

# METODY DIAGNÓZY NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ PLIC A TLUSTÉHO STŘEVA

SABINA FRAŇKOVÁ a ALLA SYNYTSYA

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Alla.Synytsya@vscht.cz

Došlo 24.8.16, přepracováno 3.4.17, přijato 4.4.17.

---

**Klíčová slova:** metody diagnózy, kolorektální karcinom, nádor plic, vibrační spektroskopie

---

## Obsah

1. Úvod
2. Klinická diagnóza nádorů plic a tlustého střeva
  - 2.1. Screeningové testy
  - 2.2. Biochemické a genetické markery
  - 2.3. Zobrazovací metody
3. Vibrační spektroskopie pro klinickou diagnózu
  - 3.1. Ramanova spektroskopie
  - 3.2. Infračervená spektroskopie
  - 3.3. Statistické metody vyhodnocení spekter
4. Závěr

## 1. Úvod

V posledních letech poukazují celosvětové studie zabývající se výskytem a prevalencí nádorů na fakt, že dochází k poměrně rychlému nárůstu výskytu onkologických onemocnění v evropských zemích<sup>1</sup>. Česká republika se řadí mezi jednu z nejvíce onkologicky zatížených zemí v evropském měřítku. Nejčastějšími typy karcinomů dle Národního onkologického registru u české populace jsou nádory tlustého střeva a plic<sup>2</sup>.

Výskytu různých druhů karcinomů lze účinně předcházet a u řady případů je možnost zamezit úmrtí. Prevence je jednou z možných cest k úspěšnému snížení výskytu onkologických onemocnění. Hlavním bodem prevence zůstává dodržování zdravého životního stylu a využití účinných diagnostických postupů. To může vést ke snížení počtu karcinomů v pokročilých fázích, kdy mají pacienti horší prognózy pro přežití a léčba je finančně, psychicky i fyzicky velice náročná. V současnosti se pozornost věnuje hledání systémových řešení v diagnostice nádorových onemocnění, lepšímu přístupu k diagnostickým testům a zlepšení screeningových metod s větším pokrytím populace.

Tato práce je zaměřena na přehled v oblasti známých metod klinické praxe a vyvíjejících se metod vibrační

spektroskopie pro včasnou diagnózu nádorových onemocnění plic a tlustého střeva.

## 2. Klinická diagnóza nádorů plic a tlustého střeva

Včasná diagnostika nádorových onemocnění se stala celosvětovou prioritou. Rozpoznání raných stádií je velice obtížné. Obvykle se jedná o asymptomatické případy nebo nespecifické příznaky nemoci. Primární vyšetření u lékaře hraje zásadní roli pro včasnou diagnostiku a výběr postupu léčby. Metody běžně používané pro klinickou diagnostiku nádorů plic a tlustého střeva nebo zkoumané pro tento účel jsou shrnuty v tab. I.

### 2.1. Screeningové testy

V první fázi diagnostiky se lékař zaměřuje na analýzu tělních tekutin (krve, hlenu, slin a moči) s využitím screeningových metod, jejichž význam v preventivní medicíně neustále roste. Tyto metody lze zjednodušeně nazvat „vyhledávacími“, se zaměřením na odhalení nádorových onemocnění v raných stádiích u asymptomatických osob a představují jednu z nejslibnějších cest pro omezení nárůstu onkologických onemocnění.

Mezi screeningové metody pro odhalení nádoru tlustého střeva lze zařadit test okultního krvácení do stolice. Rozlišují se dvě kategorie tohoto testu: guajakový a imunochemický<sup>3–5</sup>. Tradiční guajakový test je založen na interakci guajakového oxidačního činidla s hemovou skupinou hemoglobinu a pseudoperoxidovou aktivitou. Guajakový test může být často falešně pozitivní, což je zvláště běžné, pokud nejsou dodržovány doporučené dietní omezení, a tudíž stolice obsahuje buď myoglobin z červeného masa, nebo rostlinnou peroxidasu z tepelně neupravené zeleniny<sup>5</sup>. Naopak vitamin C může způsobit falešně negativní výsledky, protože díky svému antioxidačnímu účinku inhibuje zabarvení poskytující reakci.

Oproti tomu imunochemický test nevyžaduje dietní nebo lékové omezení a je klinicky citlivější. Tento test vykazuje imunologickou specifickou monoklonální protilátky pro lidský hemoglobin nebo hemoglobin/haptoglobinový komplex a je založen na hemaglutinaci nebo latexové aglutinaci. Imunochemické testy zahrnují jak kvalitativní, tak i kvantitativní postupy třetí generace, které umožňují definovat optimální hodnoty citlivosti a spolehlivosti. Rutinnímu zavedení imunologických testů brání jejich vyšší cena, a proto jsou dodnes guajakové testy nejvhodnější pro screeningové vyšetření<sup>6,7</sup>. I když se dává přednost imunologickým testům, guajakové testování stolice průměrných rizikových skupin populace může být

Tabulka I  
Metody diagnostiky nádorů plic a tlustého střeva

Metoda	Výhody	Nevýhody
<i>Screeningové metody</i>		
Zobrazovací (endoskopické, radiologické, nukleární)	vizualizace vnitřních tkání a orgánů spojení sondy s PC neinvazivnost (MRI)	nejednoznačnost interpretace negativní vliv radiace (radiologické) finanční náročnost
Chemické/ imunochemické/genetické	jednoduchost a rychlost použití vysoká senzitivita a citlivost	nespecifičnost řady markerů falešně pozitivní výsledky
<i>Histologické metody</i>		
klasická histologie, imunohistochemie	odhaluje morfologické změny buněk spolehlivost, senzitivita a citlivost využití značených protilátek	časově náročný náročná příprava kvalitních preparátů spolehlivost závisí na zkušenosti histologa
<i>Vibrační spektroskopie</i>		
FTIR a Ramanova spektroskopie	možnost <i>in vivo</i> a <i>ex vivo</i> provedení nevyžaduje náročnou přípravu pacienta/ vzorku citlivost na strukturu a chemické změny možnost zesílení signálu (rezonanční Raman, SERS)	složitost interpretace výsledků detekuje pouze hlavní složky (FTIR) vysoké fluorescenční pozadí (Raman)

dostatečná ke snížení úmrtnosti související s rakovinou tlustého střeva o 25 % (cit.<sup>8</sup>).

Zajímavou alternativu v neinvazivních metodách screeningu představuje odhalení abnormální fekální DNA. Mechanismus analýzy vychází z detekce mutace genu KRAS (Kirsten Rat Sarcoma), APC (střešní adematózní polypy), p53 a aduktů DNA a RNA<sup>9,10</sup>. Z finančních důvodů se DNA testy zatím nevyužívají pro populační screening kolorektálního karcinomu (CRC).

V České republice prozatím neexistuje screening zaměřený přímo na karcinom plic. V 70. letech 20. století byly provedeny studie po vyšetření cytologie hlenu pro účinný screening rakoviny plic. Získané výsledky ale neprokázaly ani zlepšení detekce, ani snížení úmrtnosti<sup>11</sup>. Tento přístup je kvůli nízké citlivosti využit jako včasný diagnostický nástroj jen u podezřelých případů a u populaci s vysokým rizikem výskytu karcinomu plic. Zlepšení či zpřesnění oproti klasické cytologii představují metody analýzy obrazu buněčného jádra a molekulární analýzy hlenu. Analýza obrazu jádra rozlišuje malé buňky od nádorových plicních buněk na základě obarvení jader tzv. Feulgenovou reakcí<sup>12</sup>. Molekulární analýza hlenu deteguje DNA mutace. Nejběžnější se v hlenu nalézají mutace onkogenního genu KRAS a methylace DNA. Mezi méně časté mutace lze řadit mutace genu p53, ztrátu heterozygotnosti, adukty DNA a RNA (cit.<sup>12</sup>).

## 2.2. Biochemické a genetické markery

Klinické vyšetření krevních vzorků a odhalení biochemických a genetických nádorových markerů se dnes již

považují za rutinní analýzu. Nádorové markery lze zjednodušeně charakterizovat jako biologické molekuly produkované maligními buňkami nebo zdravými buňkami organismu jako odpověď na přítomnost nádoru. Jedná se o široké spektrum látek: antigeny, onkogeny, enzymy, fragmenty cytoplazmatických struktur a mnoho dalších. Pro odhalení zvýšených koncentrací těchto látek v organismu postižených pacientů je ve velké oblibě rychlý, jednoduchý a zároveň vysoce specifický a citlivý proužkový test s laterálním tokem, který sjednocuje principy papírové chromatografie a imunochemických metod. Kolorimetrická detekce je možná díky barevně značeným protilátkám<sup>13</sup>. V klinické praxi se tato metoda efektivně uplatnila při detekci nádorových markerů karcinomu plic a tlustého střeva, jako jsou karcinoembryonální antigen (CEA), karbohydrátový antigen (CA), fragmenty cytokeratinu 19 (CYFRA 19), antigen karcinomu dlaždicových buněk (SCCA), progastrin uvolňující peptid (Pro-GRP), neuron-specifická enolasa (NSE), tkáňový polypeptidový antigen (TPA) a tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS)<sup>14</sup>.

Zvýšení hladiny CEA, CYFRA 21-1 a NSE slouží při detekci karcinomu plic, ale není specifické pro tento typ nádoru. Vyšší specificitu vykazují biomarkery malobuněčného karcinomu plic NSE a Pro-GRP, přičemž poslední z nich navíc poskytuje také vyšší citlivost<sup>15</sup>. Expres Pro-GRP stimuluje proliferaci nádorových buněk a je zodpovědná za agresivnější chování nádoru. V přibližně 90 % případů dokáže Pro-GRP jako marker rozlišit malobuněčný karcinom od nemalobuněčného karcinomu plic a uplatňuje se v diferenciální diagnostice<sup>15</sup>. Cytokeratinové markery TPS a TPA se běžně používají v klinické praxi pro

detekci epiteliálních buněk karcinomů plic a tlustého střeva. Zvýšení hladiny markerů může být spjato s rizikem metastáz. Kombinace stanovení TPA a CEA slouží pro sledování recidivy kolorektálního karcinomu<sup>16</sup>.

Perspektivními markery karcinomu plic a CRC se zdají být mikroRNA (miRNA) nacházející se v séru a hle- nu. Malé, endogenní regulační geny se běžně účastní buněčného vývoje, proliferace, diferenciaci a apoptózy. Abnormální genová exprese miRNA může plnit funkci onkogenů či nádorových supresorů<sup>14</sup>. Zástupce genetických markerů pro CRC představují mutace genu APC, mikrosatelitní nestabilita (MSI), thymidylsyntéza, methylace genu SEPT 9 (mSEPT 9), aldehyddehydrogenasa 1, cyklooxygenasa 2 a dlouhé řetězce DNA<sup>17</sup>. Nízká koncentrace markerů v plazmě prozatím brání zavedení testu pro populační screening.

### 2.3. Zobrazovací metody

Zobrazovací screeningové techniky umožňují rozlišit patologickou tkáň plic a tlustého střeva na základě morfolo- gických odlišností od normální tkáně. Mezi prvními základními vyšetřovacími metodami byly radiologické metody umožňující zobrazení strukturních a fyziolo- gických změn. Z nich lze jmenovat rentgenové vyšetření (RTG), počítačovou tomografii (CT), dvojitou kontrastní iriografií (DCBE), nízko-dávkovou počítačovou tomogra- fii (LDCT) a sonografii (UZ).

Využití vysoké radiační dávky RTG záření umožňuje detegovat karcinom v pokročilých stádiích nemoci. V dů- sledku nízkého rozlišení může být RTG nahrazeno počíta- čovou tomografií CT, která dovoluje získat mnohem kva- litnější vícerozměrné zobrazení. Tato možnost našla své efektivní uplatnění u CT kolonografie, neboli virtuální kolonoskopie (CTC). Mnohem kvalitnější obraz se dá zís- kat použitím metody DCBE (cit.<sup>18</sup>). Z důvodu možného nežádoucího účinku ionizačního záření ustupují metody s vysokou radiační energií a intenzitou (CT – 8 mSv), před šetnější LDCT (1,5 mSv)<sup>19</sup>. Snížení radiační dávky předsta- vuje menší riziko pro zdraví pacienta, zároveň však může vyšší hladina šumu signálu vést ke zkeslení výsledku<sup>18</sup>.

Sonografie a různé její modifikace se hojně využívají jak pro diagnostiku, tak ke stanovení rozsahu rozšíření karcinomu plic a CRC. Metoda využívá ultrazvuk s vysou- kým frekvencí k 2D zobrazení s vysokým prostorovým rozlišením. Výhodu představuje nízká cena, flexibilita, přenosnost a minimální nepohodlí pro pacienta. Sonografie se velice často spojuje s endoskopickými metodami jako endobronchiální ultrazvuk (EBUS) pro vyšetření karcino- mu plic, nebo s endoskopickou ultrasonografií pro CRC (cit.<sup>20</sup>).

Endoskopické metody představují vyšetření pomocí ohebných optických sond (endoskopů), které umožňují zobrazení tělních dutin, dutých orgánů, a zároveň poskytu- jí možnost odběru vzorků pro další vyšetření (biopsii, his- tologii)<sup>20</sup>. Endoskopické metody jako kolonoskopie nebo flexibilní sigmoideoskopie patří k šetrným screeningovým

metodám diagnózy nádoru tlustého střeva. Pro detekci karcinomu plic jsou nejrozšířenější metody bronchoskopie, torakoskopie, a mediastinoskopie.

Metody nukleární medicíny umožňují zobrazit struk- turu orgánů nebo částí těla s vícerozměrným rozlišením. Nejčastěji se pro diagnostiku rakoviny plic a CRC využívá pozitronová emisní tomografie, scintigrafie a magnetická rezonance. Pozitronová emisní tomografie (PET) je zalo- žena na detekci  $\gamma$ -fotonů, které se uvolňují z tkáně po in- terakci pozitronu s elektronem. Nejrozšířenější pozitron emitující radiofarmakum pro PET je 18-fluorodeoxyglukosa (18F-FDG) s krátkým poločasem rozpadu<sup>21</sup>. Bylo prokázá- no, že PET je citlivá pro detekci vzdálených metastáz a účinná při sledování stavu lymfatických uzlin<sup>21</sup>. Magne- tická rezonance (MRI) spočívá ve vizualizaci struktury orgánů pomocí magnetického dipólového momentu ato- mových jader vodíku<sup>22</sup>. Oproti CT nebo PET je vyšetření kratší, snadno opakovatelné, nevyžaduje ionizujícího záře- ní, ale vyžaduje zavedení kontrastní látky. MRI poskytuje vynikající rozlišení měkkých tkání a dovoluje detegovat nádory, jejich invazivnost a vzdálené metastáze. Zajíma- vou aplikaci představuje difúzně vážená MRI, kterou lze nazvat markerem buněčné hustoty. Nádory vytvářejí husté struktury zabráňující pohybu vody a difúzi, což umožňuje jejich odlišení od normální tkáně<sup>22</sup>.

Zmíněné screeningové testy ovšem neposkytují jed- noznačnou informaci, a proto mikroskopie tkání (histologie) zůstává i nadále jednou ze spolehlivějších metod pro prokázání onkologického onemocnění, a to včetně CRC a nádoru plic. Histologie představuje mikro- skopické vyšetření tenkého řezu tkáně a zahrnuje řadu kroků přípravy a vyhodnocení histologických preparátů. Odběr tkáně se uskutečňuje během operace, endoskopické- ho vyšetření nebo při pitvě patologem. Vzorky tkáně se následně fixují. Nejběžnějším fixačním činidlem je formal- dehyd. Další krok představuje zalití parafinem a nakrájení na parafinové řezy. Tkáňové řezy mají obvykle tloušťku několik mikrometrů, ale bez použití speciálních barviv nejsou buňky ani buněčné struktury pozorovatelné pod světelným mikroskopem. Nejběžnější histologická barviva jsou hematoxylin a eosin<sup>23</sup>. Pro mikroskopickou analýzu vzorku se využívají světelné, elektronové a fluorescenční mikroskopy. Vývoj nových optických nástrojů je založen na odlišných vlastnostech (rozptyl, fluorescence či diferen- ciální lom) mezi zdravou a nádorovou tkání<sup>24</sup>. Modernější variantou histologie je imunohistochemie. Původně vznikla imunohistochemie propojením histologie, analytické chemie, biochemie a možnosti kovalentní vazby molekul imunoglobulinů na jiné molekuly. Zavedení fluorescenční- ho značení výrazně zvýšilo možnost identifikace a lokaliz- ace chemických komponent ve tkáních na histologické či cytologické úrovni<sup>24</sup>.

### 3. Vibrační spektroskopie pro klinickou diagnózu

Dosavadní diagnostické metody nejsou dostatečně citlivé a jednoznačné pro odhalení nádorových onemocnění v raných stádiích. Jejich provedení může být velice časově komplikované a finančně či časově náročné. Hledání mnohem citlivějších a zároveň rychlejších a levnějších metod diagnostiky zůstává i nadále aktuálním tématem. Velký potenciál pro odhalení patologických změn mají vibrační spektroskopické metody.

Metody vibrační spektroskopie lze aplikovat pro řešení různých biomedicínských problémů. Ramanova a infračervená (IR) spektroskopie poskytují údaje o chemickém složení a molekulární struktuře tkání. Uplatňuje se zejména při detekci patologických změn ve tkáních a může být použita pro odhalení rakoviny plic a CRC. Nedestruktivní metody a jednoduchost přípravy vzorku tkání předurčují aplikace vibračních spektroskopických metod v klinické praxi (obr. 1).

#### 3.1. Ramanova spektroskopie

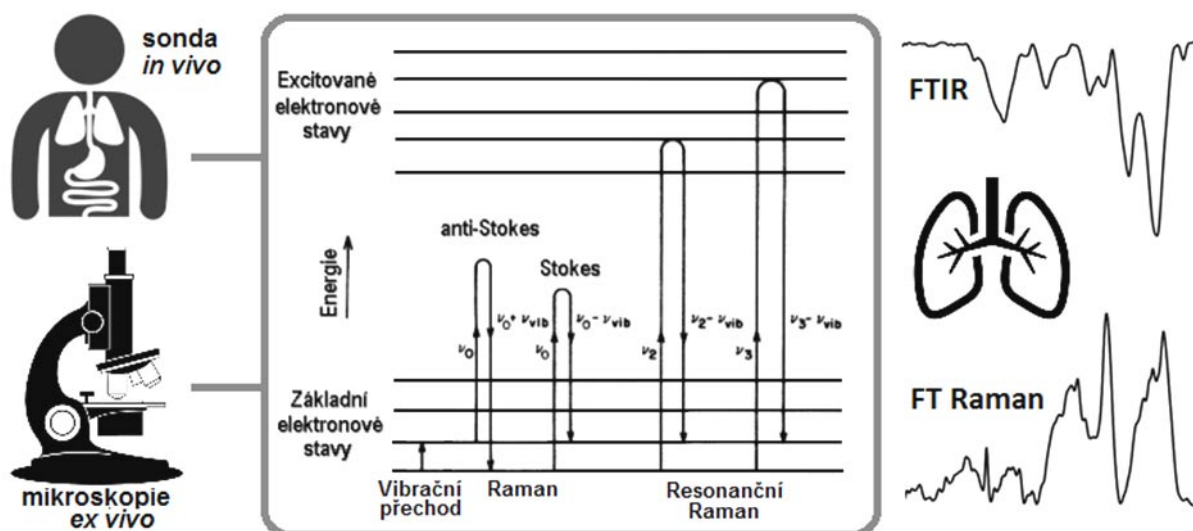
Ramanovu spektroskopii charakterizuje Ramanův rozptyl světla při interakci dopadajícího laserového záření se vzorkem. Ramanova spektra umožňují detegovat biochemické rozdíly v tkáních, buňkách a tělních tekutinách a mohou být využity pro *in vitro*, *ex vivo* či *in vivo* odhalení změn na biochemické úrovni. Této metody a její modifikace lze využít pro rozlišování benignity a malignity či pro mapování vzorků plic a tlustého střeva postižených karcinomem<sup>25–27</sup>.

Aplikaci Ramanovy spektroskopie pro biomedicínské účely dlouho zabraňovalo vysoké fluorescenční pozadí

biologických tkání, zejména u vzorků tkání plic. Jedna z možných cest řešení tohoto problému je měření s excitační vlnovou délkou v blízké infračervené oblasti spektra (NIR), kde většina látek neabsorbují. Při analýze vzorků čerstvé plicní tkáně multikanálovým NIR Ramanovým systémem s  $\lambda_{\text{ex}}$  785 a 1064 nm se zdá být nejvhodnější  $\lambda_{\text{ex}}$  1064 nm, jelikož při použití  $\lambda_{\text{ex}}$  785 nm vykazovala Ramanova spektra plicní tkáně vysoké fluorescenční pozadí<sup>26</sup>. Využití různé excitační vlnové délky může mít vliv na zvýraznění určitých typů tkáňových složek. Například ve studii vzorků CRC a normální tkáně pomocí Ramanovy spektroskopie s  $\lambda_{\text{ex}}$  1064, 785 a 532 nm byly nalezeny nejen Ramanovy pásy základních tkáňových složek, jako jsou proteiny, lipidy a nukleové kyseliny, ale i pásy vnitřních tkáňových chromoforů, a to karotenoidů a hemových jader<sup>27</sup>. Bylo pozorováno, že v Ramanových spektrech CRC tkáně výrazně narůstá intenzita pásů oxidované formy hemového jádra. Naopak u normální tkáně byly zaznamenány zřetelné pásy deoxy-hemového jádra. Při analýze plicních nádorových buněk, a to adenokarcinomu, karcinomu dlaždicových buněk, malých buněk a velkobuněčného karcinomu, Ramanovou spektroskopii s excitační vlnovou délkou 532 nm *in situ* byl objeven výrazný pás cytochromu C, který posloužil jako hlavní diskriminační faktor při klasifikaci buněk<sup>28</sup>.

Pro analýzu vzorků velmi malých rozměrů lze aplikovat konfokální Ramanovu mikrospektroskopii. Tato nedestruktivní technika účinně spojuje Ramanův spektrometr s optickým mikroskopem pro chemické mapování molekulárních vlastností povrchu vzorku pomocí excitačních laserů v NIR a viditelné oblasti<sup>29,30</sup>.

Přibližně stonásobného zesílení slabého Ramanova rozptylu lze dosáhnout aplikací povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS). Důvodem zesílení v SERS



Obr.1. Schéma využití vibrační spektroskopie pro biomedicínské aplikace

spektrech je efekt rezonanční interakce záření s buzenými plazmony na povrchu kovového substrátu nebo vhodné nanočástice. SERS se dnes testuje pro diagnostiku nádoru, kde nanočástice konjugované se specifickými protilátkami slouží jako markery. Výhodou je možnost detegovat nízké koncentrace analytů v tělních tekutinách, které jsou dostupnější než tkáň a mají diagnostický potenciál pro neinvazivní metody diagnózy. SERS spektra slin pacientů onkologického oddělení s nádorem plic poukázala na významné rozdíly v biochemickém složení vzorků, které byly doprovázeny poklesem intenzit pásů  $791\text{ cm}^{-1}$  (pyrimidinu),  $1007\text{ cm}^{-1}$  (fenylyalaninu),  $1364\text{ cm}^{-1}$  (tryptofanu) a nárůstem pásů  $906\text{ cm}^{-1}$  (tyrosinu) a  $1720\text{ cm}^{-1}$  (lipidů)<sup>29</sup>. Po odstranění četných proteinů bez diagnostického významu (amylasy, lysozymů a mucinů) se podařilo zlepšit expresi signálu máločetných biomarkerů<sup>31,32</sup>.

Modifikace stříbrných a zlatých nanočástic sérovými proteiny albuminem a globulinem vedla ke zvýšení citlivosti SERS metody pro diagnózu CRC. Zároveň použití kyseliny octové jako agregačního činidla bylo efektivnější oproti chloridu a dusičnanu draselnému. Zajímavé zjištění představuje fakt, že obsah tryptofanu ( $760\text{ cm}^{-1}$ ) se zvyšuje v případě modifikace albuminem, zatímco v případě globulinu klesá s postupujícím vývojem nádoru<sup>33</sup>.

Kombinací SERS s elektrochemickými metodami se podařilo vytvořit imunotest pro stanovení plicních nádorových markerů CYFRA-19, CEA, cirkulující RNA a miRNA v krevním séru. Jako intracelulární NIR-SERS nanosondy se podařilo využít superparamagnetického zlatého nanopouzdra k identifikaci a odlišení jednotlivých buněk nemalobuněčného karcinomu plic (A549, H1299, H460) a leukocytů<sup>34</sup>. Tato vysoce citlivá, rychlá a neinvazivní metoda představuje velký potenciál v diagnostice nádoru plic. Navíc lze její modifikací docílit stanovení i jiných nádorových markerů nebo buněk.

V případě *in vivo* endoskopického vyšetření za použití Ramanovy spektroskopie pro detekce nádorů lze slabý Ramanův rozptyl zesílit pomocí modernizace konstrukce sond optickými vlákny, které jsou schopné potlačit autofluorescenci tkání. Byl zkonstruován endoskop s optickými vlákny, který zaznamenává Ramanova spektra v oblasti  $800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$  a  $2800\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  v reálném čase *in vivo*, čímž umožňuje odlišit adenomatózní polypy od normálních, zvětšených polypů<sup>35</sup>. Minivláknová optická sonda byla vyvinuta a úspěšně testována pro určení odlišnosti nemalobuněčného karcinomu od normální plicní tkáně.

Ramanovy sondy pro diagnostiku *in vivo* představují velice perspektivní metodu vyšetření, která by jednoho dne mohla nahradit histologii. Navíc by mohla sloužit pro *in vivo* vyšetření malých ploch v různých lokalitách s podezřením výskytu rakoviny.

### 3.2. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) umožňuje detegovat změny v biomolekulách tkání či v samotných buňkách. Většina FTIR analýz probíhá při měření ve střední infračervené (MIR) oblasti ( $400$  až

$4000\text{ cm}^{-1}$ ), avšak některé studie používají FTIR měření v NIR oblasti ( $4000$  až  $12\,000\text{ cm}^{-1}$ )<sup>36</sup>. V současné době se do popředí pro diagnostiku nádorů dostává FTIR mikroskopie a FTIR sondy se zeslabenou úplnou reflektancí.

FTIR mikrospektroskopie umožňuje podrobněji prostudovat chemické změny onkogeneze na úrovni mikro-preparátů. Lze získat kvalitní spektra za velice krátkou dobu pro velmi malé vzorky. FTIR mikroskopie byla úspěšně využita pro odlišení plicní nádorové tkáně pacientů od zdravé tkáně dobrovolníků. Jako kandidát na diagnostický marker odrážející průběh vývoje nádoru byl navržen spektroskopický pás glykogenu<sup>37</sup>. Množství glykogenu ve tkáních bylo vyjádřeno poměrem intenzit charakteristických pásů glykogenu ( $1045\text{ cm}^{-1}$ ) vůči proteinu ( $1545\text{ cm}^{-1}$ ) nebo cholesterolu ( $1467\text{ cm}^{-1}$ ).

Jednou z neúčinnějších cest záznamu IR spektra představuje FTIR ve spojení se zeslabenou úplnou reflektancí (ATR). IR záření může být vedeno mimo FTIR spektrometr prostřednictvím optického vlákna k ATR sondě, která je tvořena průhledným krystalem s vysokým indexem lomu, a pak dalším optickým vláknem do spektrometru. Na výsledky FTIR-ATR analýzy může mít vliv vzdálenost mezi sondou a tkání. Při měření vzorků tkáně CRC a kolorektální sliznice *in situ* pomocí FTIR ATR sondy z optických vláken v různých vzdálenostech od nádoru ( $1$ ,  $2$  a  $5\text{ cm}$ ) bylo zjištěno, že optimální vzdálenost vzorku od FTIR-ATR sondy se pohybuje do  $1\text{ cm}$  (cit.<sup>38</sup>).

FTIR-ATR sondy mají široké uplatnění v biomedicinských aplikacích pro diagnostiku nádorů, odhad resekcce nádorů a sledování jejich recidivy. V současné době se sondy rozvíjejí pro dosažení diagnostiky nádorů *in vivo*. Aplikaci FTIR-ATR sondy v diagnostice CRC bylo zjištěno, že nádorová tkáň má vyšší obsah vody, nukleových kyselin a proteinů s převahou neuspořádané struktury a naopak nižší obsah lipidů a karbohydrátů. Snížení obsahu tuku v maligní tkáni nastává v důsledku jeho spotřeby pro vývoj nádoru a naopak nárůst bílkovin a nukleových kyselin je způsoben rychlejším metabolismem a proliferací nádorových buněk<sup>39</sup>.

FTIR spektroskopie v NIR oblasti (FT NIR) je přesná, rychlá a levná analytická metoda použitelná pro testování tkáňové patologie kolorekty<sup>36</sup>. Absorpce NIR záření ( $14\,700\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ) tkání poskytuje komplexní spektrum obsahující kvalitativní a kvantitativní informace o chemickém složení. V podoblasti krátkých NIR vlnů ( $14\,700\text{--}9000\text{ cm}^{-1}$ ) se převážně vyskytují pásy elektronových přechodů hemových bílkovin (hemoglobin, myoglobin a jejich oxy-deriváty) a tkáňových cytochromů. Tato podoblast je užitečná pro sledování průtoku krve, nasycení tkáně kyslíkem a jeho spotřeby, a redox stavu enzymů<sup>40</sup>. Podoblast dlouhých NIR vlnů ( $9000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ) obsahuje pásy kombinací a overtónů základních molekulárních vibrací C-H, N-H a O-H skupin, které jsou součástí všech biologických molekul. Jakákoliv patologická změna v chemickém složení tkání způsobená vývojem nemoci může být detegována pomocí FT NIR spekter a dále vyhodnocována s využitím účinných metod rozpoznávání<sup>36,40,41</sup>.

### 3.3. Statistické metody vyhodnocení spekter

Technické a vědecké možnosti dovolují sběr velkého množství dat za krátkou dobu. Zlepšení statistického vyhodnocení experimentálních dat přispívá k účinnější klasifikaci vzorků a vyznačení její diskriminační specifčnosti bez ztráty charakteristické informace. Pro Ramanovu a FTIR spektroskopii se využívá vícerozměrné metody analýzy, zejména analýza hlavních komponent (PCA) a lineární diskriminační analýza (LDA). Tyto a další metody umožňují stanovení klasifikátoru.

PCA převádí data do nového rozměrného prostoru, ve kterém je hlavní rozptyl datové sady reprezentován pouze několika proměnnými. Analýza dovoluje zvýraznit hlavní variabilitu a stanovit diagnosticky nejdůležitější faktory, díky čemuž dochází ke zlepšení účinnosti metod pro klasifikaci tkání a biologických tekutin<sup>33</sup>.

LDA představuje klasifikační analýzu, která snižuje dimenzionalitu dat na základě jejich odlišnosti. Umožňuje maximalizovat rozdíl mezi různými skupinami a minimalizovat rozdíl pro stejné skupiny výpočtem kombinace lineárních proměnných pro stanovení směru v prostoru. Slouží pro rozlišení mezi skupinami v závislosti na spektrálních rozdílech<sup>35</sup>.

Propojením PCA a LDA metod lze obvykle dosáhnout lepších výsledků pro diagnostiku. PCA redukuje velký rozměr dat a převádí je do menšího počtu proměnných. LDA následně slouží ke klasifikaci skupin.

Velice užitečnou vícerozměrnou statistickou metodou pro zpracování dat se jeví hierarchická shluková analýza (HCA). HCA umožňuje vytvořit hierarchii klastrů v závislosti na datech a statistice. Analýzou lze dobře rozlišit málo podobné vzorky, může ovšem docházet i k chybné klasifikaci při rozlišování úzce blízkých vzorků.

Regrese částečných nejmenších čtverců (PLS) je založena na konstrukci latentní proměnné zaměřující se na variabilitu dat ve spektrech. Pro spektroskopickou diagnostiku poskytují užitečné informace o afinitě skupin<sup>41</sup>.

V současné době sehrávají významnou roli v diskriminaci a interpretaci spektrálních dat tzv. „machine learning techniques“. Tyto techniky jsou postaveny na základě algoritmu, který je schopen se „učit“ a pomocí klasifikátoru (funkce vytvořené z dat) tak může předvídat problémy pro nová data již během jejich testování. Zástupcem je „Support Vector Machines“ široce využívaný pro klasifikaci nádorových vzorků. Dalším představitelem těchto algoritmů je neuronová síť představující počítačový program podobný řetězu nervových buněk, který se může „naučit“ detegovat i malé změny ve spektrech neodpovídající standardnímu spektru. Využívá se pro řešení složitých vztahů či neznámých.

## 4. Závěr

Vibrační spektroskopické metody v kombinaci s mikroskopií, vláknovou optikou a multivariačním statistickým vyhodnocením dat se stávají velkým přínosem pro

ranou diagnózu karcinomů plic a tlustého střeva. Tyto metody by mohly doplnit a možná i nahradit řadu klasických postupů screeningové a biochemické analýzy a tím přispět ke snížení výskytu nádorových onemocnění.

*Tato práce byla financována z účelové podpory MŠMT 20-SVV/2017 (A1\_FCHI\_2017\_003 a A2\_FCHI\_2017\_001), Operační program Praha – Konkurenceschopnost (CZ.2.16/3.1.00/21537 a /24503), Národní program udržitelnosti (NPU MŠMT – LO1601; 43760/2015).*

## LITERATURA

- Peters B. J. M., Janssen V. E. M. T., Schramel F. M., Garde E. M. W.: *Cancer Epidemiol.* 44, 5 (2016).
- Dusek L., Muzik J., Maluskova D., Majek O., Pavlik T., Koptikova J., Melichar B., Büchler T., Finek J., Cibula D., Babjuk M., Svoboda M., Vyzula R., Ryska A., Ryska M., Petera J., Abrahamova J.: *Klin. Onkol.* 27, 406 (2014).
- Mukherjee P., Chawla A., Lang T. U.: *Gastroenterology* 151, 248 (2016).
- Young G. P., Symonds E. L., Allison J. E., Cole S. R., Fraser C. G., Halloran S. P., Kuipers E. J., Seaman H. E.: *Dig. Dis. Sci.* 60, 609 (2015).
- Zavoral M., Suchánek Š., Frič P.: *Med. Pro Praxi* 5, 417 (2008).
- Habrdová V., Voříšek V., Černíková B., Palička V.: *Klin. Biochem. Metab.* 17, 233 (2009).
- Kocna P., Zima T.: *Klin. Biochem. Metab.* 23, 78 (2015).
- Bretthauer M.: *Best Pract. Res., Clin. Gastroenterol.* 24, 417 (2010).
- Lidgard G. P., Domanico M. J., Bruinsma J. J., Light J., Gagrat Z. D., Oldham–Haltom R. L., Fourier K. D., Allawi H., Yab T. C., Taylor W. R., Simonson J. A., Devens M., Heigh R. I., Ahlquist D. A., Berger B. M.: *Clin. Gastroenterol. H.* 11, 1313 (2013).
- Machová I., Brázdová A., Fusek M., Zídková J.: *Chem. Listy* 106, 16 (2012).
- Kubík A. K., Parkin D. M., Zatloukal P.: *Cancer* 89, 2363 (2000).
- Ronnekleiv-Kelly S. M., Burkhart R. A., Pawlik T. M.: *Surg. Oncol.* 25, 190 (2016).
- Zolal A., Ďurčiová B., Syslová K., Kačer P.: *Chem. Listy* 110, 917 (2016).
- Lech G., Slotwiński R., Słodkowski M., Krasnodębski I. W.: *World J. Gastroenterol.* 22, 1745 (2016).
- Zeng Q., Liu M., Zhou N., Liu L., Song X.: *Clin. Chim. Acta.* 455, 102 (2016).
- Noh E. M., Park Y. J., Kim J. M., Kim M. S., Kim H. R., Song H. K., Hong O. Y., So H. S., Yang S. H., Kim J. S., Park S. H., Youn H. J., You Y. O., Choi K. B., Kwon K. B., Lee Y. R.: *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 764, 79 (2015).
- Chen J., Xia Q., Jiang B., Chang W., Yuan W., Ma Z., Liu Z., Shu X.: *PLoS One* 10, 781 (2015).

18. Ruparel M., Quaipe S. L., Navani N., Wardle J., Janes S. M., Baldwin D. R.: *Thorax* 71, 367 (2016).
19. Lukeš P., Záborský M., Plzák J., Chovanec M., Foltynová E., Betka J., Kastner J., Betka J.: *Endoskopie* 21, 15 (2012).
20. Bopparaju S., Surani S.: *Curr. Respir. Med. Rev.* 10, 4 (2014).
21. Kekelidze M., D'Errico L., Pansini M., Tyndall A., Hohmann J.: *World J. Gastroenterol.* 19, 8502 (2013).
22. Ohno Y., Koyama H., Yoshikawa T., Matsumoto K., Aoyama N., Onishi Y., Sugimura K.: *Am. J. Roentgenol.* 198, 75 (2012).
23. Loharamaweethong K., Puripat N., Aoonjai N., Sutepvarnon A., Bandidwattanawong C.: *Histopathology* 68, 603 (2016).
24. Bettington M. L., Walker N. I., Rosty C., Brown I. S., Clouston A. D., McKeone D. M., Pearson S. A., Klein K., Leggett B. A., Whitehall V. L. J.: *Mod. Pathol.* 28, 414 (2015).
25. Stevens O., Iping Petterson I. E., Day J. C. C., Stone N.: *Chem. Soc. Rev.* 45, 1919 (2016).
26. Li S., Chen G., Zhang Y., Guo Z., Liu Z., Xu J., Li X., Lin L.: *Opt. Express* 22, 25895 (2014).
27. Synytsya A., Judexova M., Hoskovec D., Miskovicova M., Petruzalka L.: *J. Raman Spectrosc.* 45, 903 (2014).
28. Oshima Y., Shinzawa H., Takenaka T., Furihata C., Sato H.: *J. Biomed. Opt.* 15, 1 (2010).
29. Konga K., Catherine K., Stone N., Notinghera I.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 89, 121 (2015).
30. Neto L. P. M., Carvalho L. F. C. S., Santos L., Soto C. A. T., Canevari R. A., Santos A. B. O., Mello E. S., Pereira M. A., Cernea C. R., Brandão L. G., Martin A. A.: *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 17, 164 (2017).
31. Li P., Chen C., Deng X., Mao H., Jin S. B.: *J. Biomed. Opt.* 20, 1 (2015).
32. Li X. Z., Yang T. Y., Ding J. H.: *Spectrosc. Spectral Anal.* 32, 391 (2012).
33. Wang J., Lin D., Lin J., Yu Y., Huang Z., Chen Y., Lin J., Feng S., Li B., Liu N., Chen R.: *J. Biomed. Opt.* 19, 087003 (2014).
34. Zhang Y., Ye X., Xu G., Jin X., Luan M., Lou J., Wang L., Huang C., Ye J.: *RSC Adv.* 6, 5401 (2016).
35. Bergholt M. S., Lin K., Wang J., Zheng W., Xu H., Huang Q., Ren J. L., Ho K. Y., Teh M., Srivastava S., Wong B., Yeoh K. G., Huang Z.: *J. Biophotonics* 9, 333 (2016).
36. Wiesnera K., Fuchsa K., Gigler A. M., Pastusiaka R.: *Procedia Eng.* 87, 867 (2014).
37. Yano K., Sakamoto Y., Hirosawa N., Tonooka S., Katayama H., Kumaido K., Satomi A.: *Spectroscopy* 17, 315 (2003).
38. Sun X., Xu Y., Wu J., Zhang Y., Sun K.: *J. Surg. Res.* 179, 33 (2013).
39. Yao H., Shi X., Zhang Y.: *J. Spectrosc.* 2014, 1 (2014).
40. Boushel R., Langberg H., Olesen J., Gonzales-Alonzo J., Bülow J., Kjaer M., Scand J.: *Med. Sci. Sports* 11, 213 (2001).
41. Chen H., Lin Z., Wu H., Wang L., Wu T., Tan C.: *Spectrochim. Acta, Part A* 135, 185 (2015).

**S. Fraňková and A. Synytsya** (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague*): **Methods of Lung and Colon Cancer Diagnosis**

Prevalence of tumors and the search for effective diagnostic approach is a very topical issue worldwide. According to the Czech National Cancer Registry (CNCR), colon and lung cancers are the most common types of cancer in the Czech Republic. This review is focused on brief literal survey of known, widely used and newly evolving methods suitable for early diagnosis of the mentioned cancer diseases.