

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

## **Využití spektroskopických metod v detekci kolorektálního karcinomu**

**Use of spectroscopic methods in colorectal cancer detection**

## **AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE**

**MUDr. Michaela Miškovičová**

**Školitel: prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.**

Praha 2020

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Libor Vítek, Ph.D.

Školící pracoviště: Onkologická klinika 1. LF UK a VFN, U nemocnice 499/2, 12808 Praha 2

Školitel: prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty

## ABSTRAKT

Kolorektální karcinom patří mezi jedno z nejčtenějších nádorových onemocnění a představuje globální zdravotnický problém. V České republice je ročně diagnostikováno přibližně 8000 nových případů a zhruba polovina na tuto malignity umírá, přičemž 20 % pacientů je mladších než 60 let. Stále platí, že největší nadějí na úspěšnou léčbu a zvládnutí nemoci dává pacientům včasná diagnóza nádorové choroby.

Nadále trvá velmi vysoký podíl odhalení kolorektálního karcinomu v pokročilém stádiu, což je dáno především absencí spolehlivých a senzitivních klinických metod. Stále nepříznivá epidemiologická situace je jednoznačnou výzvou k dalšímu posílení všech aktivit směřujících k aktivní prevenci a včasné diagnostice. Kolorektální karcinom je totiž nejlépe preventabilním onemocněním gastrointestinálního traktu, trvá několik let, kdy přes prekurzorovou lézi vzniká postupně léze invazivní. Nabízí se tak dostatečně dlouhé diagnostické okno. V současné době se proto pozornost obrací na hledání dostupných, citlivých a minimálně invazivních technik, které můžou poskytnout včasnou, jednoduchou, rychlou, levnou a spolehlivou diagnostiku této nemoci a mohly by tak v budoucnu podpořit nebo nahradit konvenční diagnostické metody.

V naší práci jsme se věnovali využití zcela nových diagnostických přístupů. K nadějným metodám splňujícím výše uvedené požadavky patří molekulová spektroskopie, významný vývoj v diagnostice nádorů zaznamenaly Ramanova a infračervená spektroskopie. Pomocí nich lze zkoumat biologické vzorky na molekulární úrovni a pozorovat tak biochemické procesy, ke kterým dochází při vzniku patologie. Velký potenciál představují i metody pokročilé chiroptické spektroskopie – elektronový cirkulární dichroismus a Ramanova optická aktivita. Jejich citlivost na prostorovou strukturu biomolekul poskytuje jedinečnou možnost sledovat změny ve struktuře proteinů a dalších chirálních molekul. Aplikací těchto technik ve vyšetření krevních vzorků a samotné tkáně tlustého střeva (za podmínek *ex vivo* a *in vivo*) jsme se snažili o provedení senzitivní biochemické analýzy a srovnáváním výsledků zdravých jedinců a pacientů s kolorektálním karcinomem jsme usilovali o detekci charakteristických spektrálních markerů, které reflektují vznik malignity. Vyhodnocením spekter statistickými metodami bylo dosaženo rozdělení pacientů a kontrolních jedinců, kdy nejspolehlivější výsledky poskytla kombinace všech uvedených technik. Spektroskopické metody tedy vykazují potenciál stát se komplementárními či dokonce alternativními metodami pro klinickou diagnostiku kolorektálního karcinomu na základě analýzy plazmy i samotné tkáně tlustého střeva.

**Klíčová slova:** kolorektální karcinom, diagnostika, prevence, spektroskopické metody, analýza *in vivo* a *ex vivo*

## ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most common cancers and a global health problem. Approximately 8,000 new cases are diagnosed annually in the Czech Republic and about half of them die from this malignancy, with 20 % patients being under 60 years of age. It is still true that the greatest hope for successful treatment and management of the disease is given to patients by early diagnosis of cancer.

There is still a remarkably high proportion of detection of colorectal cancer in the advanced stage, which is mainly due to the absence of reliable and sensitive clinical methods. The still unfavorable epidemiological situation is a clear challenge to further strengthen all activities aimed at active prevention and early diagnosis. Colorectal cancer is the best preventable disease of the gastrointestinal tract, it lasts for several years, when an invasive lesion gradually develops through a precursor lesion. This offers a sufficiently long diagnostic window, Therefore, attention is currently being focused to find affordable, sensitive and minimally invasive techniques that can provide early, simple, rapid, inexpensive and reliable diagnosis of this disease and could thus support or replace conventional diagnostic methods in the future.

In our work, we focused on the use of completely new diagnostic approaches. Molecular spectroscopy is one of the promising methods that meet the above requirements; Raman and infrared spectroscopy have made significant developments in the diagnosis of tumours. They can be used to examine biological samples at the molecular level and thus observe the biochemical processes that occur during pathology. The methods of advanced chiroptical spectroscopy – electronic circular dichroism and Raman optical activity – also represent great potential. Their sensitivity to the spatial structure of biomolecules provides a unique opportunity to monitor changes in the structure of proteins and other chiral molecules. By applying these techniques in the examination of blood samples and colon tissue (under *ex vivo* and *in vivo* conditions) we have tried to perform sensitive biochemical analysis and by comparing the results of healthy individuals and patients with colorectal cancer we have detected characteristic spectral markers that reflect malignancy. By evaluating the spectra by statistical methods, a division of patients and controls was achieved, where the most reliable results were provided by a combination of all the above techniques. Thus, spectroscopic methods have the potential to become complementary or even alternative

methods for the clinical diagnosis of colorectal cancer based on the analysis of plasma and colon tissue.

**Key words:** colorectal cancer, diagnostics, prevention, spectroscopic methods, *in vivo* and *ex vivo* analysis

## **OBSAH**

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	6
1.1	Charakteristika kolorektálního karcinomu	6
1.2	Diagnostika kolorektálního karcinomu	7
1.3	Spektroskopické metody	9
1.3.1.	Infračervená spektroskopie	9
1.3.2	Ramanova spektroskopie	9
1.3.3	Chiroptická spektroskopie	10
1.3.4	Statistická analýza spektrálních dat	11
<b>2</b>	<b>Východiska a cíle práce</b>	11
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b>	12
3.1	Analýza plazmy	12
3.2	Analýza tkáně	13
<b>4</b>	<b>Východiska a cíle práce</b>	14
4.1	Analýza plazmy	14
4.1.1	Absorpční IČ spektroskopie	14
4.1.2	Ramanova spektroskopie	15
4.1.3	Ramanova optická aktivita	15
4.1.4	Elektronový cirkulární dichroismus	15
4.1.5	Statistické hodnocení	15
4.1.6	Interpretace dat – shrnutí	16
4.2	Analýza tkáně	17
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	17
<b>6</b>	<b>Literatura</b>	20
	<b>Seznam publikací</b>	27

# 1 ÚVOD

S incidencí přibližně 1,8 milion případů za rok a roční mortalitou téměř 861 000 obyvatel představuje kolorektální karcinom (KRK) celosvětově významný problém. Dle nejnovějších dat jde o třetí nejčastější příčinu úmrtí na malignitu a čtvrtou nejčastější diagnózu malignity ve světě (Rawla P. et al, 2019). Lze předpokládat, že absolutní počet nových případů se v průběhu příštích dvou desetiletí ještě zvýší v důsledku postupného stárnutí obyvatelstva a další expanze celosvětové populace.

V České republice (ČR) každoročně onemocní zhoubným novotvarem více než 96 500 lidí (data za rok 2017), nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. Ročně na ně umírá více než 27 tisíc osob, což představuje 23 % z celkové úmrtnosti, zároveň jsou druhou nejzávažnější příčinou nemocnosti ekonomicky aktivní části obyvatelstva. Kolorektální karcinom je v ČR nejčastějším nádorem, vezmeme-li incidenci bez ohledu na pohlaví, můžeme konstatovat, že se za posledních 40 let počet nových případů téměř zdvojnásobil. Úmrtnost se ale mírně snižuje a tento pozitivní trend je pravděpodobně způsoben zahájením screeningových programů ([www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 8.5.2020). Rozhodujícím faktorem pro léčebný výsledek je časný záchyt onemocnění. Velmi závažnou skutečností v epidemiologii kolorektálního karcinomu v České republice je dlouhodobě nepříznivý poměr stadií onemocnění u nově diagnostikovaných pacientů. Za posledních 30 let bohužel nepozorujeme zásadní změnu v podílu časných stadií v době diagnózy. Nadále trvá poměrně výrazné procento diagnostiky kolorektálního karcinomu v pokročilejším stádiu, charakterizované přítomností regionální lymfadenopatie (stádium III) nebo vzdálených metastáz (stádium IV), které se blíží k 50 %. Tento fakt významně zhoršuje celkovou prognózu pacientů a dosažitelné výsledky léčby.

## 1.1 Charakteristika kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom představuje histopatologicky zdánlivě uniformní onemocnění. Teprve poznatky z oblasti molekulární genetiky ukazují, že se jedná o skupinu nádorů, které se liší svou lokalizací a odpovědí na léčbu, a tím i prognózou. Profily genové exprese karcinomů lokalizovaných v konečniku a v tlustém střevě jsou rozdílné.

Přesná příčina vzniku této nemoci zůstává většinou neznámá, naprostá majorita nádorů ale vzniká jako důsledek komplexního působení mezi faktory genetickými a ovlivnitelnými vlivy životního stylu. Vznik nádorového onemocnění je komplexní, multifaktoriální proces vedoucí ke kumulaci různě významných mutací v onkogenech, tumor supresorových genech, DNA reparačních genech a genech proteinů účastnících se buněčné signalizace v somatické buňce. V důsledku těchto změn dojde k narušení regulace proliferace, diferenciaci, apoptózy a signálních drah v buňce, které se projeví její nádorovou transformací (Hanahan D., Weinberg R.A., 2000).

Rizikové pro vznik onemocnění jsou adenomové polypy, proto je vždy nutné odstranit endoskopicky, případně operačně, všechny prokázané polypy. Kolorektální karcinom, podobně jako jiné typy zhoubných nádorů, vzniká následkem akumulace škodlivých mutací a

epigenetických změn, které nakonec vedou k nekontrolovatelné proliferaci maligních buněk (Vogelstein B. et al, 2013).

Významné jsou hereditární faktory, vyšší riziko je v případě výskytu kolorektálního karcinomu v pokrevním příbuzenstvu 1. stupně, tedy u rodičů, sourozenců nebo dětí. Na sporadickém výskytu v rodinách se může podílet i expozice stejným rizikovým faktorům životního stylu (Butterworth A.S. et al, 2006). Skupinu nádorových onemocnění, u kterých lze pozorovat jasný podíl dědičnosti na jejich vzniku, představují hereditární nádorové syndromy. Jejich součástí je i kolorektální karcinom, v neselektované populaci pacientů s kolorektálním karcinomem nalezneme zárodečné patogenní mutace u 10 % pacientů.

Většinu přednádorových lézí lze endoskopicky odstranit, nicméně některé léze mohou být ploché, a tedy endoskopicky těžko vizualizovatelné. Navíc se předpokládá, že větší ploché léze ( $\geq 8$  mm) mohou obsahovat pokročilejší dysplastické změny v porovnání s polypoidními lézemi stejné velikosti (Soetkino R.M. et al, 2008). Riziko kolorektálního karcinomu se zvyšuje s velikostí, počtem a histologickým typem adenomů. Přítomnost tří a více adenomových polypů, velikost nad 10 mm a přítomnost vilózní složky v adenomu představují rizikový terén pro tvorbu dalších adenomových polypů, a v takovém případě by měl být pacient zařazen do dispenzárního kolonoskopického programu.

## 1.2 Diagnostika kolorektálního karcinomu

Velká část pacientů s kolorektálním karcinomem je asymptomatická, což je spojeno s úskalím časně diagnostiky a potřeby provádění pravidelných vyšetření se zaměřením na rizikovou populaci (Hamilton W. et al, 2005).

Diagnostika kolorektálního karcinomu u asymptomatických jedinců je součástí **screeningového programu**. Kolorektální karcinom představuje nádorové onemocnění, kterému lze včas předejít pomocí metod primární a sekundární prevence. Časná diagnóza bezpříznakového onemocnění umožňuje léčit lokalizované onemocnění a významně tak pozitivně ovlivňuje úspěšnost léčby a prognózu (Winawer S.J. et al, 1997).

Hlavní metodou sekundární prevence je screening. Pod tímto pojmem rozumíme pravidelné preventivní vyšetření obyvatel z dané cílové skupiny, u nichž nepozorujeme žádné příznaky daného onemocnění a kteří ani nemají zvýšenou predispozici pro jeho vznik. Cílem screeningu KRK je zvýšení četnosti zachytu zhoubných nádorů kolorekta a přednádorových lézí, tzv. prekanceróz. Mezi tyto prekancerózy patří zejména zmíněné adenomy, které mohou mít tubulární nebo vilózní charakter polypu s přítomností, nebo bez přítomnosti dysplastických změn. Důležitým záměrem screeningu je zvýšení podílu časných stádií KRK na úkor stádií pokročilých (Li D., 2018).

Vzhledem k dlouhé době vývoje sporadického KRK z adenomových lézí (přibližně 7-10 let) představuje screening kolorektálního karcinomu nevýhodnější nástroj k pozitivnímu ovlivnění incidence a mortality na toto onemocnění. Vliv screeningu v České republice lze pozorovat na základě epidemiologických ukazatelů. Od začátku organizovaného screeningového programu KRK v České republice v roce 2000 došlo do roku 2015 k poklesu incidence KRK o 18,4 % a k poklesu mortality o 32,4 % (Dušek L. et al, 2017).

Současný screening kolorektálního karcinomu v České republice je určen nadále pro asymptomatické jedince nad 50 let, kteří nesmí splňovat kritéria vysokorizikových skupin pro karcinom kolorekta. V současnosti existují 2 možnosti screeningového procesu:



opakovaný TOKS (dvouetapový program) nebo primární screeningová kolonoskopie jako alternativní metoda testu (jednoetapový program). TOKS se v případě negativního testu opakuje u jedinců ve věku 50-54 let 1x ročně, u jedinců ve věku 55 let a více jednou za 2 roky.

**Laboratorní diagnostikou** můžeme zachytit pokles hemoglobinu při typicky ztrátové anémii. Vyšetření krevního obrazu a základních biochemických parametrů doplňuje vyšetření solubilních nádorových markerů CEA a CA 19-9. Důležité je zmínit, že nádorové markery slouží jen jako doplňková diagnostická metoda, jejich analýza je použitelná při podezření na kolorektální karcinom, musí ale být podpořena dalšími testy. Nádorové markery mají nízkou specifitu i senzitivitu, k jejich elevaci často dochází z nenádorových příčin. Na druhou stranu zůstávají negativní u velké části pacientů s kolorektálním karcinomem, zejména v časných stádiích. V rámci screeningu kolorektálního karcinomu nemají žádný přínos. Jako kliničtí onkologové sledujeme zejména jejich dynamiku, která může reflektovat úspěšnost onkologické terapie (Reiter W. et al, 2000). Markery je nutné vyšetřit před resekcí nádoru, předoperační stanovení CEA má prognostický význam. Přetrvávající elevace markerů měsíc po operaci je suspektní z perzistujícího nádorového onemocnění (Reiter W. et al, 2000). V současné době je výzkum zaměřen především na hledání nových specifických markerů, jejich detekci a následné využití v klinické diagnostice a léčbě nádorového onemocnění.

V diagnostice kolorektálního karcinomu používáme celou paletu různých **zobrazovacích vyšetřovacích metod**. Jejich kombinace je volena individuálně. Endoskopicky lze posoudit vzdálenost nádoru od anu, exulceraci nebo hrozbu akutní obstrukce střeva. Kolonoskopie umožňuje vizualizovat tlusté střevo v celém rozsahu a diagnostikovat tak případné vícečetné synchronní nádorové postižení, případně polypy, které je nutné odstranit. Kromě biopsie suspektních útvarů je možné provádět také výkony terapeutické mnohých počínajících změn. Nevýhodou kolonoskopie jsou možné komplikace při výkonu, zvláště ve spojení s polypektomií, dalším faktorem ovlivňujícím výtěžnost kolonoskopie je zkušenost endoskopisty (Kaminski M.F. et al, 2010).

Strategie léčby lze stanovit až po dokončeném **stagingu**. U nádorů tračníku zjišťujeme rozsah velikosti primárního nádoru, regionální lymfadenopatie i vzdáleného postižení nejčastěji s využitím předoperačního CT vyšetření břicha (ideálně trupu). Jako nejsenzitivnější metody pro hodnocení lokoregionálního postižení se u pacientů s nádory rekta jeví magnetická rezonance pánve nebo transrektální ultrasonografie (Kekelidze M. et al, 2013). Vzhledem ke komplexnosti diagnostiky a léčby karcinomů rekta je nejlépe stanovit léčebný postup v prostředí multidisciplinárního týmu, jehož členy jsou minimálně chirurg, onkolog, radioterapeut, radiodiagnostik a gastroenterolog.

**Histopatologické vyšetření** je základem přesně stanovené onkologické diagnózy, často je nezbytnou podmínkou stanovení diagnózy také vyšetření molekulárně genetické. Patologická verifikace malignity není nutná jen vzácně. Předpokladem kvalitního vyšetření je dobře provedený odběr materiálu a jeho adekvátní fixace. Odebraná tkáň musí být dostatečně reprezentativní s vitálními nádorovými buňkami v dostatečném objemu. Makroskopicky může mít kolorektální karcinom formu polypoidní, ulcerózní nebo difuzní (skirhus). V mikroskopickém obraze se v případě kolorektálního karcinomu dle histologické stavby samotného nádoru jedná především o adenokarcinom (přes 90 % případů) vycházející z epitelálních buněk sliznice tlustého střeva (Leopoldo S. et al, 2008). Konvenční adenokarcinom je charakterizován formováním žláz, které je základem pro rozlišení stupně

diferenciace tumoru. Většina kolorektálních adenokarcinomů (~70 %) jsou morfologicky dle stupně diferenciace klasifikovány jako středně diferencované (Fleming M. et al, 2012).

Molekulární testování u kolorektálního karcinomu se stává stále komplexnějším. Základní oblastí je problematika testování signální dráhy začínající receptorem EGFR, která je zásadní s ohledem na dostupnou cílenou léčbu (Douillard J.Y. et al, 2013).

### 1.3 Spektroskopické metody

Spektroskopické metody patří mezi nedestruktivní analytické metody využívající interakce elektromagnetického záření a studované látky s cílem využít pozorovaných jevů (absorpce, emise, rozptyl) za účelem její identifikace, studia její struktury a konformace nebo stanovení její koncentrace. Spektroskopické metody tak poskytují specifickou informaci o struktuře vzorku na atomové a molekulární úrovni.

Podle použitého typu interagujícího záření jsou spektroskopické metody klasifikovány na metody pracující s nepolarizovaným či polarizovaným zářením. Z nepolarizovaných metod se jedná například o infračervenou nebo Ramanovu spektroskopii. Obě tyto metody umožňují sledovat strukturu a konformaci molekul prostřednictvím specifických funkčních skupin. Naproti tomu elektronový cirkulární dichroismus (ECD) a Ramanova optická aktivita (ROA), jakožto polarizované techniky, využívají kruhově polarizovaného záření a umožňují sledovat projevy optické aktivity chirálních molekul.

#### 1.3.1 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie patří do skupiny metod vibrační molekulové spektroskopie, kde získané hodnoty vibračních energií souvisí s pevností chemických vazeb a také s molekulovou geometrií a hmotnostmi jader, tedy s molekulovou strukturou. Tyto skutečnosti ji předurčují jako vynikající experimentální techniku, která kromě kvantitativní a kvalitativní analýzy hraje důležitou roli při výzkumu molekulové dynamiky, chemických vlastností molekul, vlivu prostředí na studované molekuly a mnoho jiných oblastí (Stuart B. H., 2005).

Její podstatou je interakce molekul s infračerveným zářením, kterým rozumíme elektromagnetické záření v rozsahu vlnočtů přibližně  $14\,300$  až  $10\text{ cm}^{-1}$  a vlnových délek  $700\text{ nm}$  až  $10\text{ mm}$  (Buijs, H., 2006). Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem. Podmínkou této absorpce je nenulová změna dipólového momentu při přechodu do vyššího vibračního stavu. Energie fotonů infračerveného záření ( $1\text{--}60\text{ kJ/mol}$ ) nestačí na excitaci elektronů, ale dochází při ní ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly, tzn. ke zvětšení amplitudy vibrace nebo zrychlení rotace molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, ve kterém se jednotlivé chemické vazby projeví charakteristickou vibrací. Infračervené spektrum představuje grafické zobrazení funkční závislosti energie na vlnové délce dopadajícího záření (Kania P., 2007).

Infračervená spektroskopie je aplikována především jako zobrazovací metoda, stejně jako Ramanova spektroskopie. Nejběžněji využívanými technikami jsou zmíněna infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR).

### 1.3.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie poskytuje podobné informace jako infračervená spektroskopie a je s touto technikou komplementární (Bumrah G.S., Sharma R.M., 2016). Lze jej, podobně jako infračervenou spektroskopii, aplikovat pro kvalitativní i kvantitativní analýzu široké škály vzorků. Informace poskytnuté Ramanovým spektroskopem jsou výsledkem rozptylu světla, zatímco infračervená spektroskopie spoléhá na jeho absorpci. Zjednodušeně lze říct, že infračervené spektrum poskytuje informace o polárních funkčních skupinách molekul, zatímco Ramanovo spektrum informace o skeletu a nepolárních vazbách molekul. Znamená to, že vibrace, u kterých se mění polarizovatelnost, mají pásy v Ramanových spektrech a vibrace, které mění dipól molekuly, mají pásy v infračervených spektrech. Obě tyto techniky poskytují spektrální charakteristiku specifických vibrací molekuly („molekulární otisk“), která představuje cennou informaci pro identifikaci látky (Bumrah G.S., Sharma R.M., 2016).

Ramanova spektroskopie ale využívá tzv. Ramanův rozptyl (Ramanův jev), což je neelastický rozptyl monochromatického záření dopadajícího na vzorek, který je doprovázen změnou energie záření. Při interakci mezi fotony dopadajícího světla s vibračními a rotačními stavy atomů nebo molekul vzorku dochází k výměně energie, kdy rozptýlené záření má jinou vlnovou délku (energii fotonů) než dopadající záření (Wilson E. et al, 1955; Crawford A. et al).

Protože se jedná o nedestruktivní analytickou metodu, její využití je velmi široké. Pro svou jednoduchost při přípravě vzorku, rychlost a přesnost měření je uplatňována ve farmaceutickém, biologickém a chemickém výzkumu, v lékařství a forenzních vědách. Biochemicky významné molekulární vibrace se nachází v oblasti 2000–400  $\text{cm}^{-1}$ . Tyto informace mohou být použity v různých biomedicínských aplikacích, jako je analýza chemického složení (DNA, RNA, proteiny, lipidy atd.), která může přispívat k diagnostice a charakterizaci nemocí včetně nádorových onemocnění (Fenn N.B. et al, 2011).

Měření spekter se může provádět *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo*, kdy nedochází k žádnému narušení buněčného prostředí a tato metoda patří mezi výhody Ramanovy spektroskopie, protože analýza chemických biomarkerů vyžaduje nativní podmínky. Ramanův spektrometr je také často spojen s mikroskopem, tuto kombinaci nazýváme Ramanova mikrospektroskopie (Shie I., Huser T.R., 2013).

### 1.3.3 Chiroptická spektroskopie

Chiroptická spektroskopie představuje řadu metod, které mají význam ve strukturní analýze chirálních látek a umožňují tak mapovat struktury molekul s vysokou citlivostí. Na rozdíl od metod molekulové spektroskopie, které využívají nepolarizované záření, pracují metody chiroptické spektroskopie se zářením kruhově polarizovaným. Chirální molekuly interagují s levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaným zářením lehce rozdílnou měrou, což je hlavní podstatou této analýzy. V současné době představují metody chiroptické spektroskopie potenciální nástroj pro klinickou diagnostiku. Jedná se především o testování pomocí spektroskopii ECD (elektronový cirkulární dichroismus) a ROA (Ramanova optická aktivita). Zatímco ECD umožňuje studium konformace chirálních molekul, ROA se zaměřuje na konkrétní vazby jednotlivých funkčních skupin a strukturní detaily.

Metoda **ECD** může být využita ke studii struktury a konformace proteinů a peptidů. V jejich spektrech ECD jsou pozorovány charakteristické spektrální pásy v oblastech, kde se projevují elektronové přechody amidové skupiny peptidové vazby (Berova N. et al, 2000). Právě tyto

spektrální oblasti odráží základní typy sekundárních struktur, které zahrnuje pravotočivá  $\alpha$ -helikální struktura a  $\beta$ -konformace.

**ROA** je metodou chiroptické spektroskopie, u které je po interakci vzorku s dopadajícím zářením a následném vzniku Ramanova rozptýleného záření měřen rozdíl pro pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované záření (Baumruk V.). Jako výsledek je získáno zdrojové Ramanovo spektrum a vlastní ROA spektrum. Principem ROA jsou přechody mezi vibračními hladinami v rámci základního elektronového stavu (Barron L. D et al, 2004). Na rozdíl od jednofotonového procesu absorpce se v případě Ramanova rozptylu jedná o podstatně složitější jev, proto je ROA mnohem komplikovanější metodou z hlediska teoretického popisu i experimentálního uspořádání.

### 1.3.4 Statistická analýza spektrálních dat

Výsledky jednotlivých spektrálních analýz tvoří vícerozměrné sady dat. K provedení správného vyhodnocení a následné detekci rozdílů mezi jednotlivými skupinami je potřeba provést rozbor pomocí sofistikovaných metod. Vícerozměrné statistické metody, jako je Analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA) a Lineární diskriminační analýza (LDA) jsou obecně akceptovány při využití v klasifikaci Ramanových spekter (Notingher I. et al, 2005).

## 2 VÝCHODISKA A CÍLE PRÁCE

Onkologická klinika VFN a 1. LF UK se věnuje dlouhodobě studiu a identifikaci nových diagnostických markerů nádorových onemocnění. V popředí našeho zájmu jsou nejčastější malignity v České republice včetně kolorektálního karcinomu.

Jedním z klíčových výzkumných programů Onkologické kliniky je identifikace nových diagnostických, prognostických a prediktivních nádorových markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem. Cílem této snahy je zlepšení časně diagnostiky, stratifikace rizika progresu a rekurence u pacientů s kolorektálními nádory a individualizace protinádorové léčby.

V rámci spolupráce s Ústavem analytické chemie VŠCHT je objektem našeho společného zaměření vývoj nových metod pro klinickou diagnostiku nádorových onemocnění.

### **Cíle disertační práce:**

**Předkládaná práce se zabývá vývojem a testováním nových metod diagnostiky kolorektálního karcinomu založených na analýze tkáně a krevní plazmy s využitím pokročilých metod molekulové spektroskopie (infračervené absorpce a Raman) a strukturně vysoce citlivých metod chiroptické spektroskopie – elektronový cirkulární dichroismus (ECD) a Ramanova optická aktivita (ROA).**

Vycházeli jsme z nových poznatků, kdy onkologická onemocnění vedou ke ztrátě biofyzikální účinnosti některých biomolekul, která se fyzikálně prezentuje ztrátou aktivní prostorové struktury či jinými strukturálními změnami. Tyto poškozené nebo změněné struktury se objevují v krevní plazmě i samotné nádorové tkáni a mohou být potenciálně rozpoznány výše zmíněnými metodami. V diagnostické praxi jsou tyto metody využívány velice zřídka a představují perspektivní cestu.

Naší snahou bylo predikovat specifické spektrální markery kolorektálního karcinomu, na jejichž základě by bylo možné diagnostikovat toto onemocnění v časném stádiu. Zároveň jsme se analýzou krevní plazmy snažili identifikovat pokročilost onemocnění a diferencovat tak klinická stadia. Cílem bylo zhodnotit potenciál výše uvedených metod jako nástrojů pro minimálně invazivní screeningovou diagnostiku kolorektálního karcinomu.

Konkrétně jsme se soustředili na:

- 1) vývoj a otestování metodiky měření vzorků krevní plazmy pacientů a kontrol metodami vibrační a chiroptické spektroskopie (v tomto ohledu jsou naše výsledky unikátní, neboť se analýzou biotekutin chiroptickými metodami doposud nikdo nezabývá).
- 2) nalezení podmínek pro *in vivo* a *ex vivo* měření Ramanových spekter tkáně tlustého střeva (karcinomu i zdravé tkáně) a statistické vyhodnocení odlišnosti spektrální odezvy obou těchto skupin, vývoj optické mikrosondy pro *in vivo* diagnostiku kolorektálního karcinomu založené na Ramanově spektroskopii.
- 3) vývoj algoritmů statistického zpracování spektrálních dat vibrační a chiroptické spektroskopie včetně aplikace vícerozměrných statistických metod (především lineární diskriminační analýzy) k diskriminaci pacientů a zdravých kontrol s cílem klasifikovat vzorky na základě jejich spektrální odpovědi včetně diferenciac dle stadia onemocnění.
- 4) interpretaci spektrálních dat a nalezení skupin biomolekul, u nich během vzniku a progresu onemocnění dochází k výše uvedené změně prostorové struktury a jiným strukturálním změnám.

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Analýza plazmy

K analýze plazmy bylo vybráno 30 pacientů s kolorektálním karcinomem (průměrný věk 65 let, medián 66 let) a 33 zdravých kontrol (průměrný věk 52 let, medián 55 let).

Kolorektální karcinom byl pacientům diagnostikován pomocí konvenčních diagnostických metod. Všichni podstoupili histopatologickou verifikaci cestou kolonoskopie a následně zobrazovací vyšetření k určení stadia nemoci – CT vyšetření hrudníku a břicha. Pacientům s karcinomem rekta byla v rámci stagingových diagnostických metod doplněna MRI pánve k hodnocení lokoregionálního postižení. V případě, že byli pacienti indikováni k provedení chirurgického výkonu, odběr krevního vzorku byl proveden před jeho provedením. Následně byl doplněn patologický staging po proběhnutí definitivního histopatologického vyšetření primárního tumoru a exstirpovaných spádových lymfatických uzlin.

Dle rozsahu rozsahu nádorového postižení byla provedena ještě separace pacientů s kolorektálním karcinomem na 2 skupiny, které byly srovnávány mezi sebou a zároveň se

zdravými kontrolami. Do 1. skupiny byli zařazeni pacienti časného klinického stádia I+II (n=11), kterou reprezentují pacienti jen s přítomností primárního tumoru bez regionální lymfadenopatie nebo vzdálených metastáz. Druhou skupiny tvořili pacienti v pokročilejším klinickém stádiu (stádium III+IV; n=19), u kterých bylo zjištěno metastázování do regionálních lymfatických uzlin, nebo systémová generalizace.

Skupinu „zdravých kontrol“ tvořili jedinci, kteří podstoupili preventivní screeningovou kolonoskopii s negativním výsledkem, kromě toho měli negativní osobní anamnézu stran komorbidit, fyzikální vyšetření bez patologického nálezu a laboratorní vyšetření bez abnormalit. Věk kontrolní skupiny byl srovnatelný s věkem pacientů.

Ze skupiny pacientů bylo vybráno 5 z nich, kteří podstoupili kurativní terapii (chirurgický výkon +/- adjuvantní chemoterapii) a po této léčbě zůstávají 2 roky v remisi, což znamená, že podle klinického, laboratorního a zobrazovacího vyšetření nevykazují žádné známky aktivity základní nemoci. Nazvali jsme je „zdraví pacienti“ a jejich spektra byla po 2 letech opakovaně vyhodnocena a srovnávána s jejich původními výsledky a se zdravými kontrolami.

Vzorky krve byly u obou skupin hodnoceny rutinním biochemickým testem s vyšetřením základních parametrů, jako je albumin, celková bílkovina, glukosa a C-reaktivní protein, včetně hladin nádorových markerů CEA a CA 19-9. Hladiny všech parametrů byly víc patologické v případě pacientů s kolorektálním karcinomem, dominovala hypalbuminémie a hypoproteinémie.

Odběry periferní venózní krve (9 ml) byly provedeny nalačno (od předchozí půlnoci), před užitím ranní medikace, a to do zkumavek s modifikovaným vnitřním povrchem antikoagulantem K3EDTA, aby nedocházelo k jejímu srážení. Vzorky byly následně odstředěny centrifugací po dobu 15 minut s přetížením 1000 G, čímž se odstranily krevní buňky a elementy a docílilo se tak oddělení krevní plazmy, která byla zmrazena v hluboko mrazícím boxu při teplotě -70 °C. Vzorky krevní plazmy byly transportovány v termoboxu při teplotě suchého ledu do Laboratoře medicínské diagnostiky Ústavu analytické chemie VŠCHT v Praze. Spektroskopické měření vzorků krevní plazmy bylo provedeno čtyřmi metodami, kterými jsou absorpční IČ spektroskopie, Ramanova spektroskopie, Ramanova optická aktivita (ROA) a elektronový cirkulární dichroismus (ECD).

### 3.2 Analýza tkáně

Efektivita Ramanovy spektroskopie v detekci karcinomu byla prokázána v pilotních studiích několikrát, a to cestou měření tkání *in vitro* i *in vivo* (Shipp D.W. et al, 2017; Sattlecker M. et al, 2010; Hands J.R. et al, 2016; Lewis P.D. et al, 2010; Theophilou G. et al, 2016). Největší důraz a aktivita byla kladena na využití Ramanovy spektroskopie v histopatologických aplikacích, kde se potvrdilo, že tato metoda může být využívána k přesné diferenciaci mezi patologickou a zdravou tkání při diagnostice kolorektálního karcinomu (Jenkins C.A. et al, 2016).

Naše práce se zaměřila na studium potenciálu Ramanovy spektroskopie v diagnostice kolorektálního karcinomu z měření tkáňových vzorků. Snažili jsme se zhodnotit, zdali je tato metoda schopna detektovat spektrální rozdíly mezi normální a patologickou tkání tlustého střeva a která excitační vlnová délka  $\lambda_{ex}$  je optimální pro tyto účely.

### **Analýza tkáně *ex vivo*:**

Měření tkáně *ex vivo* bylo prováděno na vzorcích od 14 pacientů s kolorektálním karcinomem. Diagnóza byla verifikována předem histopatologicky cestou endoskopického vyšetření s biopsií a následně potvrzena i po podstoupení chirurgického výkonu a odstranění vlastního nádoru a části zdravého střeva. Pacienti nepodstoupili předem žádnou onkologickou léčbu, chirurgický výkon byla jejich primární terapie. Všem pacientům byl kolorektální karcinom diagnostikován ve III. klinickém stádiu, tzn. s regionální lymfadenopatií.

Po provedení resekce tlustého střeva byly z odstraněné nativní tkáně střeva odejmuty drobné vzorky tkání tlustého střeva (velikosti 0,5-15 mm<sup>2</sup>), které makroskopicky obsahovaly patologickou nádorovou tkáň a zároveň vzorky makroskopicky obsahující zdravou sliznici. Vzorky byly uloženy do skleněných zkumavek a transportovány do Laboratoře medicínální diagnostiky na Ústavu analytické chemie VŠCHT v Praze. Následně bylo analyzováno 10-20 nezávisle vybraných míst odebrané tkáně.

### **Analýza tkáně *in vivo*:**

V posledních měsících jsme rozšířili náš výzkum o diagnostiku a analýzu tkáně tlustého střeva *in vivo* cestou prováděného kolonoskopického vyšetření (preventivního nebo diagnostického) s cílem diskriminovat zdravou tkáň od prekancerózních změn, případně karcinomu a přispět tím ke zlepšení sekundární prevence kolorektálního karcinomu.

Strategie projektu je založena na kombinaci konvenční diagnostické metody s novým analytickým přístupem, se zaměřením na časnou diagnostiku prekanceróz (zejména adenomového polypu), která by vedla k zvýšení efektivity prevence kolorektálního karcinomu. Jak již bylo zmíněno v úvodní části, kolonoskopie následována histopatologickým vyšetřením je běžná rutinní procedura v klinické praxi, kde celkový výsledek závisí na zkušenostech patologa, a proto může být velmi subjektivní. Toto vyšetření má navíc i své časové nevýhody. Využití technologicky pokročilých Ramanových spektroskopických technik se sondou s optickým vláknem dovoluje vyšetření sliznice tlustého střeva *in vivo* a získání výsledků v reálném čase. Nabízí se jako objektivní přístup, který může přispět k identifikaci hyperplastických, prekancerózních nebo kancerózních polypů.

Do experimentální skupiny pacientů zařazujeme jedince obou pohlaví starší než 18 let, bez horního věkového limitu, kteří nemají v osobní anamnéze diagnostikovan zhubný nádor, ani jinou závažnou komorbiditu. Podstupují kolonoskopické vyšetření v rámci klasického screeningu kolorektálního karcinomu, nebo pro podezření na toto onemocnění. Část z nich tvoří pacienti s hereditárním nádorovým syndromem, nebo s pozitivní rodinnou anamnézou či jinou predispozicí, u kterých je riziko onemocnění kolorektálním karcinomem významně zvýšené, a proto je u nich prováděno toto vyšetření v pravidelných a kratších časových intervalech. Tito pacienti trpí často různými prekancerózními změnami, dominantně adenomatosními polypy, které je nutné odstranit, aby se zabránilo jejich maligní transformaci.

## **4 VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **4.1 Analýza plazmy**

Analýza plazmy byla provedena celkem na 63 vzorcích, přičemž dle klinické diagnózy se jednalo o 30 vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem a 33 vzorků zdravých

kontrolních jedinců. 11 pacientů mělo nemoc zachycenou v časném klinickém stádiu (I+II), u 19 pacientů byla provedena diagnóza v klinickém stádiu pokročilém (III+IV), s postižením regionálních lymfatických uzlin nebo systémovou generalizací.

#### 4.1.1 Absorpční IČ spektroskopie

V IČ spektrech dominují svou intenzitou dva pásy. Oba tyto pásy souvisí se sekundární strukturou proteinů přítomných v krevní plazmě (Daidone I. et al, 2010). První pás se nachází u  $\sim 1649\text{ cm}^{-1}$  a je označován jako amid I, který všeobecně bývá pozorován ve spektrální oblasti  $1620\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ , kde se projevují valenční vibrace C=O peptidové vazby. Druhý vysoce intenzivní pás v IČ spektru má maximum u  $\sim 1547\text{ cm}^{-1}$ . V tomto případě se jedná o pás zvaný amid II, který je dán rovinnou deformační vibrací skupiny N–H spolu s valenční vibrací skupiny C–N peptidové vazby a je možné jej sledovat v oblasti  $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ . V IČ spektrech můžeme jasně pozorovat, že pásy amidu I a II vykazují pro vzorky pacientů výrazně nižší intenzitu než pro kontrolní vzorky. Pásy pacientů v klinickém stádiu I+II a III+IV jsou srovnatelné.

#### 4.1.2 Ramanova spektroskopie

Ve výsledných Ramanových spektrech dominují tři výrazné pásy, které jsou dány přítomností karotenoidů (Saleem M. et al, 2013). Pás  $\sim 1517\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenční vibraci C=C, nejintenzivnější pás  $\sim 1156\text{ cm}^{-1}$  představuje valenční vibraci C–C a v případě pásu  $\sim 1006\text{ cm}^{-1}$  se na jeho intenzitě může podílet kromě karotenoidů také valenční symetrická prstencová dýchací vibrace C–C náležící fenylalaninu (Synytsya A. et al, 2013). Ve většině zmíněných pásů sledujeme v našem měření rozdíl ve prospěch vyšší intenzity u zdravých kontrol, které reflektují odlišný metabolický status pacientů s kolorektálním karcinomem. Největší rozdíl mezi klinickými stádii I+II a III+IV byl pozorován u pásu  $1657\text{ cm}^{-1}$ , který odráží biomolekuly proteinů, pás klinických stádií I+II se blíží k pásu kontrolních jedinců.

#### 4.1.3 Ramanova optická aktivita

Spektra vzorků krevní plazmy poskytují především pásy charakteristické pro  $\alpha$ -helikální konformaci (Barron L. D. et al, 2000). Jedná se zejména o dublet v oblasti amidu I s centrem u  $\sim 1674\text{ cm}^{-1}$ , jehož záporný pás se nachází u  $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$  (C=O valenční vibrace peptidové vazby). Další spektrálním projevem typickým pro tuto konformaci je dublet s centrem u  $\sim 1109\text{ cm}^{-1}$  složený ze záporného pásu u  $\sim 1090\text{ cm}^{-1}$  a kladného pásu u  $\sim 1125\text{ cm}^{-1}$ . Prominentní kladné pásy  $1156$  a  $1517\text{ cm}^{-1}$  mohou být přiřazeny k plazmatickým karotenoidům, které se překrývají s pásy reziduí aromatických aminokyselin (Synytsya A. et al, 2013). Spektra pacientů s kolorektálním karcinomem vykazují v oblasti zmíněných pásů výrazně nižší intenzitu. Pozorované změny těchto pásů mezi jednotlivými měřeními skupinami demonstrují narušení struktury plazmatických bílkovin během karcinogeneze a metastázování.

#### 4.1.4 Elektronový cirkulární dichroismus

Při měření spekter ECD pozorujeme zde celkem tři pásy – dva záporné široké pásy s maximy  $\sim 222\text{ nm}$  a  $209\text{ nm}$  a též kladný pás u  $192\text{ nm}$ . Intenzita a poměr intenzit těchto pásů charakteristicky odráží sekundární strukturu proteinů v krevní plazmě. Tyto pásy odpovídají konkrétně  $\alpha$ -helikální konformaci. Krevní plazma je vysoce komplexní systém tvořený velkým počtem biomolekul, ale spektra ECD jsou ovlivněna především lidským sérovým albuminem (HSA). Ten se v krevní plazmě běžně nachází v koncentraci  $34\text{--}47\text{ g/l}$  (na  $70\text{--}75\text{ g/l}$



celkové bílkoviny) a zastupuje kolem 60 % všech bílkovin přítomných v krevní plazmě (Murray R.K. et al., 2003). Tento protein vykazuje vysoké zastoupení právě  $\alpha$ -helikální konformace.

Na základě srovnání intenzit zmíněných pásů 222 a 209 nm a kladného pásu 192 nm je zřejmé, že došlo k oddělení jednotlivých měřených skupin a mezi pacienty s kolorektálním karcinomem a zdravými kontrolami jsou zjevné významné rozdíly. Ty pravděpodobně souvisí s poklesem hladiny albuminu (který byl v pokročilejších stádiích potvrzen i cestou konvenčního biochemického vyšetření) a ztrátou jeho prostorové konformace u maligního onemocnění.

#### 4.1.5 Statistické hodnocení

K odhalení všech rozdílů napříč spektry, zejména těch, které nebylo možné snadno pozorovat pouhým okem, byly získané sady spektrálních dat zpracovány pomocí statistického hodnocení, a to pomocí metody LDA.

Hlavním cílem LDA bylo diferencovat pacienty s kolorektálním karcinomem od zdravých kontrol pomocí spektrálního vzorce a zároveň posoudit specifitu a senzitivitu využívaných spektroskopických metod ke stanovení spolehlivosti našeho statistického modelu.

Dalším cílem bylo diferencovat pacienty s kolorektálním karcinomem podle klinického stádia a snažit se tak pomocí spektrální diagnostiky stanovit i rozsah nádorového postižení. Navíc jsme vyhodnotili spektra 5 jedinců ze skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří podstoupili kurativní onkologickou terapii tohoto onemocnění a 2 roky vykazovali známky remise, tzn. že jim pomocí klinických, laboratorních a zobrazovacích metod nebyla prokázána recidiva základního onkologického onemocnění. Ověřovali jsme, jestli jsou jejich spektra v této fázi nemoci srovnatelná s výsledky kontrolních jedinců a zdali je možné spektrální diagnostiku využít v onkologické dispenzarizaci k ověření nádorové remise, případně odhalení rekurence.

Protože vysoce strukturálně-senzitivní chiroptická spektroskopie poskytuje doplňkové informace ke konvenční vibrační spektroskopii, vytvořili jsme statistický model, který kombinuje spektrální data získané ze všech využívaných spektroskopických metod (FT-IR, Raman, ROA a ECD). Spektra každé spektrální metody byla nejdříve statisticky vyhodnocena jednotlivě a následně srovnána. Ke zdůraznění rozdílů mezi jednotlivými vzorky a skupinami vzorků byly výsledky LDA vyneseny do grafu pomocí druhých mocnin Mahalanobisových vzdáleností (Maesschalck R. et al, 2000).

Nejvyšší senzitivitu (77 %) a specifitu (85 %) vykazovala spektroskopie ECD, zatímco nejnižší senzitivita byla pozorována u ROA a Ramanovy spektroskopie (70 %). Nejnižší specifitu (73 %) vidíme opět u Ramanovy spektroskopie, zatímco u ROA dosáhla 79 %. Statistické vyhodnocení ECD dat potvrdilo, že dosáhly po křížové validaci nejvyšší přesnosti (81 %), nejnižší přesnosti (71 %) bylo dosaženo Ramanovou spektroskopií.

Společným vyhodnocením všech spektroskopických metod došlo k významnému zlepšení získaných výsledků. Kombinovaný statistický model vede k významně přesnější klasifikaci ve srovnání s individuálními technikami. Po vyhodnocení LDA z kombinace všech spektrálních dat (ECD, Raman, ROA a FT-IR) došlo k velmi dobré separaci obou měřených skupin. Diskriminační schopnost našeho modelu dosáhla v tomto případě 100 %. Pro soubor 63 vzorků (30 pacientů a 33 zdravých kontrol) bylo po křížové validaci metodou LDA dosaženo 90 % senzitivity, 75 % specifity a správnosti 83 %.

Dalším krokem v statistické analýze spektrálních dat bylo dosáhnout a zhodnotit přesnost rozdělení pacientů s kolorektálním karcinomem podle klinických stádií. Po křížové validaci metodou LDA z kombinace spektrálních dat bylo dosaženo celkové přesnosti 82 % pro správné rozlišení stádií I+II, 64 % pro rozlišení stádií III+IV a 75 % pro správné zařazení do kontrolní skupiny.

#### 4.1.6 Interpretace dat – shrnutí

Na první pohled je zřejmý rozdíl v intenzitě pásů charakteristických pro  $\alpha$ -helix. S progresí nemoci tak zřejmě klesá v krevní plazmě koncentrace proteinů, které se vyskytují v dané konformaci.

Během onkogeneze se v klíčových molekulách, jakými jsou například proteiny v krevní plazmě, mění relativní zastoupení jednotlivých typů sekundárních struktur ( $\alpha$ -helix,  $\beta$ -skládaný list, neuspořádané segmenty). Se změnou struktury a konformace molekul dochází například ke změnám torzních úhlů peptidové vazby, což se projevuje rozdíly v rotačních a vibračních stavech sledovaných molekul.

Předchozí práce opakovaně prokázaly, že obecně pro pacienty s malignitou ve srovnání se zdravými lidmi jsou charakteristické vyšší koncentrace DNA a RNA (Teare M.D., Woll P.J., 2007; Shapiro B. et al, 2010). Předpokládá se, že k tomuto faktu dochází na podkladě odlišných mechanismů, např. apoptózou, nekrózou tumoru a aktivního uvolňování buněk. Na druhé straně, velká multicentrická randomizovaná studie, která hodnotila a srovnávala vzorky pacientů s různým typem karcinomu, zdravé kontroly a pacienty s CHOPN, neprokázala senzitivitu ani specifitu hladiny DNA pro diagnostické nebo screeningové účely malignity (Gormally E. et al, 2004).

Fluorescenční spektroskopie již byla opakovaně využita k potenciální detekci karcinomu v krevních vzorcích (Madhuri S. et al, 2003). Tyto experimenty ukázaly, že rozdíly mezi rameny s karcinomem a bez karcinomu mohou narůstat na základě modifikace fluoroforů metabolismu, které jsou s tumorem asociovány. K rozdílům v kompozici proteinů a k změnám prostředí fluoroforů dochází na základě alterace jejich fyzikálně-chemických vlastností.

## 4.2 Analýza tkáně

Ramanova spektra vzorků normální a patologické tkáně tlustého střeva získané od operovaných pacientů s kolorektálním karcinomem byla analyzována za různých excitačních vlnových délek z jednotlivých nezávislých míst.

Vyšší variabilita spekter mezi místy reflektuje strukturální a biochemickou heterogenitu tkáně tlustého střeva. Variabilita Ramanových markerů mezi pacienty dokazuje jejich individualitu. Pro patologické odchylky v tkáňové homeostáze byla variabilita signifikantně vyšší u patologicky změněné tkáně tlustého střeva než u zdravých vzorků. Hodnota excitačních linií signifikantně ovlivňovala vztah mezi Ramanovými spektrální pásy různých tkáňových biomolekul. Pásy hlavních biochemických komponent (proteinů, lipidů, nukleových kyselin, aj.) převládají v NIR-FT-Raman ( $\lambda_{ex}$  1064 nm) a NIR-Vis-Ramanových spektrech ( $\lambda_{ex}$  785nm), zatímco kvůli rezonančnímu zesílení převažují ve spektrech Vis-Raman ( $\lambda_{ex}$  532 nm) pásy vnitřních tkáňových chromoforů (karotenoidy, hem).

Byly zaznamenány evidentní spektrální rozdíly průměrných Ramanových spekter normální a patologicky změněné tkáně tlustého střeva. Spektrální pásy proteinové struktury klesaly

v důsledku poškození vzorků tkáně tlustého střeva. Na druhé straně, některé charakteristické pásy nukleotidů a aromatických aminokyselin byly u vzorků patologicky změněné tkáně výraznější. Intenzita a pozice některých rezonancí zesílených pásů hemového jádra závisela u NIR-Vis-Ramanova a Vis-Ramanova spektra na abnormalitě tkáně. Charakteristické pásy oxidovaného hemu demonstrují částečně vyšší intenzitu u patologicky změněných vzorků tlustého střeva, zatímco pásy deoxy-hemu jsou mnohem výraznější u zdravé tkáně tlustého střeva. Struktura hemu jako části myoglobinu a jiné hemoproteiny by tak mohly představovat sensitivní marker abnormality tkání u kolorektálního karcinomu.

## 5 ZÁVĚR

Rozvoj diagnostiky a léčby solidních nádorů přináší od počátku třetího tisíciletí postupné snižování mortality, nemocní mají mnohem větší šanci na uzdravení nebo delší život než na konci tisíciletí minulého. Včasná diagnostika kolorektálního karcinomu radikálně ovlivňuje úspěch léčby.

Ve své disertační práci jsem se věnovala zkoumání aplikačních možností a potenciálu spektroskopických metod – vibrační a chiroptické spektroskopie v klinické diagnostice karcinomu tlustého střeva, a to na základě analýzy vzorků krevní plazmy a střevní tkáně za podmínek *ex vivo* a *in vivo*.

Při rozboru a měření vzorků krevní plazmy byla naše pozornost zaměřena především na unikátní využití chiroptických technik spektroskopie ECD a ROA, jež vykazují inherentní citlivost k trojrozměrné struktuře a konformačním změnám chirálních biomolekul. Studie krevních vzorků byla doplněna o analýzy pomocí metod absorpční infračervené a Ramanovy spektroskopie. Výhodou těchto metod byla možnost vyšetřit plazmu jako celek s následným porovnáním spektrální odpovědi zdravých jedinců a pacientů s kolorektálním karcinomem a určit tak klíčové typy molekul, kterých se tyto konformační změny týkají. Mohlo by se jednat o přítomnost abnormálních molekul nebo patologické změny množství nebo struktury fyziologicky se vyskytujících biomolekul. Při porovnání spekter jednotlivých skupin byly patrné změny v intenzitě zejména v oblastech, které odrážejí sekundární strukturu proteinů. Vybraná spektrální data byla dále zpracována vícerozměrnými statistickými metodami, které umožnily nalézt specifické spektrální rozdíly mezi vzorky krevní plazmy pacientů a kontrolních jedinců. U každé metody jsme vyhodnotili schopnost správně rozdělit pacienty a zdravé kontrolní jedince do dvou nezávislých skupin.

Podle našich dat můžeme konstatovat, že každá jednotlivá spektroskopická metoda představuje potenciální možnost komplementární analýzy v klinické diagnostice. Nejlepších statistických výsledků dosáhla individuálně technika ECD s 81 % správností začlenění vzorků. Pomocí statistického vyhodnocení vybraných nejvýznamnějších spekter z kombinace všech 4 výše uvedených spektroskopických metod bylo dosaženo 100 % přesnosti rozdělení skupin pacientů a kontrolních jedinců, po křížové validaci jsme dosáhli 90 % sensitivity a 75 % specificity.

Pozitivním faktem je, že mezi pacienty s kolorektálním karcinomem byly zařazeni i jedinci (1/3 skupiny), kterým byla nemoc diagnostikována v časném stádiu, tzn. jen s postižením v rozsahu primárního tumoru bez regionální lymfadenopatie nebo vzdálené generalizace (stádium I-II).

Znamená to tedy, že spektrální diagnostika nádoru tlustého střeva může být prospěšná pro klinickou praxi ještě před jeho samotným lymfogenním nebo hematogenním šířením. Pacienti v iniciálním stádiu kolorektálního karcinomu mají téměř vždy zcela normální fyzikální nález a laboratorní vyšetření, včetně hladin solubilních nádorových markerů CEA a CA 19-9, které se ve screeningu ani v primární diagnostice této malignity neuplatnily. Spektroskopickými metodami tak můžeme detekovat časné objektivní změny v lidské plazmě reflektující nádorové onemocnění, které není možné odhalit žádnou jinou dostupnou metodou. Můžeme tedy konstatovat, že kombinace spektroskopických metod je schopna diagnostikovat solidní tumor ze vzorku periferní krve.

Úspěšné bylo i statistické rozdělení pacientů dle klinických stádií (I+II) a (III+IV) v souladu s konvenčními diagnostickými metodami, což by mohlo v budoucnu poskytovat cennou a zejména rychlou informaci o rozsahu nemoci při zvažování dalšího vyšetřovacího nebo terapeutického postupu, při kterém se velmi často hraje o čas. Naše výsledky dále prokázaly, že pomocí spektrální diagnostiky můžeme celkem správně predikovat nádorovou remisi a tato metoda se tedy nabízí jako další nástroj onkologické dispenzarizace.

Velkou výhodou diagnostiky patologie z krevní plazmy je minimální invazivita, pacienti často odmítají a vyhýbají se kolonoskopickému vyšetření, které pro ně představuje diskomfort, ať již pro náročnou přípravu nebo pro bolestivost či komplikace během samotné procedury. Mnohdy není možné z různých důvodů toto vyšetření provést. Kolonoskopie, jak i histopatologické vyšetření, je mnohdy subjektivní a jeho kvalita závisí od zkušeností a znalostí vyšetřujícího odborníka. Možnost provádění neinvazivního screeningu solidních maligních tumorů prostřednictvím vzorků periferní krve by mohla přinést revoluci v onkologii.

Analýza tkáně tlustého střeva Ramanovou spektroskopií za vybraných podmínek byla zatížena variabilitou dat při heterogenitě intra-tkáňově a inter-pacientské. V závislosti na jednotlivých Ramanových spektrech s různou excitační vlnovou délkou bylo dosaženo jen částečné separace normálních a patologicky změněných tkání tlustého střeva. Využitím statistických metod, konkrétně PCA kombinované databáze obsahující normalizované intenzity vybraných charakteristických Ramanových pásů, bylo dosaženo mnohem efektivnější diskriminace normálních a patologických tkáňových vzorků. Kombinace námi využitých excitačních vlnových délek nabízí uspokojivé možnosti detekce abnormalit způsobených kolorektálním karcinomem.

Na základě všech získaných výsledků můžeme tvrdit, že spektra vzorků krevní plazmy a nádorové tkáně tlustého střeva u pacientů zřetelně odráží přítomnost kolorektálního karcinomu, kdy bylo u vzorků krevní plazmy zejména využitím kombinace spektrálních metod, někdy i metod samotných, dosaženo významné shody výsledků ze spektroskopických analýz s výsledky z konvenčních klinických vyšetření.

Výsledky této práce budou v budoucnu dále rozšířeny o další spektra vzorků pro ověření zde uvedených závěrů a predikční schopnost našeho modelu bude dále verifikována.

### **Pokračování výzkumných projektů**

Výzkum zmíněný v disertační práci stále pokračuje ve spolupráci s Ústavem analytické chemie VŠCHT.

Očekáváme hodnocení a analýzu připravených vzorků krevní plazmy od 102 pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří byli odebráni před primární léčbou v různých stádiích onemocnění. Část z nich je nadále sledována na Onkologické klinice VFN a 1. LF UK,

v plánu máme tedy v rámci prováděné dispenzarizace pravidelnou kontrolu remise i cestou spektroskopického vyšetření krevních vzorků.

Momentálně aktivně funguje grantový projekt v rámci vývoje *in vivo* Ramanovy spektrální analýzy tkáně tlustého střeva ve spolupráci s IV. Interní klinikou VFN a 1. LF UK s cílem časné diagnostiky adenomatózních polypů a prevenci kolorektálního karcinomu. Projekt je založený na několika cílových aktivitách:

- i. zařazení 300 pacientů, kteří podstupují preventivní nebo diagnostickou kolonoskopii
- ii. kategorizace pacientů podle typu lézí a výsledků histopatologického vyšetření, v případě verifikace kolorektálního karcinomu doplnění stagingových a laboratorních vyšetření
- iii. výroba a testování Ramanovy sondy s optickým vláknem k *in vivo* měření Ramanových spekter tkáně tlustého střeva, která by měla být kompatibilní s kolonoskopem, s nastavením vhodných vlastností k vedení Ramanova signálu; sonda by měla sloužit k vizuálnímu vyšetření střevní sliznice, detekci polypů nebo karcinomu, neměla by bránit biopsii nebo odstranění polypů
- iv. nashromáždění spektroskopických dat získaných *in vivo* měřením Ramanovou sondou
- v. *ex vivo* analýza bioptovaných nebo exstirpovaných vzorků tkáně tlustého střeva Ramanovou spektroskopií, její schopnost cílit laserový paprsek na velmi malou plochu dovoluje analýzu malých vzorků; *ex vivo* analýza tkáně tlustého střeva dovoluje monitoraci správného fungování Ramanovy sondy; výsledky obou metod budou srovnávány
- vi. hledání spektroskopických markerů k diskriminaci normální a patologicky změněné tkáně; analýza výsledků Ramanovy spektroskopie ve vztahu mezi strukturou a konformací biomolekulárních komponent tkání během patogeneze
- vii. vyhodnocení diagnostických možností a schopností spektroskopických metod pro *in vivo* analýzu.

Všechny zmíněné aktivity mají potenciál přispět ke zjednodušení časné diagnostiky a následně urychlení intervence v terapii kolorektálního karcinomu, která je podmínkou pro zlepšení stále neutěšených výsledků léčby nemocných v našem oboru.

## 6 LITERATURA

- Aleksandrova K. et al. Obesity and colorectal cancer. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013; 5:61-77.
- Al-Karadaghi S. et al. A decade of progress in understanding the structural basis of protein synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 2000; 73(2-4):167-193.
- Aune D. et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011; 343:d6617.
- Balakrishnama S., Ganapathiraju S. Linear discriminant analysis-a brief tutorial. Department of Electrical and Computer Engineering, Mississippi State University [online]. 1998. Dostupné z:  
[http://www.music.mcgill.ca/~ich/classes/mumt611\\_07/classifiers/lda\\_theory.pdf](http://www.music.mcgill.ca/~ich/classes/mumt611_07/classifiers/lda_theory.pdf)
- Barron L.D. et al. Raman optical activity: an incisive probe of molecular chirality and biomolecular structure. *J Mol Struct* 2007; 834:7-16.
- Barron L.D. et al. Raman optical activity comes of age. *Mol Phys* 2004; 102(8):731-744.
- Barron L.D. et al. Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity. *Prog Biophys Mol Biol* 2000; 73(1):1-49.
- Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 2007; 1767 (9): 1073-1101.

- Baumruk V. Ramanova optická aktivita – proč a nač. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK [online]. Dostupné z: <http://fu.mff.cuni.cz/biomolecules/media/img/problems/roa.pdf>
- Bergholt M.S. et al. Fiberoptic confocal raman spectroscopy for real-time in vivo diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2014;146(1):27-32.
- Bergholt M.S. et al. Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy enhances real-time in vivo diagnosis of adenomatous polyps during colonoscopy. *J Biophotonics* 2016; 9(4):333-342.
- Berova N. et al. Circular dichroism. Principles and Applications. Wiley-VCH, New York 2000.
- Bisgaard M.L. et al. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 1994; 3(2):121-125.
- Bos A., et al. Treatment and Outcome of Synchronous Colorectal Carcinomas: A Nationwide Study. *Ann Surg Oncol* 2008; 25(2):414-421.
- Bosetti C. et al. Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009; 15(5):489-498.
- Buijs, H. Infrared Spectroscopy. In Springer Handbook of Atomic, Molecular, and Optical Physics, 2006, pp. 607–613.
- Bumrah G.S., Sharma R.M., Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 2016; 6 (3):209-215.
- Burt R.W. et al. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46:371-379.
- Butterworth A.S. et al. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2006; 42(2):216-227.
- Campion A., Kambhampati P. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc Rev* 1998; 27(4):241-250.
- Chen K. et al. Diagnosis of colorectal cancer using Raman spectroscopy of laser-trapped single living epithelial cells. *Opt Lett* 2006; 31(13):2015-2017.
- Choo-Smith L.P et al. Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(4):1461-1469.
- Chowdary M.V. et al. Biochemical correlation of Raman spectra of normal, benign and malignant breast tissues: a spectral deconvolution study. *Biopolymers* 2009; 91(7):539-546.
- Crawford A. et al. Raman Spectroscopy: A Comprehensive Review. *TMS Raman Report Group* 2017; 7:1–34. Dostupné z [https://www.academia.edu/1131363/Raman\\_Spectroscopy\\_A\\_Comprehensive\\_Review](https://www.academia.edu/1131363/Raman_Spectroscopy_A_Comprehensive_Review).
- Člupek M. et al. Noise reduction in Raman spectra: finite impulse response filtration versus Savitzky-Golay smoothing. *J Raman Spectrosc* 2007; 38(9):1174-1179.
- Daidone I. et al. On the origin of IR spectral changes upon protein folding. *Chem Phys Lett* 2010; 488: 213-218.
- Das G. et al. Attomole (amol) myoglobin Raman detection from plasmonic nanostructures. *Microelectron Eng* 2008; 85:1282-1285.
- Derks S. et al. Promoter Methylation Precedes Chromosomal Alterations in Colorectal Cancer Development. *Cell Oncol* 2006; 28(5-6):247-257.
- Douillard J.Y. et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369(11):1023-1034.
- Dušek L. et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. 2017. Dostupné z: <http://www.svod.cz>

- Efremov E.V. et al. Achievements in resonance Raman spectroscopy review of a technique with a distinct analytical chemistry potential. *Anal Chim Acta* 2008; 606(2):119-134.
- Efremov E.V. et al. Fluorescence rejection in resonance Raman spectroscopy using a picosecond-gated intensified charge-coupled device camera. *Applied Spectroscopy* 2007; 61(6):571-578.
- Esmonde-White F. W. L., Morris M. D. *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*. Berlín: Springer 2010. ISBN 978-3-642-02649-2.
- Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
- Fenn M. B. et al. Raman Spectroscopy for Clinical Onkology. *Advances in Optical Technologies* 2011; 20.
- Fleming M. et al. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3(3):153-173.
- Flonta S.E. et al. Expression and functional regulation of myoglobin in epithelial cancers. *Am J Pathol* 2009; 175(1):201-206.
- Freudiger C.W. et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science* 2008; 322(5909):1857-1861.
- Gąsior-Głogowska M. et al. FT-Raman spectroscopic study of human skin subjected to uniaxial stress. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013; 18:240-252.
- Guarrotxena N., Bazan G. C.: Antibody-functionalized SERS tags with improved sensitivity. *Chem Commun* 2011; 47:8784-8786.
- Gillessen S. et al. Risk of colorectal cancer in men on long-term androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(23):1760-1770.
- Gormally E. et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer* 2004; 111(5):746-749.
- Green M. et al. SERS platforms for high density DNA arrays. *Faraday Discuss* 2006; 132:269-280.
- Grodstein F. et al. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med* 1999; 106(5):574-582.
- Hamilton W. et al. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *Br J Cancer* 2005; 93(4):399-405.
- Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
- Hands J.R. et al. Brain tumour differentiation: rapid stratified serum diagnostics via attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Neurooncol* 2016; 127(3):463-472.
- Huang C.S. et al. Hyperplastic polyps, serrated adenomas, and the serrated polyp neoplasia pathway. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:2242-2255.
- Huang Y.Y. et al. Micro-Raman spectroscopy of algae: composition analysis and fluorescence background behavior. *Biotechnol Bioeng* 2010; 105(5):889-898.
- Huang Z. et al. Integrated Raman spectroscopy and trimodal wide-field imaging techniques for real-time *in vivo* tissue Raman measurements at endoscopy. *Opt. Lett* 2009; 34(6):758-760.
- Iconomidou V.A. et al. Secondary structure of chorion proteins of the teleostean fish *Dentex dentex* by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *J Struct Biol* 2000; 132(2):112-122.
- International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2017: Estimated Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence 144 Worldwide in 2017. Lyon, France: IARC; 2017. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Jasperson K.W. et al. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2044-2058.

- Jenkins M.A. et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4):489-498.
- Jenkins C.A. et al. Role of Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8(5):427-438.
- Jolliffe I.A., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Phil Trans R Soc A* 2016; 374:20150202.
- Kaminski M.F. et al. Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer. *N Engl J Med* 2010; 362:1795-1803.
- Kania, P. Infračervená spektrometrie. Praha: VŠCHT Praha [online]. 2007. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>
- Kassouf E. et al. Anti-EGFR Therapy for Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Extended RAS Gene Mutational Analysis. *BioDrugs* 2016; 30(2):95-104.
- Kather J. et al. Multi-class texture analysis in colorectal cancer histology. *Sci Rep* 2016; 6: 27988.
- Khalife K.H. et al. Reduction of hypervalent states of myoglobin and hemoglobin to their ferrous forms by thymoquinone: The role of GSH, NADH and NADPH. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780(4):627-637.
- Kekelidze M. et al. Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation. *World J Gastroenterol* 2013; 19(46):8502-8514.
- Kim D.D. et al. Failure of 3 different methods and biopsy sites to diagnose a patient with invasive colorectal cancer: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98(19):e15656.
- Kim M.S., Park Y.J. Detection and treatment of synchronous lesions in colorectal cancer: the clinical implication of perioperative colonoscopy. *World J Gastroenterol* 2007;13(30): 4108-4111.
- Kocna P., Zima T. Stanovisko ke stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní analýzou. *Klin Biochem Metab* 2015; 23 (44):78–81.
- Kopecký V., Baumruk V. Kam kráčí Ramanova optická aktivita aneb ohlédnutí za uplynulými 40 lety. *Chem Listy* 2011; 105:162-169.
- Knorr F. et al. Development of a time-gated systém for Raman spectroscopy of biological samples. *Opt Express* 2010; 18:20049-20058.
- Lee J.K. et al. Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014; 160(3):171.
- Lee V., Le D.T. Efficacy of PD-1 blockade in tumors with MMR deficiency. *Immunotherapy* 2016; 8(1):1-3.
- Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 138:2088-2100.
- Leopoldo S. et al. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(5):1429-1439.
- Lewis P.D. et al. Evaluation of FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. *BMC Cancer* 2010; 10:640.
- Li D. Recent advances in colorectal cancer screening. *Chronic Dis Transl Med* 2018; 4(3):139-147.
- Lieber C.A., Kabeer M.H. Characterization of pediatric Wilms' tumor using Raman and fluorescence spectroscopies. *J Pediatr Surg* 2010; 45(3):549-554.
- Lin K. et al. Real-time *In vivo* Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma Using Rapid Fiber-Optic Raman Spectroscopy. *Theranostics* 2017; 7(14):3517-3526.
- Lin K. et al. Optical diagnosis of laryngeal cancer using high wavenumber Raman spectroscopy. *Biosens Bioelectron* 2012; 35(1):213-217.



- LoConte N.K. et al. Alcohol and Cancer: A Statement of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2018; 36(1):83-93.
- Loupakis F. et al. , Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015; 107(3):dju427.
- Lynch H.T., de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(10):919-932.
- Lynch H.T. et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104(5):1535-1549.
- Lyng F.M. et al. Raman spectroscopy for screening and diagnosis of cervical cancer. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(27):8279-8289.
- Madhuri S. et al. Native fluorescence spectroscopy of blood plasma in the characterization of oral malignancy. *Photochemistry and Photobiology* 2003; 78(2):197-204.
- Maesschalck R. et al. The Mahalanobis distance. *Chemometrics Intel Lab Syst* 2000; 50: 1-18.
- Magalhães B. et al. Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev* 2012; 21(1):15-23.
- Marchesa P. et al. The risk of cancer and dysplasia among ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(8):1285-1288.
- Matousek P., Stone N. Emerging concepts in deep Raman spectroscopy of biological tissue. *Analyst* 2009; 134(6):1058-1066.
- Mirtič A, Grdadolnik J. The structure of poly-L-lysine in different solvents. *Biophys Chem* 2013; 175-176:47-53.
- Mizuno A. et al. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic study of human brain tissues and tumours. *J Raman Spectrosc* 1994; 25(1):25-29.
- Modest D.P. et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol* 2016; 27(9):1746-1753.
- Molckovsky A. et al. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. *Gastrointest Endosc* 2003; 57(3):396-402.
- Moreira L. et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* 2012; 308(15):1555-1565.
- Motz J. T. et al. Optical fiber probe for biomedical Raman spectroscopy. *Appl Opt* 2004; 43(3):542-554.
- Murray R.K. et al. Harper's Illustrated Biochemistry. New York: McGraw - Hill, 2003.
- Nijssen A. et al. Towards oncological application of Raman spectroscopy. *J Biophotonics* 2009; 2(1-2):29-36.
- Notingher I. et al. Multivariate analysis of Raman spectra for in vitro non-invasive studies of living cells. *Journal of Molecular Structure* 2005; 744-747:179-185.
- OECD. Survival and mortality for colorectal cancer. In: Health at a Glance [online]. B.m.: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2015, s. 154-155. Dostupné z: [http://www.oecd-ilibrary-org/content/chapter/health\\_glance-2015.55-en](http://www.oecd-ilibrary-org/content/chapter/health_glance-2015.55-en)
- Pal A. et al. Synthesis and characterization of SERS gene probe for BRCA-1 (breast cancer). *Faraday Discuss* 2006; 132:293-301.
- Parry S. et al. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut* 2011; 60(7):950-957.
- Petibois C., Déléris G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Trends Biotechnol* 2006; 24(10):455-462.

- Philipsen P.A. et al. Diagnosis of malignant melanoma and basal cell carcinoma by in vivo NIR-FT Raman spectroscopy is independent of skin pigmentation. *Photochem Photobiol Sci* 2013; 12(5):770-776.
- Piva J. et al. Overview of the use of theory to understand infrared and Raman spectra and images of biomolecules: colorectal cancer as an example. *Theor Chem Acc* 2011; 130(4):1261-1273.
- Puppels G.J. et al. Description and Performance of a Highly Sensitive Confocal Raman Microspectrometer, *Journal of Raman Spectroscopy* 1991; 22:217-225.
- Puppels G. J. et al. Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514,5 nm but not with 660 nm laser light. *Exp. Cell Res* 1991; 195(2):361-367.
- Puppels G. J. et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. *Nature* 1990; 347(6290):301-303.
- Raponi M. et al. KRAS mutations predict response to EGFR inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* 2008; 8(4):413-418.
- Rawla P. et al. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol* 2019; 14(2):89–103.
- Reiter W et al. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Research* 2000; 20(6D):5195-5198.
- Rex D.K. et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1315-1329.
- Riihimäki M. et al. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep* 2016; (6): 29765.
- Roth A.D. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28(3):466-474.
- Rothwell P.M. et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010; 376(9754):1741-1750.
- Saleem M. et al. Optical diagnosis of dengue virus infection in human blood serum using Raman spectroscopy. *Laser Phys Lett* 2013; 10(3):1-5.
- Sattlecker M. et al. Investigation of support vector machines and Raman spectroscopy for lymph node diagnostics. *Analyst* 2010; 135(5):895–901.
- Seeff L.C. et al. How many endoscopies are performed for colorectal cancer screening? Results from CDC's survey of endoscopic capacity. *Gastroenterology* 2004; 127(6):1670-1677.
- Setnička V., Urbanová M. Moderní přístupy k farmaceutické analýze. Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Praha 2010.
- Sha M.Y. et al. Detection of human viral RNA via a combined fluorescence and SERS molecular beacon assay. *Nanobiotechnology* 2007; 3(1):23-30.
- Shapiro B. et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51(11):2116-2120.
- Shibata D. et al. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994; 6(3):273-281.
- Shie I., Huser T.R. Methods and applications of Raman microspectroscopy to single-cell analysis. *Applied Spectroscopy* 2013; 67(8):813-828.
- Shipp D.W. et al. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. *Adv Opt Photonics* 2017; 9(2):315-428.
- Sieber O.M. et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003; 348(9):791-799.
- Smith Z.J. et al. Raman scattering in pathology. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* 2011; 35(3):145-163.

- Smith Z.J. et al. Rejection of fluorescence background in resonance and spontaneous Raman microspectroscopy. *Journal of Visualized Experiments: Jove* 2011; (51):2667-2668.
- Soetkino R.M. et al. Prevalence of nonpolypoid (flat and depressed) colorectal neoplasms in asymptomatic and symptomatic adults. *JAMA* 2008; 299:1027.
- Steiner G., Koch E.: Trends in Fourier transform infrared spectroscopic imaging. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394 (3):671-678.
- Stuart, B. H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Wiley, 2005. ISBN 978-04-70854-27-3.
- Surewicz W.K. et al. Determination of protein secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 1993; 32(2):389–394.
- Synytsya A. et al. Biodistribution Assessment of a Lutetium (III) Texaphyrin Analogue in Tumor-bearing Mice using NIR Fourier-transform Raman Spectroscopy. *PhotoChem Photobiol* 2004; 79:453-460.
- Synytsya A. et al. Analysis of Human Blood Plasma and Hen Egg White by Chiroptical Spectroscopic Methods (ECD, VCD, ROA); *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(16):5441-5453.
- Systém pro vizualizaci onkologický dat. Dostupných na [www.svod.cz](http://www.svod.cz) (8. 5. 2020).
- Tárraga López P.J. et al. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol* 2014; 7:33-46.
- Teare M.D., Woll P.J. Genomic tests: unreliable for cancer? A focus on circulating DNA and lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7(6):699-702.
- Terdiman J.P. MYH-associated disease: attenuated adenomatous polyposis of the colon is only part of the story. *Gastroenterology* 2009; 137(6):1883-1886.
- Theophilou G. et al. ATR-FTIR spectroscopy coupled with chemometric analysis discriminates normal, borderline and malignant ovarian tissue: classifying subtypes of human cancer. *Analyst* 2016; 141:585-594.
- Therkildsen C. et al. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 2014; 53(7):852-864.
- Thibodeau S.N. et al. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109):816-819.
- Tomášek J. et al. Onkologie-minimum pro praxi. 1. vyd. Praha: Axonite CZ, 2015. Asclepius. ISBN 978-80-88046-01-1.
- Tuma R. Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. *J Raman Spectrosc* 2005; 36(4):307-319.
- Urbanová M., Maloň P. Circular Dichroism Spectroscopy. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012.
- Van Manen H. J. et al. Single-cell Raman and Fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(29): 10159-10164.
- Vaughn C.P. et al. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50(5):307-312.
- Venderbosch S. et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 2014; 20(20):5322-5330.
- Vepřeková G. et al. Kolorektální karcinom. *Rozhl Chir* 2012; 91:44-47.
- Vogelstein B. et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339:1546-1558.
- Vojtěchová G. et al. Screening kolorektálního karcinomu. *Kardiol Rev Int Med* 2014, 16(3): 235-239.

- Wang W.C. et al. Recent advances in soft optical glass fiber and fiber lasers. *Prog Mater Sci* 2019; 101:90–171.
- Wang Z. et al. An optical fiber-folded distributed temperature sensor based on Raman backscattering. *Opt Laser Technol* 2017; 93:224–227.
- Wilson E. et al. Molecular vibrations: the theory of infrared and Raman vibrational spectra. New York: Dover Publications, 1955. ISBN 04-866-3941-X.
- Winawer S.J. et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112(2):594-642.
- Winaver S.J. et al.; The National Polyp Study Workgroup. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 1993; 329:1977-1981.
- Wolf A.M.D. et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(4):250-281.
- Wood B.R. et al. Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte. *Biophys Acta* 2001; 1539:58-70.
- Wood B.R., McNaughton D. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells *in vivo*. *J Ram Spectrosc* 2002; 33:517-523.
- Wu S. et al. Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2012; 125(6):551-559.
- Yamamoto T. et al. The Valence and Spin State of Iron in Oxyhemoglobin as Inferred from Resonance Raman Spectroscopy. *J Biol Chem* 1973; 248:5211-5213.
- Yang S. et al. BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1452-1459.
- Zaanani A. et al. Role of Deficient DNA Mismatch Repair Status in Patients With Stage III Colon Cancer Treated With FOLFOX Adjuvant Chemotherapy: A Pooled Analysis From 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol* 2018; 4(3):379-383.
- Zauber AG. The impact of screening on colorectal cancer mortality and incidence: had it really made a difference? *Dig Dis Sci* 2015; 60:681-691.
- Zhu F. et al. Raman optical activity: a tool for protein structure analysis. *Structure* 2005; 13(10):1409-1419.
- Zumbusch A. et al. Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering. *Phys Rev Lett* 1999; 82:4142.

## SEZNAM PUBLIKACÍ:

1. Synytsya A., Judexova M., Hruby T., Tatarkovic M., **Miskovicova M.**, Petruzelka L., Setnicka V. Analysis of human blood plasma and hen egg white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA). *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405(16):5441-53.
2. Synytsya A., Judexova M., Hoskovec D., **Miskovicova M.**, Petruzelka L. Raman spectroscopy at different excitation wavelengths (1064, 785 and 532 nm) as a tool for diagnosis of colon cancer. *Journal of Raman Spectroscopy* 2014; 45(10):903-911.
3. Tatarkovič M., Synytsya A., Stovickova L., Bunganic B., **Miskovicova M.**, Petruzelka L., Setnicka V. The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman

spectra of human blood plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2015; 407:1335-1342.

4. Tatarkovič M., **Miskovicova M.**, Stovickova L., Synytsya A., Petruzelka L., Setnicka V. The potential of chiroptical and vibrational spectroscopy of blood plasma for the discrimination between colon cancer patients and the control group. *Analyst* 2015; 140(7):2287-2293.

5. Synytsya A., Judexova M., Hruby T., Tatarkovic M., **Miskovicova M.**, Petruzelka L., Setnicka V. Analysis of human blood plasma and hen egg white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA). *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405(16): 5441-53.

6. **Miskovicova M.**, Fryba V, Petruzelka L, Setnicka V, Synytsya A, Tatarkovic M, Ulrych J, Vocka M. Novel spectroscopic biomarkers are applicable in non-invasive early detection and staging classification of colorectal cancer. *Neoplasma* 2020; Online ahead of print.