от группы с местно-регионарными метастазами к группе с метастазами в печень ($p < 0,05-0,01$). У пациентов с внепеченочными метастазами интенсивность

всех пиков спектра оказалась минимальной (рис. 1, кривая 4).

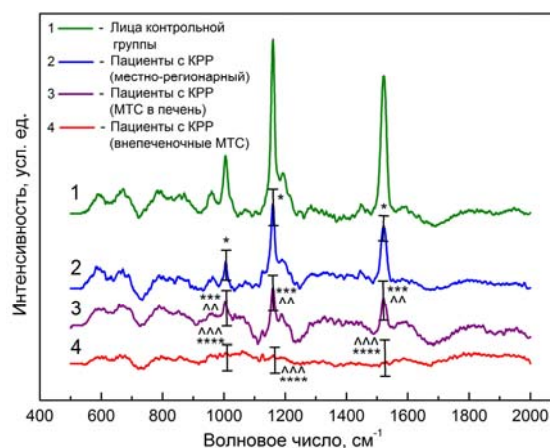


Рис. 1. Спектры комбинационного рассеяния света образцов жидкой сыворотки крови больных КРР и лиц группы сравнения

Площадь пиков комбинационного рассеяния света у больных с КРР с различной локализацией МТС и в группе сравнения ($M \pm m$)

| Положение пика, см ⁻¹ | Площадь пика, усл. ед. | | | |
|----------------------------------|---------------------------|---|---|--|
| | группа сравнения (n = 19) | 1 группа КРР местно-регионарный (Т2–3) (n = 15) | 2 группа КРР МТС в печень (Т4) (n = 18) | 3 группа КРР внепеченочные МТС (Т4) (n = 16) |
| 1005 | 990 ± 84 | 557 ± 103 * | 387 ± 90 ***^ | 129 ± 78 ***^^## |
| 1157 | 2570 ± 301 | 2004 ± 264 * | 908 ± 115 ***^^ | 712 ± 132 *****## |
| 1520 | 3258 ± 190 | 2404 ± 162 ** | 714 ± 135 ***^^^ | 474 ± 108 *****## |

Примечание: М – среднее значение; m – стандартная ошибка среднего; * – статистическая значимость (p) отличия от группы сравнения (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,02$, *** – $p < 0,0001$); ^ – статистическая значимость (p) отличия от 1-й группы (^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,02$, ^^ – $p < 0,0001$); # – статистическая значимость (p) отличия от 2-й группы (# – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$).

Наиболее выраженное дифференцирование пациентов с различной локализацией метастазов выявлено по интенсивности пиков при 1005, 1157, 1520 см⁻¹ (см. таблицу). По данным ROC-анализа для совокупности пиков по выявлению метастатических стадий (группы 2 и 3) от регионарного КРР (группа 1) AUC составила 0,91 (0,82; 0,95) (95 % доверительный интервал). Дифференцирование между пациентами с МТС только в печень (группа 2) и внепеченочными (группа 3) установило AUC = 0,73 (рис. 2).

К настоящему времени в литературе нет единого строгого мнения о принадлежности этих пиков, хотя большинство авторов связывают их появление с группой каротинов, чаще с β-каротином. Внешне спектр β-каротина [10] очень похож на спектры, наблюдаемые в нашей и других работах, где исследовалась сыворотка крови [10; 11]. Тем не менее, поскольку сыворотка крови имеет сложный биохимический состав, который весьма трудно полностью описать, мы бы не стали приписывать появление

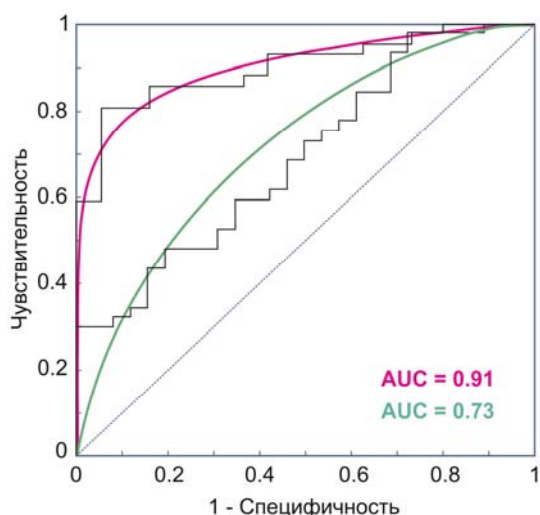


Рис. 2. ROC-анализ диагностической значимости метода КРС (для всей совокупности пиков 1005–1520 см^{-1} спектра). Красная кривая – дифференцирование пациентов с местно-регионарным КРР (группа 1) от таковых с метастатическим КРР (группы 2 и 3); AUC = 0,91. Зеленая кривая – дифференцирование пациентов с МТС в печень (группа 2) от таковых с внепеченочными метастазами (группа 3); AUC = 0,73

этих пиков строго β -каротину, хотя его вклад в характерный вид спектра, вероятно, весьма велик. Одна из современных точек зрения на различный уровень β -каротина в сыворотке крови пациентов с КРР и лиц группы сравнения заключается в ключевой роли β -каротина в пролиферации и апоптозе раковых клеток [11]. У лиц без онкологической патологии уровни пиков, приписываемых β -каротину велики, что указывает на нормальный уровень метаболизма и большой вклад в апоптоз чужеродных клеток, тогда как у пациентов с колоректальным раком уровень сигналов β -каротина значительно снижается. Возможно, его синтез в организме подавляется метаболитами растущей опухоли, причем уменьшение сигнала коррелирует с тяжестью заболевания. Строго говоря, различная интенсивность пиков спектров КРС в определенной степени отражает существующие различия в интегральных метаболомических профилях сывороток крови пациентов с КРР [12]. Метаболомический профиль изменяется в зависимости от локализации опухоли, и ответ хозяина на опухоль может меняться при развитии метастазирования [13]. Метастатическая болезнь биологически отлична от рака, не выходящего за пределы ткани про-

исхождения. Многие другие агрессивные опухоли провоцируют более (или менее) бурный ответ хозяина [14], который может также отличаться из-за локального воздействия опухоли. Например, опухоль может оказывать множество паракринных эффектов на микроокружение, кроме того, метаболические или воспалительные ответы окружающих нормальных тканей могут отличаться в случаях локализации метастазов в кишечнике, печени и других местах [15]. Подобные сдвиги, вероятно, сказываются на выраженности и соотношении пиков спектров КРС, демонстрирующих интегральный метаболомический профиль [16], что позволяет различить пациентов с КРР с различной локализацией МТС.

Заключение

Таким образом, с помощью спектроскопии КРС сыворотки крови установлены достоверные различия интенсивности пиков, их соотношения, ассоциированные с различной локализацией метастазов у пациентов с КРР. Исследование сыворотки крови, предполагающее малую инвазивность, проведение анализа образцов в течение короткого временного интервала, получение данных по достаточной диагностической точности позволяют считать спектроскопию комбинационного рассеяния света перспективной в разработке новых диагностических подходов при колоректальном раке, в том числе на ранних стадиях и для выявления прогрессирования заболевания. Следует заметить, что специфичность предлагаемого теста вне использованных групп невелика: известно, что многие раковые заболевания уменьшают сигналы в спектрах КРС сыворотки крови при 1005, 1157, 1520 см^{-1} , наблюдаемые и в нашей работе [17]. Более того, тяжелые системные или инфекционные заболевания типа цирроза печени, туберкулеза или пневмонии также способны уменьшать эти сигналы, что говорит об универсальной роли каротинов в метаболизме клеток. Тем не менее, спектроскопия КРС вполне может быть использована при создании простой скрининговой методики, что потребует дальнейших исследований в данном направлении для проведения внутренней и внешней валидации методики с большим объемом выборки обследуемых пациентов.

Список литературы

1. Bartos A., Bartos D., Szabo B., Breazu C., Opincariu I., Mironiu A., Iancu C. Recent achievements in colorectal cancer diagnostic and therapy by the use of nanoparticles // *Drug Metabolism Reviews*. 2016. Vol. 48. No. 1. P. 27–46.
2. Fang L., Xuzhen Q., Haiquan C., Ling Q., Yumei G., Hui L., Guoqiang C., Gaoguang S., Xiaodong W., Fenjie L., Shuai G., Baohua W., Zhili Li. Lipid profiling for early diagnosis and progression of colorectal cancer using direct-infusion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013. Vol. 27. P. 24–34.
3. Bunger S., Haug U., Kelly M., Posorski N., Klempt-Giessing K., Cartwright A., Fitzgerald S. P., Toner V., McAleer D., Gemoll T., Laubert T., Buning J., Fellermann K., Bruch H.-P., Roblick U. J., Brenner H., von Eggeling F., Habermann J. K. A novel multiplex-protein array for serum diagnostics of colon cancer: a case-control study // *BMC Cancer*. 2012. Vol. 12. P. 393–404.
4. Pathak S., Pandanaboyana S., Daniels I., Smart N., Prasad K. R. Obesity and colorectal liver metastases: Mechanisms and management // *Surg. Oncol.* 2016. Vol. 25. P. 246–251.
5. Sepulveda A. R., Hamilton S. R., Allegra C. J., Grody W., Cushman-Vokoun A. M., Funkhouser W. K. et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology // *J. Mol. Diagn.* 2017. Vol. 19. No. 2. P. 187–225.
6. Moreira L. M., Silveira L. Jr., Santos F. V., Lyon J. P., Rocha R., Zangaro R. A., Villaverde A. B., Pacheco M. T. T. Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis // *Spectroscopy*. 2008. Vol. 22. P. 1–19.
7. Shaoxin L., Gong C., Yanjiao Z., Zhouyi G., Zhiming L., Junfa X., Xueqiang L., Lin L. Identification and characterization of colorectal cancer using Raman spectroscopy and feature selection techniques // *Optical Society of America*. 2014. Vol. 22. No. 21. P. 25895–25908.
8. Jenkins C. A., Lewis P. D., Dunstan P. R., Harris D. A. Role of Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy in colorectal cancer // *World J. Gastrointest. Oncol.* 2016. Vol. 8. No. 5. P. 427–438.
9. Jing W., Duo L., Juqiang L., Yun Yu., Zufang H., Yanping C., Jinyong L., Shanyuan F., Buhong L., Nenrong L., Rong C. Label-free detection of serum proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy for colorectal cancer screening // *Journal of Biomedical Optics*. 2014. Vol. 19. No. 8. P. 087003(1–9).
10. Medipally D. K., Maguire A., Bryant J., Armstrong J., Dunne M., Finn M., Lyng F. M., Meade A. D. Development of a high throughput (HT) Raman spectroscopy method for rapid screening of liquid blood plasma from prostate cancer patients // *Analyst*. 2016.
11. Jang S. H., Lim J. W., Kima H. Mechanism of β -carotene-induced apoptosis of gastric cancer cells: involvement of Ataxia-Telangiectasia-Mutated // *Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways: Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009. Vol. 1171. P. 156–162.
12. Feng S., Wang W., Tai I. T., Chen G., Chen R., Zeng H. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy for detection of colorectal cancer and precursor lesions using blood plasma // *Biomedical optics express*. 2015. Vol. 6. No. 9. P. 3494–3502.
13. Zhou Q., Peng R. Q., Wu X. J., Xia Q., Hou J. H., Ding Y., Zhou Q. M., Zhang X., Pang Z. Z., Wan D. S., Zeng Y. X., Zhang X. S. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer // *J. Transl. Med.* 2010. Vol. 8. P. 13(1–9).
14. Giusca S. E., Zugun F. E., Tarcoveanu E., Carasevici E., Amalinei C., Caruntu I. D. Immunohistochemical study of colorectal cancer liver metastases: the immune / inflammatory infiltrate // *Rom J. Morphol. Embryol.* 2010. Vol. 51. No. 1. P. 73–79.
15. Meyerhardt J. A., Tepper J. E., Venook A. Special Series: Advances in GI Cancer // *J. Clin. Oncol.* 2015. Vol. 33. No. 16. P. 1717–1720.
16. Kong K., Kendall C., Stone N., Nottingham I. Raman spectroscopy for medical diagnostics – From in vitro biofluid assays to in vivo cancer detection // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015. Vol. 89. P. 121–134.
17. Sahu A., Sawant S., Mangainc H., Krishna C. M. Raman spectroscopy of serum: an exploratory study for detection of oral cancers // *Analyst*. 2013.

M. V. Kruchinina^{1,3}, **V. N. Kruchinin**², **V. A. Volodin**²
Ya. I. Prudnikova¹, **A. A. Gromov**¹

¹ *Research Institute of Internal and Preventive Medicine –
Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS
175/1 Boris Bogatkov Str., Novosibirsk, 630089, Russian Federation*

² *Rzhanov Institute of Semiconductor Physics SB RAS
13 Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russian Federation*

³ *Novosibirsk State Medical University
52 Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russian Federation*

kruchmargo@yandex.ru

SPECTROSCOPY OF COMBINATION SCATTERING OF THE LIGHT FOR BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER WITH VARIOUS LOCALIZATION OF METASTASES (PILOT STUDY)

The spectra of combination scattering of the light (Raman) for samples of liquid serum in 68 people were studied: 19 conditionally healthy persons without oncological pathology and 49 people with colorectal cancer (divided into 3 groups depending on the localization of metastases) with the goal of determining the possibility of using Raman-spectroscopy for liquid serum in differentiating patients with colorectal cancer (CRC) with a various localization of metastases. The intensity of the peaks at 1005, 1157 and 1520 cm^{-1} in Raman spectra in patients with CRC compared with healthy individuals turned out to be significantly lower, correlating with the stage of the disease and the presence of metastases, which makes it possible to treat serum by Raman-spectroscopy as a promising diagnostic approach in colorectal cancer, in including at the early stages of the development of the disease. The diagnostic accuracy of this method in performing ROC analysis in differentiating local-regional CRC from metastatic was AUC 0.91 (0.82; 0.95) (95 % confidence interval), in distinguishing patients with liver metastases from those extrahepatic – AUC 0.73.

Keywords: Raman scattering of light, blood serum, colorectal cancer.

For citation:

Kruchinina M. V., Kruchinin V. N., Volodin V. A., Prudnikova Ya. I., Gromov A. A. Spectroscopy of Combination Scattering of the Light for Blood Serum in Patients with Colorectal Cancer with Various Localization of Metastases (Pilot Study). *Siberian Journal of Physics*, 2018, vol. 13, no. 2, p. 95–100. (In Russ.)

DOI 10.25205/2541-9447-2018-13-2-95-100